

اثر زیره سیاه بر فاکتورهای آنتی اکسیدانی و پارامترهای استرس اکسیداتیو در رت‌های مواجه شده با ۱ و ۲- دی متیل هیدرازین

ابوالفضل دادخواه^{۱*}، فائزه فاطمی^۲، سالومه دینی^{۳،۴}

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۲/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۲۰

چکیده

در این تحقیق، تاثیر کاربرد پودر و اسانس زیره سیاه با دوز ۰/۲ درصد (w/w) در مهار ایجاد سرطان کولون القاء شده با دی متیل هیدرازین (DMH) بر روی تغییرات شاخص‌های بیوشیمیایی مانند آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دیسموتاز (SOD)، گلوکوتاتیون احیا (GSH)، پراکسیداسیون لیپید (LP) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما (FRAP) و همچنین تغییرات پاتولوژیکی مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تزریق DMH باعث افزایش GSH و FRAP و کاهش SOD گردید. در حالیکه تیمار رت‌ها با اسانس و پودر زیره سیاه تاثیری بر روی بهبود پارامترهای بیوشیمیایی نداشته است، نتایج پاتولوژی تاثیر مثبت تیمارها را در روند سرطانزایی نشان دادند. لذا با توجه به نتایج به دست آمده، فعالیت ضد سرطانی اسانس و پودر زیره سیاه، احتمالاً مربوط به اثرات آن در مسیرهای دیگر متابولیکی (غیر از سیستم دفاع آنتی اکسیدانی و استرس اکسیداتیو) می باشد.

واژه های کلیدی: استرس اکسیداتیو، دی متیل هیدرازین، زیره سیاه، سرطان کولون

مقدمه

سرطان کولورکتال، گسترش سرطان در کولون یا رکتوم می باشد که هر ساله بیش از یک میلیون مورد جدید از آن در سراسر جهان تشخیص داده می شود (Tenesa & Dunlop, 2009). سرطان کولون چهارمین علت مرگ و میر سرطان در سراسر جهان و یک پنجم کل موارد سرطان را در ایران تشکیل می دهد. اگر چه شیوع این بیماری در سن بالای ۵۰ سال می باشد، ولی امروزه جمعیت جوان کشور درصد بالایی از افراد مبتلا به CRC (colorectal cancer) را تشکیل می دهند (Ansari et al., 2006). تنها ۲۰ درصد از علل سرطان کولون مربوط به اختلالات ژنتیکی یا ارثی می باشد (Rustgi, 2007). فاکتورها و عادات رژیم کم

۱- دانشیار بیوشیمی، گروه پزشکی، دانشکده پزشکی، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.
*(نویسنده مسئول : dadkhah_bio@yahoo.com)

۲- دانشیار بیوشیمی، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، تهران، ایران

۳- پژوهشگر، باشگاه پژوهشگران و نخبگان جوان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران

۴- کالج مهندسی بیوسیستم و صنایع غذایی، آزمایشگاه مهندسی مشترک ملی و محلی فن آوری و تجهیزات غذایی هوشمند، آزمایشگاه اصلی جاجیانگ برای فرآوری محصولات غذایی، مرکز تحقیق و توسعه جاجیانگ فن آوری و تجهیزات غذایی، دانشگاه جاجیانگ، هانگژو ۳۱۰۰۵۸، چین

فیبر و پرچربی و گوشت قرمز، مصرف الکل، چاقی و اضافه وزن، مصرف دخانیات و داروهای ضد التهابی غیر استروئیدی در بروز CRC از عوامل مهم غیر ارثی به حساب می آیند (Harriss *et al.*, 2009).

۲ و ۱-دی متیل هیدرازین (DMH) یکی از آلاینده‌های زیست محیطی سمی و یک پروکارسینوژن قوی می باشد (Bobek & Galbavy, 2001)، که پس از تزریق ابتدا در کبد توسط آنزیم سیتوکروم P450 متابولیزه می شود و متابولیت فعالی به نام متیل دیازونیوم تولید می کند که مسئول متیلاسیون DNA و ایجاد جهش در ژن بتاکاتنین است (Druckrey, 1970). این متابولیت در فاز II متابولیسم سموم توسط آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفراز (GST) با گلوکوتاتیون ترکیب می شود. این فرایند منجر به افزایش حلالیت و تسریع دفع آن در ادرار و صفرا می گردد (Manju & Nalini, 2005). در شرایط عادی، O⁶-متیل گوانین (O⁶-MeG) با کمک آنزیم خاصی به نام MGMT (O⁶-Methyl Guanine DNA Methyl Transferase) از DNA برداشته می شود ولی این آنزیم به مقدار بسیار کم در بافت وجود دارد. در صورت در معرض قرار گرفتن مزمن عوامل متیله کننده، O⁶-MeG در DNA تجمع پیدا می کند و باعث تبدیل باز گوانین به آدنین می شود (Colussi *et al.*, 2001). مطالعات نشان داده اند که در سرطان کولورکتال DMH با کاهش شدید فعالیت MGMT و تشکیل O⁶ MeG در DNA سلول های کولون منجر به تغییر تکثیر و تمایز سلولی در کولون دیستال و پروگزیمال و در نهایت ایجاد تومور می شود (Jackson *et al.*, 2003). مطالعات دیگر نشان داده است که فعالیت آنزیم گلوکوتاتیون S-ترانسفراز همراه با دیگر آنزیم های آنتی اکسیدانی از جمله سوپراکسید دسموتاز و کاتالاز در رت های سرطانی تیمار شده با ۲ و ۱-دی متیل هیدرازین (۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن) کاهش می یابد (Devasena *et al.*, 2002; Srihari *et al.*, 2008).

امروزه، استفاده از داروهای مختلف ضدالتهابی و نیز داروهای شیمی درمانی یکی از موثرترین راه های درمان برای تومورهای متاستاتیک می باشد. اگرچه، علاوه بر عوارض ایجاد شده در طی دوره درمان توسط این داروها، مقاوم شدن همزمان سلول های سرطانی نسبت به داروهای مختلف، هنوز یکی از موانع بزرگ بر سر راه یک درمان موفق به شمار می رود (Gottesman (2002). از این رو به نظر می رسد که پیشگیری از این بیماری با دیگر روش های درمانی رژیم غذایی و داروهای گیاهی مورد استفاده در طب سنتی می تواند تأثیر بسزایی در بروز یا کاهش شدت آن داشته باشد. میوه ها، سبزیجات و فیبرهای موجود در رژیم غذایی با تحت تأثیر قرار دادن فلور روده خطر ابتلا به CRC را کاهش می دهند (Smith *et al.*, 2002). گیاهان دارویی ایرانی چون گلپر (Roshanaei *et al.*, 2017a, 2017b; Dadkhah *et al.*, 2016)، مرزه (Attaran *et al.*, 2015; Fatemi *et al.*, 2015)، آویشن شیرازی (Attaran *et al.*, 2018)، زیره سیاه (Dadkhah *et al.*, 2018) و گل محمدی (Dadkhah *et al.*, 2020) خاصیت محافظت کنندگی قابل توجهی را در مطالعات حیوانی و آزمایشگاهی نشان داده است. مصرف مواد غذایی با خاصیت محافظت کنندگی از جمله گیاهان دارویی مورد استفاده در طب سنتی نیز در ممانعت، به تأخیر انداختن و یا معکوس کردن

روند سرطانزایی نقش مهمی ایفاء می کنند (Swan & Ford, 1997). گیاهان دارویی نیز به علت دارا بودن مزیت‌های زیادی از جمله ارزان و قابل دسترس بودن و پذیرش بهتر به وسیله بیماران، برای درمان بیماری‌ها از جمله سرطان مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از این گیاهان دارویی که مورد مطالعه واقع شده است، زیره سیاه (Caraway) می باشد. زیره سیاه به عنوان داروی گیاهی سنتی و همچنین بصورت چاشنی در غذاها مورد استفاده قرار می گیرد. این گیاه غنی از املاح معدنی همچون آهن، مس، کلسیم، پتاسیم، منگنز و منیزیم است. زیره سیاه دارای خواص مدر، بادشکن، مقوی، زیادکننده شیر، قاعده‌آور، نیرودهنده، ضدکرم، هضم کننده، ضدتشنج، قابض، معرق و مقوی معده است. زیره به دلیل دارا بودن مقادیر قابل توجهی از ریزمغذی‌ها، املاح و موادمعدنی و انواع ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها خواص تغذیه‌ای و درمانی فوق‌العاده‌ای دارد

(Eddouks *et al.*, 2004; Lemhadri *et al.*, 2006). به همین دلیل امید برآن است بتوان از آن در درمان سرطان

استفاده نمود.

نتایج مطالعات پیشین ما نیز نشان داد که مصرف اسانس و عصاره استخراج شده از گیاهان دارویی ایرانی همچون آنغوزه (*Ferula assa-foedita*) و زرشک (*Berberis integerrima*) به واسطه خاصیت آنتی اکسیدانی، به صورت چشمگیری سبب محافظت بافت کولون رت‌ها در برابر آسیب ناشی از ۱ و ۲-دی متیل هیدرازین شده است (Torabi *et al.*, 2015; Mohammadi, 2016). با توجه به مطالعات فوق و همچنین با توجه به تولید و اهمیت بالای گیاه دارویی زیره سیاه در کشورمان، در این مطالعه سعی بر آن است تا اثرات ضد سرطانی پودر و اسانس دانه‌های زیره سیاه در تعدیل آثار این ماده سرطان‌زا خطرناک مورد بررسی قرار گیرد و در این راستا فاکتورهای دخیل در استرس اکسیداتیو و سیستم دفاع آنتی اکسیدانی بررسی و در نهایت مقایسه شود. بدین ترتیب با روشن شدن مکانیسم اثرات ضد سرطانی دانه زیره سیاه، می توان در آینده از این گیاه و ترکیبات گیاهی و طبیعی دیگر در پیشگیری از ایجاد سرطان توسط DMH و ترکیبات سرطان‌زا مشابه استفاده کرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه پودر و اسانس زیره سیاه

دانه زیره سیاه تازه محصول کرمان از بازار خریداری شد و مطابق با روش زیر، اسانس آن به وسیله دستگاه کلونجر تهیه گردید. در این روش، ۵۰ گرم از دانه‌ها توسط دستگاه میکسر تبدیل به پودر می شوند. سپس، دانه‌های پودر شده در بالن یک لیتری دستگاه ریخته شد و با افزودن ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۹۰ دقیقه جوشانده شدند. سپس در قسمت نزولی دستگاه کلونجر، فاز روغنی جدا گردید. اسانس حاصل در یخچال یا فریزر پایدار است.

۲-۲- تیمار حیوانات

در این آزمایش حیوانات به صورت اتفاقی به ۴ گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند:

گروه کنترل: EDTA ۱ میلی مولار به صورت S.C به مدت ۵ هفته، هفته‌ای ۱ بار هر بار ۰/۵ میلی لیتر، به حیوانات تزریق شد.

گروه DMH: DMH حل شده در EDTA به صورت S.C به مدت ۵ هفته، هفته‌ای ۱ بار هر بار در دوز mg/kg b.w ۲۰ و در حجم ۰/۵ میلی لیتر، به حیوانات تزریق گردید.

گروه تیمار با اسانس زیره و DMH: در این گروه DMH حل شده در EDTA در دوز mg/kg b.w ۲۰ همانند گروه DMH، به حیوانات تزریق شده و همزمان غذای حاوی ۲٪/درصد از اسانس زیره سیاه به مدت ۱۶ هفته به رت‌ها خوراندند شد.

گروه تیمار با پودر دانه زیره سیاه و DMH: در این گروه DMH حل شده در EDTA در دوز mg/kg b.w ۲۰ همانند گروه DMH، به حیوانات تزریق شده و همزمان غذای حاوی ۲٪/درصد (w/w) از پودر دانه زیره سیاه به مدت ۱۶ هفته به رت‌ها خوراندند شد.

بعد از ۱۶ هفته از رت‌های تیمار شده خون‌گیری و بافت کبد و کولون آنها جهت بررسی‌های هیستولوژیکی و بیوشیمیایی جدا گردید.

۲-۳- بررسی هیستوپاتولوژیکی بافت کولون

۱۶ هفته بعد از شروع تیمار حیوانات، رت‌ها کشته شدند و بافت کولون آنها برای بررسی‌های هیستوپاتولوژیک جدا شد. تعداد کل aberrant crypt foci (ACF) در ۲ سانتی‌متر از انتهایی‌ترین بخش کولون (دیستال کولون) شمارش شدند. بدین منظور بلافاصله بعد از بیرون آوردن کولون، یک برش طولی از سکوم تا آنوس در روده زده شد و در محلول phosphate buffered saline (PBS) شسته شد. سپس، نمونه‌ها بین دو تکه کاغذ صافی ساندویچ شده و در محلول فرمالین بافر قرار داده شدند. بعد از آن نمونه‌ها در متیلن بلو (۰.۲ درصد در نرمال سالین) به مدت ۲ تا ۳ دقیقه رنگ آمیزی شدند و بر روی اسلاید میکروسکوپی قرار گرفتند (Bird, 1987). اسلایدهای تهیه شده به منظور مقایسه تغییرات بافتی در نمونه‌های مختلف توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفتند و عکس برداری شدند. تغییرات هیستوپاتولوژیکی توسط یک پاتولوژیست حیوانات آنالیز شد. تعداد ACF و AC (aberrant crypt) و نواحی هیپرپلازی مورد بررسی قرار گرفتند. AC‌ها از کریپت‌های نرمال اطرافشان توسط اندازه بزرگتر، دهانه شکاف خورده (Slit-like opening)، اپی‌تلیال ضخیم‌تر و تیره‌تر متمایز گردیدند. به منظور بررسی بیشتر موفولوژیکی ACF‌ها در مخاط کولون، پس از فیکس کردن بافت‌ها، و گذراندن مراحل آماده‌سازی بافتی و تهیه

بلوک‌های پارافینی، برش‌های نازکی به اندازه ۶ میکرومتر از آنها تهیه و به روش هماتوکسیلین و ائوزین (H&E) رنگ‌آمیزی گردید. تغییرات هیپرپلاستیک از طریق شمارش تعداد سلول‌ها در هر ستون کریپتی (ارتفاع کریپت) ارزیابی شد. به منظور بررسی تغییرات دیسپلاستیک (dysplasia) و نئوپلاستیک (malignancy) در ACF، یک درجه بندی بر اساس تغییرات غیرطبیعی در هسته سلول‌ها (nuclear atypia) مورد توجه قرار گرفت که معیارهای این درجه‌بندی شامل طول، جهت قرارگیری و موقعیت هسته سلول‌ها نسبت به یکدیگر (stratification and elongation) و دست نخورده بودن غشاء پایه بود و به صورت خفیف، متوسط و شدید لحاظ گردید. تمام AC‌ها که درجات خفیفی از این تغییرات را نشان می‌دادند به عنوان ACF هیپرپلاستیک و AC‌هایی که تغییرات متوسط و شدید را نشان می‌دادند به عنوان ACF دیسپلاستیک تقسیم بندی شدند.

۲-۴- تست‌های بیوشیمی

۲-۴-۱- اندازه‌گیری TBARS (Thiobarbitoric acid reactive substances) به عنوان محصول

پراکسیداسیون لیپیدها در هموژن بافت کبد

اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون چربی‌ها توسط کیت اندازه‌گیری خریداری شده از کمپانی Cayman آمریکا و طبق پروتوکل کیت انجام می‌شود. میزان TBARS به عنوان محصول پراکسیداسیون لیپیدها در هموژن بافت در ۵۳۰ نانومتر و با استفاده از معرف تیوباربیتوریک اسید (TBA) اندازه‌گیری شد.

۲-۴-۲- اندازه‌گیری گلوتاتیون احیاء (GSH) در بافت کبد

اندازه‌گیری میزان گلوتاتیون احیاء (GSH) توسط کیت اندازه‌گیری خریداری شده از کمپانی Cayman, USA و طبق پروتوکل کیت انجام می‌شود. در این کیت از روش آنزیمی، آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز جهت تعیین GSH استفاده شده است. گروه سولفیدریل GSH با DTNB (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)) واکنش و محصول زرد رنگ TNB (5-thio-2-nitrobenzoic acid) تولید می‌شود. اندازه‌گیری میزان جذب TNB در ۴۰۵ نانومتر جهت تخمین میزان GSH در نمونه انجام می‌گیرد.

۲-۴-۳- اندازه‌گیری فعالیت آنزیم سوپر اکسید دسموتاز (SOD) در کبد

فعالیت این آنزیم توسط کیت اندازه‌گیری خریداری شده از کمپانی Cayman, USA و طبق پروتوکل کیت انجام می‌شود. در این کیت از نمک تترازولیوم برای اندازه‌گیری رادیکال‌های سوپر اکسید استفاده شده است که توسط آنزیم گزانتین اکسیداز و هیپوگزانتین تولید می‌شود. قرائت جذب چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر انجام گردید.

۲-۴-۴- اندازه گیری فعالیت آنزیم کاتالاز (CAT) در بافت کبد

فعالیت این آنزیم توسط کیت اندازه گیری خریداری شده از کمپانی Cayman, USA و طبق پروتوکل کیت انجام می شود. در این کیت برای اندازه گیری فعالیت کاتالاز از فعالیت پراکسیدازی آن استفاده شده است. در این روش، آنزیم کاتالاز در حضور مقادیر کافی از H_2O_2 با متانل واکنش می دهد و فرمالدهید تولید شده توسط یک ترکیب کروموزن اندازه گیری می شود. جذب چاهکها در ۵۴۰ نانومتر قرائت گردید.

۴-۵-۲- اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پلاسما (آزمون FRAP) (Benzie & Strain, 1996)

در این روش غلظت های مختلف از محلول استاندارد یون آهن Fe^{+2} با استفاده از محلول ذخیره آهن ۱۰۰۰ میکرو مولار تهیه می شود، سپس ۱۰ میلی لیتر از محلول کار FRAP در یک لوله آزمایش ریخته و ۵۰ میکرو لیتر از نمونه استاندارد و نمونه مجهول به آن افزوده می شود. پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در دمای $37^{\circ}C$ ، جذب نوری کلیه نمونه ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر در مقابل بلانک (غلظت صفر استاندارد) قرائت می گردد و میزان FRAP در نمونه های مجهول براساس منحنی استاندارد محاسبه می شود.

۲-۵- آنالیز آماری

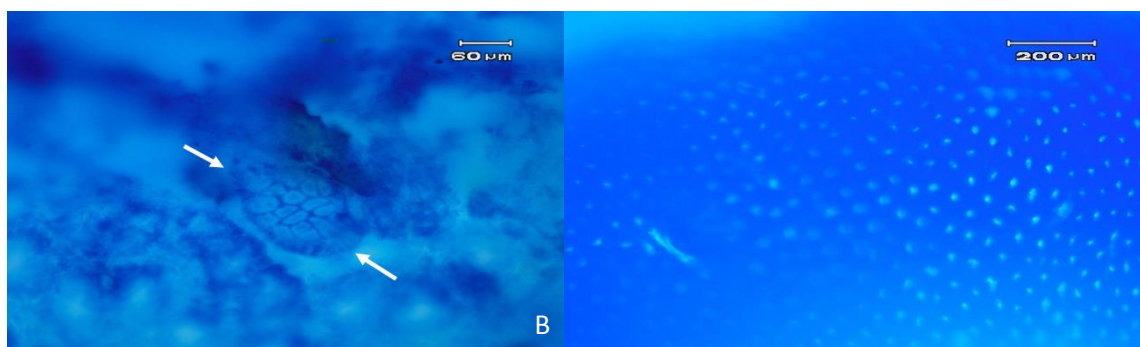
برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS ویرایش ۱۵ استفاده گردید. نتایج به دست آمده از این تحقیق توسط آزمون واریانس یک طرفه (One way-ANOVA) و به دنبال آن با استفاده از آزمون تعقیبی توکی مقایسه شدند. نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار (برای هر تست بیوشیمیایی ۳ تکرار در نظر گرفته شد) گزارش شدند و مقایسه میانگین داده ها در سطح آماری $P < 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد. علامت a بیانگر تفاوت معنی دار گروه DMH با گروه کنترل می باشد و علامت b بیانگر تفاوت معنی دار گروه های مختلف تیمار شده با اسانس و پودر زیره سیاه با گروه DMH می باشد.

۳- نتایج

۳-۱- تایید ایجاد سرطان کولون توسط دی متیل هیدرازین

مشاهده کریپت های (غدد روده ای) نابجا (AC) و تجمع کانونی آنها (ACF) در بررسی های هیستوپاتولوژیک، نشان دهنده القاء سرطان کولون می باشد. بررسی مشاهدات میکروسکوپی نشان می دهد که در گروه تیمار شده با DMH، کریپت های نابجا (AC) ۲ تا ۳ برابر بزرگتر از کریپت های نرمال اطرافشان هستند و دهانه شکاف خورده دارند (شکل ۱- A و B). در این گروه، بافت اپیتلیال کولون ضخیم ترند و نسبت به گروه کنترل (گروه ۱) رنگ متیلن بلو را بیشتر به خود می گیرند و نواحی اطراف

کریپت نیز در این گروه بزرگتر می‌شوند. در گروه تیمار شده با DMH به طور میانگین حدود ۸ عدد ACF مشاهده می‌شود که هر یک شامل ۴ عدد AC یا بیشتر در هر کانون می‌باشند (جدول ۱).



شکل ۱: ایجاد ACF در اثر تیمار با DMH (A: نمای توپوگرافیک از یک کریپت نرمال کولون (متیلن بلو×۱۰۰) (B) نمای توپوگرافیک از یک ACF (فلش‌ها) (متیلن بلو×۲۰۰) (Dadkhah et al., 2014)

پس از تیمار حیوانات با غذای حاوی اسانس و پودر زیره سیاه (گروه ۳ و ۴)، اندازه کانون‌های کریپت‌های نابجا (ACF) کوچکتر شده و هر کانون (ACF) شامل ۲ تا ۳ کریپت نابجا (AC) در مرکز خود می‌باشد. این نکته قابل ذکر است که تغییر شکل بافتی که نشانگر ضایعات پیش سرطانی در ضایعات مذکور است (دیسپلازی)، آدنوم و یا آدنوکارسینوم در بافت کولون رت‌های تحت تیمار در هیچکدام از گروه‌ها دیده نمی‌شود.

آنالیز کمی تعداد ACF و AC، نسبت AC/ACF و درصد مهار ACF در تمام گروه‌های مورد مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمار حیوانات با اسانس زیره سیاه (۰.۲ درصد) منجر به کاهش معنی دار ($P < 0.05$) تعداد ACF در بافت کولون می‌گردد (جدول ۱). درصد مهار ACF توسط اسانس و پودر زیره به ترتیب ۶۵٪ و ۸۰٪ می‌باشد. تعداد AC و نسبت AC/ACF نیز در هر دو گروه تیمار کاهش می‌یابد ($P < 0.05$).

جدول ۱: اثر اسانس و پودر زیره سیاه بر روی ایجاد ACF (Dadkhah et al., 2014)

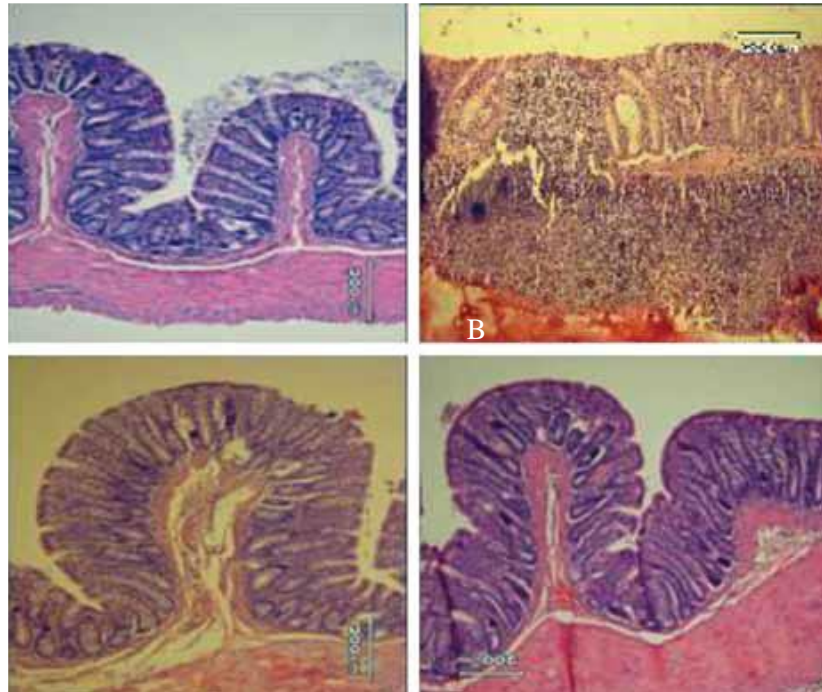
گروه‌ها	تعداد ACF	تعداد AC	نسبت AC/ACF	درصد مهار ACF
کنترل	۰	۰	۰	-
DMH	8 ± 2.2^a	6 ± 3^a	0.84 ± 0.1^a	-
DMH + ۰.۲٪ اسانس	2.8 ± 0.5^b	0 ± 0^b	0^b	۶۵ ^b
DMH + ۰.۲٪ پودر	1 ± 0.4^b	1 ± 0^b	1 ± 1^b	۸۰ ^b

مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار ($M \pm SEM$) گزارش شده‌اند. علامت a نشان دهنده تفاوت معنی‌دار گروه DMH با گروه کنترل می‌باشد ($P < 0.05$). علامت b نشان دهنده

تفاوت معنی‌دار گروه‌های مختلف تیمار با گروه DMH می‌باشد.

۳-۲- مشاهدات هیستوپاتولوژی تومورهای کولون القاء شده توسط دی متیل هیدرازین

در بافت کولون رت‌ها در گروه کنترل (گروه ۱)، غدد لیبرکون نرمال همراه با لایه‌های مخاطی و زیر مخاطی طبیعی مشاهده می‌شود (شکل ۲-ا). در این گروه، از لحاظ میکروسکوپی هیچ نوع نشانه‌ای از تشکیل ACF مشاهده نگردید. همچنین تغییرات نئوپلاستیک در این حیوانات به چشم نمی‌خورد. مطالعات هیستوپاتولوژی نشان داد که ACF فقط در بافت کولون در گروه تیمار شده با عامل سرطانزا (DMH) ایجاد گردیده‌است. همچنین ساختار غیر طبیعی و دیسپلازی در غدد لیبرکون نیز قابل مشاهده‌است. در این گروه، تهاجم سلول‌های سرطانی به لایه‌های عضلانی مشاهده می‌شود و ساختارهای شبیه به غدد سازمان یافته قابل ردیابی است. این گروه بافت اپیتلیال کولون ضخیم‌تری دارد به طوری که رنگ متیلن بلو را بیشتر به خود می‌گیرند (شکل ۲-ب). در گروه‌های تیمار (گروه‌های ۴ و ۳)، بافت کولون دارای مخاط طبیعی همراه با تجمع لنفوسیت‌ها می‌باشد. در این گروه‌ها غشای پایه و ماهیچه مخاطی تغییر قابل توجهی نداشته‌است. اندازه و شکل سلول‌ها نیز یکسان می‌باشد. بررسی‌های هیستوپاتولوژیک نشان داده‌اند که در این گروه‌ها تغییراتی در شکل و اندازه هسته‌ها و جهت و نحوه استقرار آنها نسبت به سلول‌ها و نسبت به یکدیگر ایجاد نشده بود (شکل ۲-ب و د). در مقایسه با گروه تیمار شده با DMH (گروه ۲) تعداد سلول‌ها در کریپت‌های نرمال (ارتفاع کریپت) کاهش یافته‌است. از نظر آسیب شناسی، این گروه‌ها تقریباً همه AC ها دارای مورفولوژی هسته‌ای نسبتاً نرمال هستند و فاقد تغییرات غیرطبیعی در هسته می‌باشند که به عنوان ACF هیپرپلاستیک قلمداد می‌شوند. در این گروه‌ها، آثاری از تشکیل AC ها مشاهده نمی‌شود که دارای تغییرات غیرطبیعی در هسته خود می‌باشند (ACF دیسپلاستیک) و غشای پایه نیز در هیچکدام از گروه‌ها آسیب ندیده‌است. مناطق محدودی از لایه مخاطی، ضخیم شده‌اند که همراه با نفوذ پراکنده از سلول‌های التهابی در لایه مخاطی می‌باشند. ذکر این نکته ضروری است که در تمام گروه‌های مورد مطالعه، سلول‌های paneth در اپیتلیوم AC ها به ندرت یافت می‌شوند. در هیچکدام از گروه‌ها، اثری از تهاجم و دست‌اندازی سلول‌های اپی‌تلیال به غشای پایه و لایه ماهیچه مخاطی وجود ندارد. در بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی مشخص شد که هیچ توموری در هیچکدام از گروه‌های مورد مطالعه در طول دوره تیمار (۱۶ هفته) ایجاد نشده‌است.

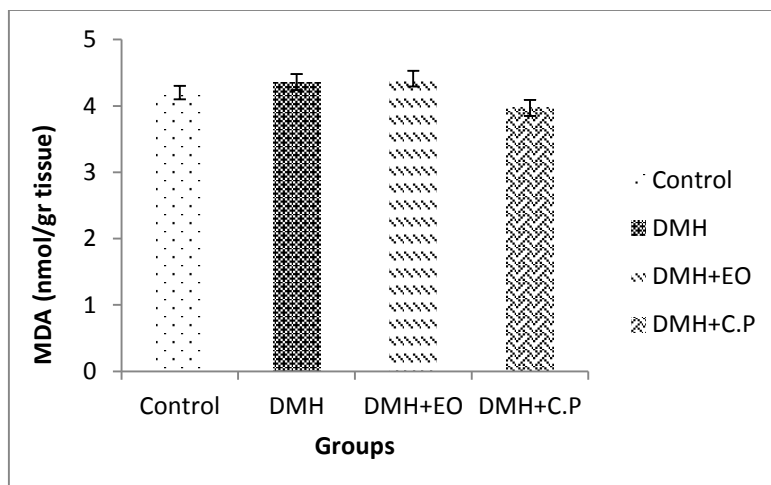


شکل ۲: (A) نمای میکروسکوپی از کولون نرمال (B) نمایی از کولون گروه تیمار شده با DMH (C) سیمای میکروسکوپی از بافت کولون رت‌های تیمار شده با اسانس زیره سیاه (D) سیمای میکروسکوپی از بافت کولون رت‌های تیمار شده با پودر زیره سیاه (Dadkhah *et al.*, 2014)

۳-۳- تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی سطح پراکسیداسیون چربیها (LP)

نمودار ۳-۱ نشان می‌دهد که تزریق DMH بر روی میزان پراکسیداسیون چربی‌ها تاثیری ندارد ($P > 0.05$), و همچنین

استفاده از پودر و اسانس زیره سیاه تغییری در این پارامتر ایجاد نمی‌کند ($P > 0.05$).

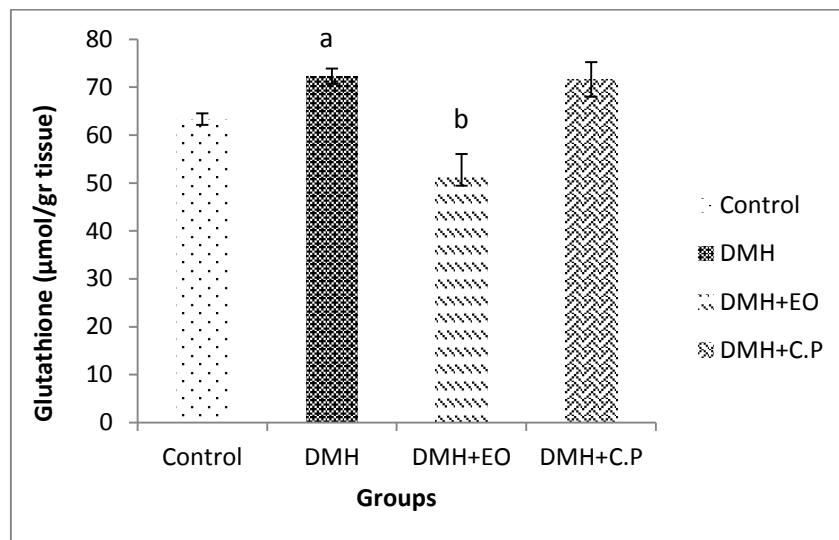


نمودار ۳-۱: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی سطح MDA در کبد رت‌های تیمار شده با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O (essential oil): دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، (caraway powder) DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه.

۳-۴- تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه بر روی سطح گلوتاتیون احیاء (GSH)

نمودار زیر نشان می دهد که تزریق DMH به حیوانات باعث افزایش معنی دار در میزان GSH بافت کبد می گردد ($P < 0.05$) و تیمار رت‌ها با اسانس زیره سیاه باعث کاهش قابل ملاحظه‌ای در سطح GSH بافت کبد گردیده است ($P < 0.05$). حالیکه تیمار با پودر زیره سیاه هیچ تاثیری بر روی سطح GSH ندارد ($P > 0.05$) (نمودار ۳-۲).

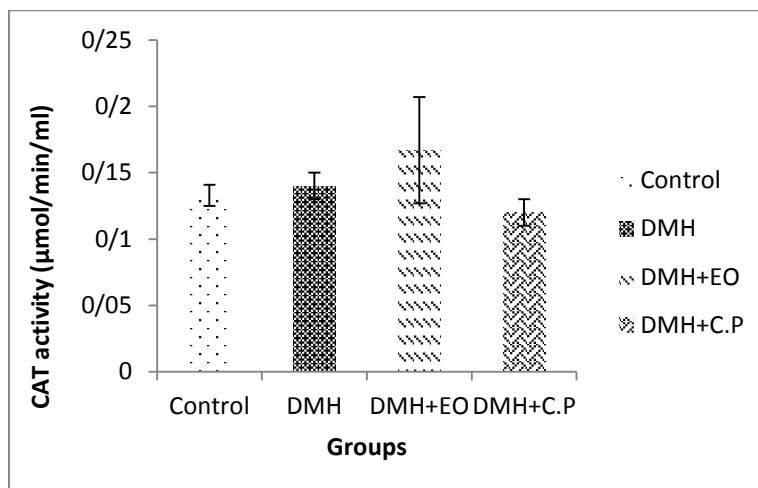


نمودار ۳-۲: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی مقدار GSH در کبد رت‌ها تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین + اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین + پودر زیره سیاه. علامت a نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه DMH نسبت به گروه کنترل می باشد ($P < 0.05$). علامت b نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه های تیمار نسبت به گروه DMH می باشد ($P < 0.05$).

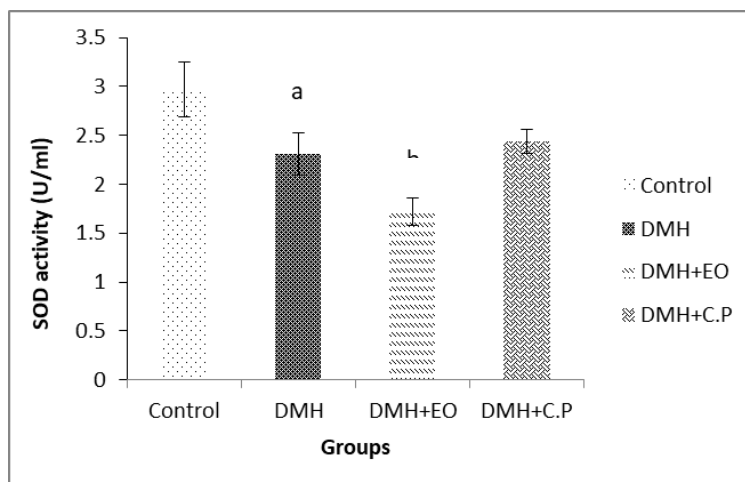
۳-۵- تاثیر پودر و اسانس زیره روی فعالیت آنزیم های سوپر اکسید دسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT)

نمودار ۳-۳ نشان می دهد که تزریق دی متیل هیدرازین تغییری در میزان فعالیت آنزیم CAT ایجاد نکرد و تغذیه رت‌ها با غذای حاوی پودر و اسانس زیره سیاه نیز اثری بر روی فعالیت آنزیم مذکور در بافت کبد نداشته است ($P > 0.05$) (نمودار ۳-۳). همچنین، میزان فعالیت آنزیم آنتی اکسیدانی SOD بافت کبد در گروه تیمار شده با DMH به تنهایی کاهش معنی داری دارد ($P < 0.05$) و تیمار رت‌ها با غذای حاوی اسانس و پودر زیره سیاه هیچ گونه تغییری معنی داری بر فعالیت SOD نشان نداد (نمودار ۳-۴).



نمودار ۳-۳: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی فعالیت CAT در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه)



نمودار ۳-۴: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی فعالیت SOD در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

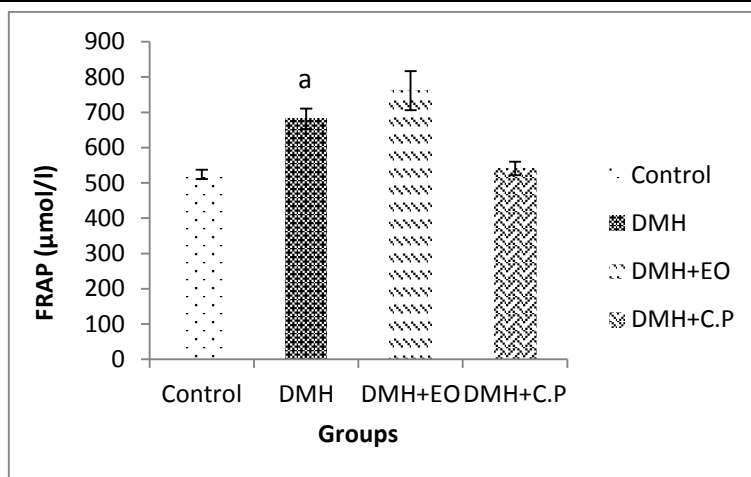
مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه. علامت a نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه DMH نسبت به گروه کنترل می باشد ($P < 0.05$). علامت b نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه های تیمار نسبت به گروه DMH می باشد ($P < 0.05$).

۳-۶- تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه بر روی سطح آنتی اکسیدانی توتال پلاسما (FRAP)

میزان آنتی اکسیدانی توتال پلاسما، در گروهی از رت‌ها که تنها ماده سرطان زای DMH دریافت کردند، افزایش معنی

داری داشته است ($P < 0.05$). ولی تیمار رت‌ها با پودر و اسانس زیره سیاه هیچ گونه تغییری را در سطح FRAP پلاسما ایجاد

نکرده است ($P > 0.05$) (نمودار ۳-۵).



نمودار ۳-۵: تاثیر پودر و اسانس زیره سیاه روی مقدار FRAP در کبد رت‌های تحت تیمار با DMH.

مقادیر بر اساس میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. DMH: دی متیل هیدرازین، DMH+E.O: دی متیل هیدرازین+ اسانس زیره سیاه، DMH+C.P: دی متیل هیدرازین+ پودر زیره سیاه. علامت a نشان دهنده معنی دار بودن نتایج در گروه DMH نسبت به گروه کنترل می باشد ($P < 0.05$).

۴- بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعات *in vivo* نشان می دهد که تغذیه رت‌ها با غذای حاوی اسانس و پودر زیره سیاه به طور موثری باعث کاهش تعداد ACFها می شود که آسیب های پیش سرطانی بافت کولون، طی فرایند سرطانزایی القاء شده توسط DMH هستند. مطالعات قبلی نیز نشان داده اند که زیره سیاه یکی از گیاهان دارویی سنتی می باشد که دارای اثرات درمانی مختلف از جمله اثرات ضد سرطانی است (Kamaleeswari *et al.*, 2006; Deeptha *et al.*, 2006). برای اولین بار در سال ۲۰۰۶ اثرات ضد سرطانی زیره در موش تغذیه شده با دانه های زیره پودر شده به طور همزمان با تزریق DMH مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که تغذیه حیوانات با پودر زیره منجر به کاهش تعداد ACF ایجاد شده توسط DMH در بافت کولون می شود (Kamaleeswari *et al.*, 2006; Deeptha *et al.*, 2006). با وجود این تحقیقات، در مورد مقایسه اثرات ضد سرطانی اسانس و پودر به دست آمده از دانه های زیره سیاه و به ویژه مکانیسم احتمالی خواص ضد سرطانی آن _ از طریق تغییرات در سیستم دفاع استرس اکسیداتیو و آنتی اکسیدانی _ مطالعه ای صورت نگرفته است. به همین دلیل در این تحقیق، نقش اسانس و پودر به دست آمده از دانه های زیره سیاه در تعادل سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در مدل سرطان کولون القاء شده توسط DMH در رت مورد بررسی قرار گرفته است.

DMH یک ماده سرطان زای محیطی است که پس از تزریق ابتدا در کبد توسط آنزیم سیتوکروم P450 متابولیزه می شود و متابولیت فعالی به نام متیل دیازونیوم تولید می کند (Rijnkels & Alink, 1998; Fiala *et al.*, 1987)، این متابولیت فعال همانند دیگر رادیکال های آزاد دارای اثرات القاء کننده استرس اکسیداتیو هستند به گونه ای که باعث افزایش پارامتر دخیل در استرس اکسیداتیو و کاهش عوامل آنتی اکسیدانی می شود. دیگر مطالعات نیز اختلال آنتی اکسیدانی در حیوانات تیمار شده با

DMH را نشان می‌دهد، به عنوان مثال مطالعه ای نشان داده‌است که تزریق DMH به رت با دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به مدت ۱۵ هفته باعث کاهش فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دسموتاز (SOD)، در بافت کبد حیوانات شده‌است (Devasena *et al.*, 2002). همچنین مطالعه ای نشان داده است که تیمار رت‌ها با DMH در دوز ۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلو گرم وزن بدن به مدت ۱۵ هفته باعث افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های کاتالاز (CAT)، سوپراکسید دسموتاز (SOD) در پلاسمای رت‌ها می‌گردد (Sengottuvelan *et al.*, 2006; Deeptha *et al.*, 2006; Manju & Nalini, 2005). داده‌های این تحقیق، وجود ACF و در نتیجه القاء سرطان کولون در رت‌های مورد مطالعه را تایید می‌کند. همچنین، نتایج تحقیقات ما نشان می‌دهد که تیمار حیوانات با DMH با تغییر در پارامترهای دخیل در فرآیند استرس اکسیداتیو همراه می‌باشند (نمودارهای 2-3، 3-4، 3-5)، به گونه ای که همزمان با تغییر در میزان تشکیل ACF، تعادل سطح فاکتورهای دخیل در سیستم دفاع آنتی اکسیدانی در بافت کبد از جمله سوپر اکسید دسموتاز (SOD)، گلوتاتیون (GSH) و ظرفیت آنتی اکسیدانی توتال پلاسما (FRAP) به هم می‌خورد، این امر به هم خوردن هموستاز سیستم دفاع آنتی اکسیدانی را نشان می‌دهد. عدم تغییر در میزان TBARS (به عنوان شاخص پراکسیداسیون لیپیدهای غشاء) در بافت کبد رت‌های تیمار شده با DMH نشان‌دهنده عدم دخالت مستقیم فرآیند پراکسیداسیون لیپیدها در تشکیل ACF/AC در بافت کولون می‌باشند. از سوی دیگر افزایش سطح گلوتاتیون همراه با FRAP در رت‌های تیمار شده با DMH نشان‌دهنده القاء پذیری این فاکتورها است، بدین صورت که افزایش سطح آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی (GSH در کبد و FRAP در پلاسما) در پاسخ به DMH منجر به افزایش مقاومت و یا کاهش آسیب‌پذیری بافت کبد به حمله رادیکال‌های آزاد می‌گردد (Manju & Nalini, 2005). بنابراین، نقش دو عامل آنتی اکسیدانی GSH و FRAP_ در مهار افزایش LP را نمی‌توان نادیده گرفت. از سوی دیگر صرف نظر از قدرت آنتی اکسیدانی GSH، افزایش میزان گلوتاتیون سلولی در بافت کبد رت‌های حامل ACF دلالت بر نقش موثر آن به عنوان یک فاکتور انتخابی رشد سلول‌های سرطانی است که منجر به تکثیر سلول‌های سرطانی می‌گردد (Manju & Nalini, 2005).

عوامل مهارکننده طبیعی سرطان از جمله گیاهان دارویی، دارای اثرات درمانی قابل توجهی بر روند ایجاد سرطان هستند. تاثیر اسانس و پودر زیره سیاه بر روی تشکیل AC و ACF در سرطان کولون القاء شده توسط DMH پس از ۱۶ هفته قابل توجه می‌باشد. نتایج این مطالعه به وضوح نشان می‌دهد در میزان تشکیل ACF و AC در گروه‌های تیمار شده با DMH به تنهایی و گروه‌های تیمار شده با DMH و پودر و اسانس زیره سیاه، تفاوت معنی داری وجود دارد (جدول ۱) که نشان دهنده تاثیر اسانس و پودر در کاهش تعداد ACF و AC می‌باشد. مکانیسمی که اسانس و پودر زیره باعث مهار تشکیل ACF می‌شود، احتمالاً بخشی از آن به دلیل برگشت تعدادی از ACF‌ها به حالت نرمال و یا کاهش تکثیر سلولی در گروه‌های تیمار شده با زیره می‌باشد (شکل ۲-c). مطالعات دیگران نیز نتایج ما را مورد تایید قرار می‌دهد، برای مثال مصرف خوراکی (۸ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) ترکیبی به نام resveratrol (نوعی پلی فنل که از انگور استخراج شده است)، روزانه به مدت ۱۵ هفته،

باعث کاهش معنی دار تعداد ACF القاء شده توسط DMH در بافت کولون رت‌ها شده‌است. در این مطالعه، القاء سرطان همراه با کاهش سطح گلوکوتاتیون و مهار فعالیت آنتی اکسیدان کاتالاز، SOD، GST تحت تاثیر DMH در روده کوچک و بزرگ بوده و مصرف خوراکی resveratrol منجر به برگشت سطح پارامترهای فوق به حد گروه کنترل شده‌است (Sengottuvelan *et al.*, 2006). همچنین مصرف زنجبیل به صورت خوراکی (۵۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) روزانه به مدت ۱۵ هفته توسط رت‌ها باعث کاهش تعداد و اندازه تومورهای القاء شده توسط DMH در کولون گردیده‌است. در این تحقیق مشخص شده‌است که تزریق DMH به صورت زیر پوستی (۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به مدت ۱۵ هفته منجر به افزایش سطح فاکتورهای مرتبط با استرس اکسیداتیو نظیر لیپید هیدروپراکسید و پراکسیداسیون لیپیدها و مهار فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدان (کاتالاز، SOD، گلوکوتاتیون پراکسیداز و گلوکوتاتیون ردوکتاز) و همچنین کاهش سطح آنتی اکسیدان‌های غیر آنزیمی نظیر GSH و ویتامین‌های A و C و E شده‌است. مصرف خوراکی زنجبیل علاوه بر کاهش اندازه و تعداد تومورها منجر به برگشت سطح پارامترهای فوق‌الذکر به سطح آنها در گروه کنترل شده‌است (Manju & Nalini, 2005). همچنین تیمار رت‌ها با اسانس سیاه دانه (۲۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن) به صورت خوراکی روزانه به مدت ۱۴ هفته باعث مهار روند ایجاد سرطان کولون توسط DMH و کاهش معنی دار تعداد ACF در این حیوانات می‌گردد (Salim & Fukushima, 2003).

در تحقیق حاضر، نحوه تاثیر اسانس و پودر زیره سیاه بر روی پارامترهای دخیل در استرس اکسیداتیو و سیستم آنتی اکسیدانی در رت‌های تیمار شده نشان می‌دهد که این دو تیمار تاثیری در سطح فاکتورهای استرس اکسیداتیو و نیز سیستم دفاع آنتی اکسیدانی نظیر SOD، CAT، LP، FRAP، در بافت کبد و پلاسما ندارد (نمودارهای 1-3، 3-3، 3-4، 3-5). البته اسانس زیره قادر است افزایش سطح GSH توسط DMH را جبران کند (نمودار 2-3) که این امر احتمالاً نشان دهنده اثر زیره در کاهش و یا توقف تکثیر سلولی می‌باشد (Manju & Nalini, 2005). همچنین کاهش میزان GSH توسط اسانس می‌تواند نشان دهنده سم زدایی فعال متابولیت فعال DMH توسط آنزیم GST از طریق اتصال آن با GSH باشد. در پایان این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس و پودر دانه زیره سیاه دارای اثرات ضد سرطانی در مقابل آسیب‌های اولیه سرطان ناشی از DMH در بافت کولون می‌باشد. عدم تغییر در پارامترهای آنتی اکسیدانی، نشان می‌دهد این اثرات از طریق تعدیل سیستم دفاع استرس اکسیداتیو/آنتی اکسیدانی نبوده و احتمالاً سیستم متابولیزه کننده DMH در این امر موثر می‌باشند که با نتایج مطالعات پیشین کاملاً مطابقت دارد (Dadkhah *et al.*, 2014). البته مطالعات بیشتری مورد نیاز است تا مکانیسم دقیق اثرات ضدسرطانی اسانس زیره در جلوگیری از روند ایجاد سرطان توسط DMH در بافت کولون مشخص گردد. بدین ترتیب با روشن تر شدن مکانیسم دقیق اثرات ضد سرطانی اسانس زیره سیاه، می‌توان در آینده از این ترکیب و ترکیبات گیاهی و طبیعی دیگر در پیشگیری و درمان سرطان استفاده کرد.

منابع

- Ansari, R., Mahdavinia, M., Sadjadi, A., Nourai, M., Kamangar, F., Bishehsari, F., Fakheri, H., Semnani, S., Arshi, S., Zahedi, M.J., Darvish-Moghadam, S., Mansour-Ghanaei, F., Mosavi, A., Malekzadeh, R. (2006). Incidence and age distribution of colorectal cancer in Iran: Results of a population-based cancer registry. *Cancer Lett*, 18; 240 (1):143-7.
- Attaran, H.R., Fatemi, F., Rasooli, A., Dadkhah, A., Mohammadi Malayeri, M.R., Dini, S. (2018). Zataria multiflora essential oil prevent iron oxide nanoparticles-induced. Liver Toxicity in Rat Model. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 1: 15-24.
- Attaran, H.R., Dini, S., Fatemi, F., Hesaraki, S., Parhizkarie, M., Dadkhaha, A. (2015). Hepatoprotective Evaluation of Iranian Satureja Rechingeri Essential Oils against Oxidative Injuries Induced by Acetaminophen in Wistar Rats. *Int. J. Rev. Life. Sci.*, 5: 204-210.
- Benzie, I.F.F and Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem*, 239: 70-76.
- Bird, R.P. (1987). Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings. *Cancer Lett*, 37: 147-151.
- Bobek, P. and Galbavy, S. (2001). Influence of insulin on dimethylhydrazine induced carcinogenesis and antioxidant enzymatic system in rat. *Biologia*, 56: 287-291.
- Colussi, C., Fiumicino, S., Giuliani, A., Rosini, S., Musiani, P., Macrí, C., et al. (2001). 1, 2-Dimethylhydrazine-induced colon carcinoma and lymphoma in msh2 (-/-) mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 93: 1534-40.
- Dadkhah A, Fooladvand M, Fatemi F, Ashrafi-Helan J. (2014). Chemopreventive effects of caraway powder and oils to suppress 1, 2- dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Turk J Biochem*, 39(3): 260-269.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., Mohammadi Malayeri, M.R., Torabi, F., Sarbazi, M., Dini, S. (2018). Potential protective effect of pretreatment with caraway essential oil in vivo model of iron nanoparticle-induced liver injury. *Journal of Medicinal Plants and By-products*, 2: 145-152.
- Dadkhah, A., Khalaj, Gh., Fatemi, F., Dini, S., Najj, S. Fadaee Monfared, M. (2016). Considering the effect of Golpar (*Heracleum Persicum*) essential oils on the acute hepatotoxicity induced by acetaminophen in Wistar rats. *Journal of animal research*, 29: 292-306.
- Dadkhah, A., Fatemi, F., Mohammadi Malayeri, M. R., Karvin Ashtiani, M. H., Mosavi, Z., Najj, S., Dini, S., Ghorbani, N. (2020). The Anti-inflammatory and Antioxidant Effects of *Rosa damascena* Mill. Essential Oil on the Lung Injury in the CLP Model. *Journal of Medicinal Plants*, in press.
- Deeptha, K., Kamaleeswari, M., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2006). Dose dependent inhibitory effect of dietary caraway on 1,2-dimethylhydrazine induced colonic aberrant crypt foci and bacterial enzyme activity in rats. *Invest New Drugs*, 24: 479-488.
- Devasena, T., Rajasekaranb, K.N., Menona, V.P. (2002). Bis-1,7-(2-Hydroxyphenyl)-Hepta-1,6-Diene- 3,5-dione (A Curcumin Analog) ameliorates DMH-Induced hepatic oxidative stress during colon carcinogenesis. *Pharmacol Res*, 46: 39-45.
- Druckrey, H. (1970). Production of colonic carcinomas by 1,2-dialkylhydrazines and azoxyalkanes. In: Burdette WJ, ed. *Carcinoma of the colon and antecedent epithelium*. Springfield, IL: Charles C. Thomas 267-279.
- Eddouks, M., Lemhadri, A., Michel, J.B. (2004). Caraway and caper: potential anti-hyperglycaemic plants in diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 94: 143-148.
- Fatemi, F., Dadkhah, A., Akbarzadeh, K., Dini, S., Hatami, S., Rasooli, A. (2015). Hepatoprotective Effects of Deuterium Depleted Water (DDW) Adjuvant with *Satureja rechingeri* Essential Oils. *Electronic Journal of Biology*, 11(2):23-32.

- Fiala, E.S., Sohn, O.S., Hamilton, S.R. (1987). Effects of chronic dietary ethanol on the in vivo and in vitro metabolism of methylazoxymethanol and methylazoxymethanol induced DNA methylation in the rat colon and liver. *Cancer Res*, 47: 5939-43.
- Gottesman, M., Fojo, T., Bates, S.E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP dependent transporters. *Nat Rev Cancer*, 2: 48-58.
- Harriss, D.J., Atkinson, G., Batterham, A., George, K., Cable, N.T., Reilly T., Haboubi, N., Renehan, A.G. (2009). Colorectal Cancer, Lifestyle, Exercise and Research, Group. "Lifestyle factors and colorectal cancer risk (2): a systematic review and meta-analysis of associations with leisure-time physical activity". *Colorectal disease: the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland* 11: 689-701.
- Jackson, P.E., O'Connor, P.J., Cooper, D.P., Margison, G.P., Povey, A.C. (2003). Associations between tissue-specific DNA alkylation, DNA repair and cell proliferation in the colon and colon tumour yield in mice treated with 1,2-dimethylhydrazine. *Carcinogenesis*, 24: 527-33.
- Kamaleeswari, M., Deeptha, K., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2006). Effect of dietary caraway (*Carum carvi* L.) on aberrant crypt foci development, fecal steroids, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2-dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol* 214: 290-96.
- Lemhadri, A., Hajji, L., Michel, J.B., Eddouks, M. (2006). Cholesterol and triglycerides lowering activities of caraway fruits in normal and streptozotocin diabetic rats. *J Ethnopharmacol*, 106: 321-326.
- Manju, V and Nalini, N. (2005). Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine induced colon cancer. *Clin Chim Acta*, 358: 60-67.
- Mohammadi Malayeri, MR., Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini, S., Torabi, F., Tavajjoh, MM., Rabiei, J. (2016). Chemotherapeutic effect of *Berberis integerrima* hydroalcoholic extract on colon cancer development in the 1,2-dimethyl hydrazine rat model. *Z Naturforsch C J Biosci*, 71: 225-32.
- Rijnkels, J.M and Alink, G.M. (1998). Effects of a vegetables-fruit mixture on liver and colonic 1,2-dimethylhydrazine-metabolizing enzyme activities in rats fed low- or high-fat diets. *Cancer Lett*, 128: 171-5.
- Rustgi, A.K. (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*, 21: 2525-2538.
- Roshanaei, K., Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini S. (2017a). The Protective Effects of Iranian Golpar (*Heracleum persicum*) Essential Oil in Liver Damages Induced by CCl₄ in Wistar Rats. *Journal of Medicinal Plants*. 1:110-122.
- Roshanaei, K., Dadkhah, A., Fatemi, F., Dini, S. (2017b). *Heracleum persicum* Essential oil administration in CCL₄ treated Rat sustains antioxidant / oxidative stress statue. *Advances in Bioresearch*. 8: 93-101.
- Salim, E.I and Fukushima, S. (2003). Chemopreventive potential of volatile oil from black cummin (*Nigella sativa* L.) seeds against rat colon carcinogenesis. *Nutr Cancer*, 45: 195-202.
- Sengottuvelan, M., Senthilkumar, R., Nalini, N. (2006). Modulatory influence of dietary resveratrol during different phases of 1,2-dimethylhydrazine induced mucosal lipid-peroxidation, antioxidant status and aberrant crypt foci development in rat colon carcinogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760: 1175-1183.
- Smith, G., Carey, F.A., Beattie, J., Wilkie, M.J.V., Lightfoot, T.J., Coxhead, J., et al. (2002). Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—alternative genetic pathways to colorectal cancer. *PNAS*, 99: 9433-9438.
- Srihari, T., Sengottuvelan, M., Nalini, N. (2008). Dose-dependent effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) on lipid peroxidation and antioxidant status in 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. *J Pharm Pharmacol*, 60: 787-94.
- Swan, D.K and Ford, B. (1997). Chemoprevention of cancer. Review of the literature. *Oncology Nursing Forum*, 24: 719-727.

-
- Tenesa, A., Dunlop, M.G. (2009). New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat Rev Genet*, 10: 353-358.
- Torabi, F., Dadkhah A., Fatemi, F., Dini, S., Taghizadeh, M., Mohammadi Malayeri, MR. (2015). Prevention and therapy of 1,2-dimethyl hydrazine induced colon carcinogenesis by *Ferula assa-foetida* hydroalcoholic extract. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40: 390-400.

Effects of *Carum carvi* L. on Antioxidant status and oxidative stress parameters in rats exposed to 1, 2-dimethyl hydrazine

A. Dadkhah^{1*}, F. Fatemi², S. Dini^{3,4}

Received: 2017.05. 8

Accepted: 2018.11.11

Abstract

In the current study, the effect of usage of caraway powder and its essential oils at the dose of 0.2% (w/w) were studied on colon cancer prevention induced by dimethyl hydrazine (DMH) through the estimation of biochemical parameters including catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes, glutathione (GSH), lipid peroxidation (LP) and ferric reducing ability of plasma (FRAP) as well as histopathological changes. The results showed that the levels of GSH and FRAP were increased and SOD activity was decreased by DMH. Even though caraway powder and its essential oils failed to alter the tested biochemical parameters, histopathological analysis indicated improved effects in carcinogenesis. Therefore, the results demonstrated that the chemopreventive effects of the treatments were due to the other metabolic pathways than oxidative stress/antioxidant systems.

Key words: Colon cancer, *Carum carvi* L., Oxidative stress, Dimethyl hydrazine.

¹Department of Medicine, Faculty of Medicine, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

*(Corresponding Author: dadkhah_bio@yahoo.com)

²Materials and Nuclear Fuel Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

³Young Researchers and Elite Club, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran

⁴ College of Biosystems Engineering and Food Science, National-Local Joint Engineering Laboratory of Intelligent Food Technology and Equipment, Zhejiang Key Laboratory for Agro-Food Processing, Zhejiang R & D Center for Food Technology and Equipment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China