

## بررسی اثر ژل رویال بر رشد فیبروسارکوما در موش سوری

دکتر بهنام زمان زاد\*، دکتر هدایت اله شیرزاد\*\*، نجمه شاهین فرد\*\*\*، مریم شیرزاد†

رحیمه کرد یزدی††

\*دانشیار گروه میکروبیولوژی - مرکز تحقیقات سلولی، مولکولی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*دانشیار گروه ایمونولوژی - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، \*\*\*کارشناس مامایی - مرکز تحقیقات گیاهان دارویی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، †کارشناس ارشد زبان انگلیسی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، ††پزشک عمومی - دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد.

تاریخ دریافت: ۱۷/۹/۶ تاریخ تایید: ۱۷/۱۱/۱۲

### چکیده:

**زمینه و هدف:** فیبروسارکوم توموری است که از سلول های فیروپلاست بدخیم و در یک زمینه کلاژن می باشد که روش های درمانی آن عوارض زیادی برای بیماران دارد. ژل رویال یکی از موادی است که در تقویت سیستم ایمنی موثر می باشد. مطالعه حاضر با هدف تعیین تاثیر ژل رویال بر فیبروسارکومای WEHI-164 در موش های سوری انجام گردید.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۴ گروه ۷ سری از موش های سوری نژاد Balb/c انجام شد. سلول توموری فیبروسارکوما WEHI-164 از انستیتو پاستور تهران تهیه و در زیر پوست ناحیه سینه موش ها تزریق گردید. سپس به هر کدام از گروه ها، بجز گروه کنترل، قبل از تزریق سلول های توموری و بعد از آن به طور روزانه ژل رویال با غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/kg از طریق دهانی خوراندند. اندازه تومور با استفاده از کولیس در روزهای ۱۷، ۱۳، ۱۱، ۹، ۷، ۵ و ۱۷ ثبت و با استفاده از آزمون های آماری من ویتنی و کروسکال والیس مقایسه گردیدند.

**یافته ها:** نتایج این بررسی نشان داد که میانگین اندازه تومور در روزهای ۱۵، ۱۳، ۱۱ و ۱۷ در گروه مورد کمتر از گروه کنترل بود ( $P < 0/05$ ). در هر دو گروه کنترل و مورد متاستازی مشاهده نشد.

**نتیجه گیری:** ضمن تاکید بر خواص ضد توموری ژل رویال به نظر می رسد که ژل رویال نقش مهمی در کنترل و پسرقت فیبروسارکوما دارد. با توجه به اثر تاخیری ژل رویال در کنترل فیبروسارکوم در این مطالعه، پیشنهاد می شود در مطالعات مشابه حداقل ۱۰ روز قبل از تزریق سلول سرطانی از ژل رویال استفاده شود.

واژه های کلیدی: فیبروسارکوم، ژل رویال، موش سوری.

### مقدمه:

باعث مرگ سلول های سرطانی می شود (۳-۱). تمام روش های درمانی از جمله جراحی، قطع اندام، پرتودرمانی و شیمی درمانی عوارض زیادی از جمله ریزش مو، تهوع، استفراغ، خارش پوست، افزایش احتمال عفونت بدنبال تضعیف سیستم ایمنی دارند در حالی که روش های بیولوژیکی غیر تهاجمی و موثر می باشند (۴).

استفاده از تقویت سیستم ایمنی (ایمونوتراپی) در درمان سرطان ها یکی از روشهای مورد مطالعه و موثر محسوب می شود، که در این روش تمرکز بر روی

فیبروسارکوما توموری است با منشا سلول های مزانشیمال که از سلول های فیروپلاست بدخیم و در یک زمینه کلاژن تشکیل می شود. این تومور اغلب به صورت عمقی فاشیای عضله را درگیر می کند و در زمان تشخیص ممکن است یک تومور بی نهایت بزرگ باشد. این تومور اکثراً در افراد زیر ۲۰ سال دیده می شود (۱).

از جمله درمان های شناخته شده برای فیبروسارکوم، پرتودرمانی با استفاده از اشعه است، که از رشد سریع سلول های سرطانی جلوگیری می کند و نیز

فیبروسارکوم بافت نرم، توموری بدون درد و با رشد عمقی بوده و بنابراین از نظر زمانی، تشخیص آن دیرتر صورت می گیرد، از طرفی در زمان تشخیص تومور بی نهایت بزرگ است که فاشیای عضلات را نیز درگیر می کند و مرز مشخصی ندارد، ولی با تشخیص و درمان زود هنگام می توان میزان بقا بیماران را افزایش داد. از آنجایی که روش های درمانی موجود به تنهایی در درمان فیبروسارکوما موثر نبوده و نیاز به روش های درمانی ترکیبی و حتی روش های درمانی جدیدی کاملاً مشهود می باشد، با توجه به اثرات آنتی تومورال و آنتی متاستاتیک ژل رویال در بسیاری از تحقیقات، به نظر می رسد که این ماده بر فیبروسارکوم نیز موثر باشد. لذا این تحقیق با هدف تعیین اثر ژل رویال بر فیبروسارکوما WEHI-164 در موش های نر سوری نژاد Balb/c انجام شد.

### روش بررسی:

در این مطالعه تجربی ۴ گروه ۷ تایی از موش های کوچک آزمایشگاهی نژاد Balb/c که از نظر سن و جنس یکسان بودند به عنوان آزمودنی انتخاب و به اعضای هر گروه تعداد  $5 \times 10^5$  سلول توموری WEHI-164 که از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید در زیر پوست ناحیه سینه و با حجم ۲۰۰ میکرولیتر تزریق گردید. این سلول ها از نوع فیبروسارکوما ایجاد شده در موش Balb/c بودند.

در این بررسی، به هر کدام از گروه های ۷ تایی بجز گروه کنترل، ابتدا و تا پایان مطالعه بعد از تزریق سلول های توموری، به طور روزانه ژل رویال در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/kg از طریق دهانی خورانده شد (۲۰) ژل رویال زنبور عسل از مرکز تحقیقات کشاورزی استان چهارمحال و بختیاری تهیه شد.

به منظور ارزیابی رشد سلول های بدخیم از روز دوم بعد از تزریق، هر موش از نظر توده ی تومور در ناحیه سینه از طریق لمس محل تزریق مورد معاینه قرار گرفت. زمانی که تومور با پوست انگشت لمس

تقویت سیستم ایمنی و فاکتورهای محرک و برانگیزنده سیستم ایمنی می باشد. تقویت سیستم ایمنی موجب کاهش رشد و جلوگیری از گسترش سلولهای سرطانی می گردد. در این میان یکی از موادی که به نظر می رسد در تقویت سیستم ایمنی موثر باشد ژل رویال است (۵، ۶). ژل رویال یکی از فرآورده های زنبور عسل می باشد که ماده ای است سفید شیری رنگ با بوی تند و مزه ای میوه ای که دارای ارزش غذایی فراوان است. این ژل حاوی همه ویتامین های گروه B محلول در آب مانند تیامین (B1)، ریوفلاوین (B2) و پیریدوکسین (B6) همچنین نیاسین، بیوتین، اسید فولیک، اینوزیتول و مواد معدنی (شامل سدیم، پتاسیم، کرومیوم، منیزیم، نیکل) و ۲۰ اسید آمینه ضروری، شکر، استرول، ترکیبات فسفر، استیل کولین، اسید نوکلئیک و همچنین گاما گلوبولین و عناصر مورد نیاز برای سلامتی می باشد (۷، ۸).

ژل رویال فعالیت آنتی بیوتیکی قوی بر علیه باکتری ها و قارچ ها دارد (۹-۱۲). اثرات ژل رویال بر آترواسکلروز، آرتریت، زخم پای دیابتی، ترمیم بافت کلاژن، درمان زگیل و اثرات شبه استروژنی آن نیز به اثبات رسیده است (۱۸-۱۳).

در رابطه با اثر آنتی تومورال ژل رویال، گروهی از محققین ژاپنی، ژل رویال را به یکی از دو گروه موش های آزمایشگاهی قبل از کاشت سلول های تومورال داده و مشاهده نمودند که این ژل اثری بر سلول های لوسمی نداشته ولی اثرات درمانی بر سلول های سارکوما داشته و طول عمر موشها را حدود یک پنجم افزایش می دهد. در این بررسی اندازه تومورها نصف شدند (۱۹). همچنین بررسی دیگری نیز به اثرات ضد توموری ژل رویال اشاره نموده است (۲۰، ۲۱). در مطالعه Tamura و همکاران، ژل رویال هیچ اثر ضد توموری نشان نداد، ولی طول عمر موش های مورد بررسی را به میزان ۱۹/۳ درصد افزایش داده و رشد تومور را به مقدار زیادی محدود نمود (۲۲). طی مطالعه ای که توسط Bincoletto و همکاران نیز انجام شد، نشان داده شد که ژل رویال ایمنی بدن را تعدیل کرده و پاسخ موثر ضد توموری آن با رژیم درمانی طولانی تظاهر می یابد (۲۳).

نتایج حاصل از اندازه گیری تومورها بعد از روز پنجم به مدت ۷ بار متوالی با فاصله یک روز در میان نشان داد که میانگین مساحت تومورهای گروه کنترل (گروهی که ژل رویال دریافت نکرده بودند) در روزهای ۱۱، ۱۳، ۱۵ و ۱۷ نسبت به هر سه گروه مورد (دریافت کننده ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/kg ژل رویال) بیشتر بود ( $P < 0/05$ ) (نمودار شماره ۱).

در این مطالعه سلول های ارگان هایی مثل ریه و کبد برای بررسی متاستاز در مقایسه با گروه کنترل، کشت داده شدند که در هیچ کدام از دو گروه کنترل و یا مورد متاستازی مشاهده نشد. همچنین در این مطالعه همه موشها تا پایان مطالعه و حتی پس از آن زنده ماندند.

### بحث:

در این مطالعه اثر ژل رویال بر روی رشد و گسترش سلول های بدخیم فیروسارکوم ایجاد شده در موش های Balb/c مورد بررسی قرار گرفت. نتایج مطالعه نشان داد که میانگین مساحت تومورها در موش های دریافت کننده ژل رویال نسبت به گروه کنترل کوچکتر بود.

مطالعات مشابهی که اثر ژل رویال را بر روی فیروسارکوم در موش Balb/c بررسی کنند انجام نگرفته اما اثر ژل رویال بر روی انواع سرطان های دیگر در مدل های حیوانی بررسی شد. در مطالعه ای که توسط گروهی از محققین ژاپنی برای بررسی اثر ژل رویال بر روی سرطان انجام شده، به یکی از دو گروه موش آزمایشگاهی قبل از کاشت سلول های تومورال ژل رویال داده شد. ژل رویال اثری بر سلول های لوسمی نداشته ولی اثرات درمانی بر سلول های سارکوما داشته است (۱۹). در نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر نیز اندازه تومورها در گروه کنترل بزرگتر از گروه های مورد بود.

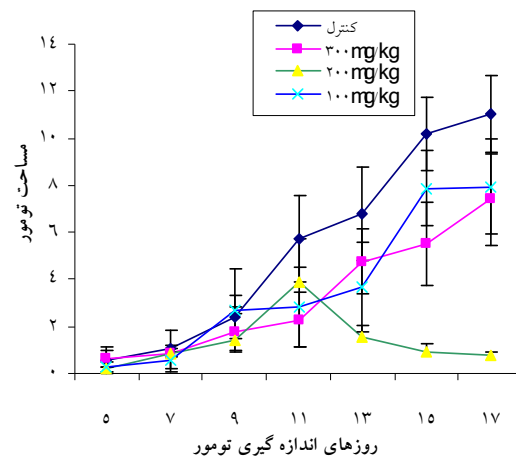
در بافت نرم، به نظر می رسد این سلول ها در مدت مطالعه خاصیت متاستازی نداشته اند چراکه متاستاز در فیروسارکوم بافت نرم دیررس بوده (۲۱) و یا در دوره زمانی طولانی تری متاستاز رخ می دهد، بنابراین در مطالعه حاضر

می گردید بلافاصله قطر آن در دو جهت با استفاده از کولیس اندازه گیری می شد. بررسی موش ها از نظر وجود تومور و اندازه گیری آن تا دو هفته بعد از تزریق ادامه یافت. در این مدت اندازه گیری قطر تومور در هفت مرتبه در روزهای ۵، ۷، ۹، ۱۱، ۱۳، ۱۵ و ۱۷ بعد از تزریق سلول های سرطانی اندازه گیری شد. برای محاسبه میانگین مساحت تومور، دو قطر عمود بر هم اندازه گیری شده با هم جمع و حاصل جمع به عدد ۴ تقسیم شد. ماحصل تقسیم به توان دو رسید و سرانجام در ۳/۱۴ ضرب گردید (۲۴).

جهت مقایسه میانگین مساحت تومور در گروه های گروه مورد و کنترل آزمون من ویتنی یو و کروسکال والیس مورد استفاده قرار گرفت.

### یافته ها:

نتایج حاصل از رشد سلول های سرطانی WEHI-164 در موش های Balb/c نشان داد که در روزهای اول، دوم و سوم بعد از تزریق سلول های سرطانی، تغییری در موش ها ظاهر نشد. در روز چهارم، توده های کوچک قابل لمس و در روز پنجم، رشد برجستگی ها دیده شد. از روز هفتم توده های توموری در همه موشها مشاهده گردیدند.



**نمودار شماره ۱: مقایسه اثر غلظت های مختلف ژل رویال بر رشد تومور فیروسارکوما WEHI-164 در موش سوری**  
 دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم ژل رویال در مقایسه با گروه کنترل اندازه تومور را در روزهای ۱۱، ۱۳، ۱۵ و ۱۷ به طور معنی داری کاهش می دهد. ( $P < 0/05$ ).

اثر ضد متاستازی ژل رویال مشاهده شده است.

در مطالعه Tamura و همکاران، ژل رویال هیچ اثر آنتی توموری نشان نداده، ولی طول عمر را به ۱۹/۳ درصد افزایش و در استفاده پروفیلاکسی-درمانی مهار رشد تومور، ۴۹/۱-۵۶/۱ درصد بوده است (۲۲). این یافته نیز نتایج پژوهش حاضر را تایید می کند.

طی مطالعه ای که توسط Bincoletto و همکاران انجام شد، نشان داد که ژل رویال ایمنی بدن را تعدیل کرده و پاسخ موثر ضد توموری با رژیم درمانی طولانی ایجاد گردید. در این بررسی تجویز ژل رویال به مدت ۳۳ روز به ترتیب با دوزهای ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ mg/kg بقا را ۳۸، ۸۵ و ۷۱ درصد افزایش و همین دوز درمانی به مدت ۲۳ و ۲۸ روز بقا را به میزان ۱۹ و ۲۳ درصد افزایش داده است. افزایش میزان بقا ممکن است ناشی از افزایش پروستاگلندین E2 بعد از درمان باشد. این نتایج اثر ژل رویال را از یک پاسخ بیولوژیکی به یک ماده ضد توموری تغییر داد (۲۳). در صورتی که در مطالعه حاضر تمام موشها تا پایان مطالعه و حتی پس از آن زنده ماندند. احتمالاً ممکن است تومور مورد استفاده در مطالعه حاضر با توجه به درگیری بافت نرم و عدم مشاهده متاستاز بر بقا موشهایی اثر بوده است.

با توجه به اینکه ژل رویال در ابتدای استفاده تأثیری بر رشد تومور نداشته است، به نظر می رسد که اثر ژل رویال بر سیستم ایمنی و فعالیت ضد توموری آن نیازمند زمان باشد و چون اندازه تومورها در روزهای

اول کوچک است نمی توان در خصوص اثر این ماده بر رشد تومور اظهار نظر کرد ولی با پیشرفت کار و تأثیر ژل رویال بر سیستم ایمنی بتدریج رشد تومور در مقایسه با گروه کنترل کاهش می یابد. لذا پیشنهاد می شود در مطالعات آینده مدتی قبل از تزریق تومور رژیم درمانی با ژل رویال آغاز گردد تا آمادگی لازم برای پسرقت و جلوگیری از رشد تومور را داشته باشد. همچنین پیشنهاد می گردد در تحقیقات آینده بر روی حیوانات آزمایشگاهی دیگر و نژادهای موش های آزمایشگاهی اثرات ضد فیبروسارکومایی ژل رویال و به شکل تزریقی بررسی گردد.

### نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ژل رویال با دوزهای ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/kg در کنترل و درمان فیبروسارکوم در موشهای Balb/c مؤثر می باشد. این تأثیر امکان استفاده های درمانی و غذایی از ژل رویال را مطرح می نماید.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسیله از معاونت پژوهشی و مرکز تحقیقات سلولی مولکولی و نیز مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد برای مساعدت در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

### منابع:

1. Wong SL. Diagnosis and management of desmoid tumors and fibrosarcoma. J Surg Oncol. 2008 May; 97(6): 554-8.
2. Loh ML, Ahn P, Perez-Atayde AR, Gebhardt MC, Shamberger RC, Grier HE. Treatment of infantile fibrosarcoma with chemotherapy and surgery: results from the Dana-Farber Cancer Institute and Children's Hospital, Boston. J Pediatr Hematol Oncol. 2002 Dec; 24(9): 722-6.
3. Mirra JM, Marcove RC. Fibrosarcoma: review of five cases. J Bone joint Surg. 1999; 56-287.
4. Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, Thönes N, Gissmann L, Müller H, et al. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. J Gen Virol. 2008 Jan; 89(Pt 1): 138-47.

5. Sver L, Orsolich N, Tadic Z, Njari B, Valpotic I, Basic I. A royal jelly as a new potential immunomodulator in rats and mice. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 1996 Jan; 19(1): 31-8.
6. Vucevic D, Melliou E, Vasilijic S, Gasic S, Ivanovski P, Chinou I, et al. Fatty acids isolated from royal jelly modulate dendritic cell-mediated immune response in vitro. *Int Immunopharmacol*. 2007 Sep; 7(9): 1211-20.
7. Ishii R, Horie M, Murayama M, Maitani T. Analysis of tetracyclines in honey and royal jelly by LC/MS/MS. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2006 Dec; 47(6): 277-83.
8. obayashi N, Unten S, Kakuta H, Komatsu N, Fujimaki M, Satoh K, et al. Diverse biological activities of healthy foods. (in vivo). 2001 Jan-Feb; 15(1): 17-23.
9. Fontana R, Mendes MA, de Souza BM, Konno K, César LM, Malaspina O, et al. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*) peptides. 2004 Jun; 25(6): 919-28.
10. Melliou E, Chinou I. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *J Agric Food Chem*. 2005 Nov; 53(23): 8987-92.
11. Kamakura M, Mitani N, Fukuda T, Fukushima M. Antifatigue effect of fresh royal jelly in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2001 Dec; 47(6): 394-401.
12. Fujiwara S, Imaj J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *J Biol Chem*. 1990 Jul; 265(19): 11333-7.
13. Abdelatif M, Yakoot M, Etmaan M. Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study. *J Wound Care*. 2008 Mar; 17(3): 108-10.
14. Hidaka S, Okamoto Y, Uchiyama S, Nakatsuma A, Hashimoto K, Ohnishi ST, et al. Royal jelly prevents osteoporosis in rats: beneficial effects in ovariectomy model and in bone tissue culture model. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006 Sep; 3(3): 339-48.
15. Koya-Miyata S, Okamoto I, Ushio S, Iwaki K, Ikeda M, Kurimoto M. Identification of a collagen production-promoting factor from an extract of royal jelly and its possible mechanism. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2004 Apr; 68(4): 767-73.
16. Mishima S, Suzuki KM, Isohama Y, Kuratsu N, Araki Y, Inoue M, et al. Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *J Ethnopharmacol*. 2005 Oct; 101(1-3): 215-20.
17. Maly E, Pacenovska M. Successful treatment of warts by royal jelly. *Cesk Dermatol*. 1966 Feb; 41(1): 36-9.
18. Madar J, Maly E, Neubauer E, Moscovic F. Effect of bee royal jelly (gelee royale) on the cholesterol level, total lipids in the serum and on the fibrinolytic activity of plasma of elderly arteriosclerotic patients. *Z Alternsforsch*. 1965 Sep; 18(2): 103-8.
19. Taniguchi Y, Kohno K, Inoue S, Koya-Miyata S, Okamoto I, Arai N, et al. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol*. 2003 Sep; 3(9): 1313-24.
20. Shirzad H, Shahinfard N, Naficy MR, Karami M. Comparison of royal jelly effects with Gentamicin and Ceftriaxone on the growth of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, in a laboratory environment. 5th European congress on Tropical Medicine and International Health. 2007; Amsterdam.
21. Mark RJ, Sercarz JA, Tran L, Selch M, Calcaterra TC. Fibrosarcoma of the head and neck. The UCLA experience. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1991 Apr; 117(4): 396-401.
22. Tamura T, Fujii A, Kuboyama N. Antitumor effects of royal jelly (RJ). *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 2000 Feb; 89(2): 73-80.

23. Bincoletto C, Eberlin S, Figueiredo CA, Luengo MB. Effect produced by royal jelly (RJ) on haematopoiesis, relation with host resistance against Ehrlich ascites tumour challenge. *Nutr cancer*. 2005 Apr; 5(4): 679-88.
24. Shirzadeh H. A new receptor on cells mediating innate immune surveillance against cancer in mice. A Phd thesis, University of Newcastle, Australia. 1997.