

مطالعه آپوپتوزیس متعاقب تاثیر عصاره گل همیشهبهار در کارسینوم تجربی کولون موش صحرایی

یوسف دوستار^۱، داریوش مهاجری^۲، فاطمه فتحی‌آذر^۳، علی ناموران^۴

- ^۱ استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز
^۲ دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز
^۳ استادیار، دکترای فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
^۴ دانشجوی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات آزمایشگاهی اخیر در مورد سرطان‌های کولورکتال نشان می‌دهد که عصاره گل همیشهبهار دارای خاصیت ضدسرطانی برکشت سلول‌های مشتق شده از کارسینوم کولورکتال می‌باشد. میزان خاصیت مهاری این عصاره در حدود ۷۰ الی ۱۰۰ درصد بوده است. هدف از این مطالعه ارزیابی آپوپتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک کولون متعاقب درمان با عصاره گل همیشهبهار می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ۵۶ سر موش صحرایی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۲۰۰-۳۰۰ گرم انتخاب و به دو گروه مساوی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. برای القاء سرطان کولورکتال از ماده کارسینوژن ۱۰-۲ دی متیل هیدرازین به مقدار ۴۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به روش تزریق زیرجلدی (۲ تزریق در هر هفته، به مدت ۲ هفته) استفاده گردید. گروه تیمار علاوه بر دریافت ماده کارسینوژن، عصاره گل همیشهبهار را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم به مدت ۱۰ هفته به روش خوارکی روزانه دریافت نمودند. پس از گذشت ۱۰ هفته، از بافت کولون دیستال هر دو گروه جهت تهیه مقاطع ۳-۴ میکرونی و انجام رنگ‌آمیزی تانل نمونه برداری به عمل آمد.

پافته‌ها: مطالعات این‌نوهیستوتیسمی نشان داد که پدیداری سلول‌های آپوپتوزیک در گروه تیمار نسبت گروه شاهد بیشتر بوده و اختلاف میانگین هر دو گروه از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.01$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان داد که عصاره گل همیشهبهار توانایی القاء آپوپتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک را در کارسینوم کولورکتال تجربی موش صحرایی را دارد می‌باشد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، سرطان کولورکتال، گل همیشهبهار.

مقدمه

منابع غیر رسمی اعلام کرده‌اند که بیشترین درصد سرطان مربوط به دستگاه گوارش و به خصوص روده بزرگ است و درصد بالایی از بدخیمی‌ها و مرگ و میر را در ایران شامل می‌شود. میزان بالای چربی (۳) و بروتئین چربه غذایی باعث افزایش وقوع سرطان روده بزرگ می‌شود(۴)، این در حالی است که به نظر می‌رسد تغذیه با چربی پایین، فیبر بالا، کلسیم بالا و مصرف مقدار زیاد سبزیجات در غذای روزانه باعث کم شدن میزان بروز سرطان روده بزرگ می‌شود. مطالعات آزمایشگاهی حاکی از ارتباط بین عوامل تغذیه‌ای و سرطان روده بزرگ است (۳، ۵، ۶). با این وجود، مکانیسم

سرطان روده بزرگ، دو میان دلیل مرگ و میر ناشی از سرطان در دنیا است. طبق آمار ارائه شده، این سرطان در هر سال مسئول مرگ ۱۹۰۰۰ نفر در انگلستان، ۸۵۰۰۰ نفر در اروپا و ۶۱۰۰۰ نفر در ایالات متحده است (۱، ۲). در مورد ایران، آمار قابل استنادی برای میزان وقوع این سرطان وجود ندارد، ولی

آدرس نویسنده مسئول: تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی تبریز، دانشکده دامپزشکی، بخش پاتولوژی، دکتر

یوسف دوستار (email: vtdoustar@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۰

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۱۱/۳

گل همیشه بهار و آپوپتوزیس کارسینوم کولون موش صحرایی

مقدار ۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم به روش تزریق زیر جلدی (۴) تزریق در هر هفته) استفاده گردید. گروه تیمار علاوه بر دریافت ماده کارسینوژن، عصاره گل همیشه بهار را به میزان ۲۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم به مدت ۱۰ هفته به روش خوراکی روزانه دریافت نمودند. پس از گذشت ۱۰ هفته، از بافت کولون دیستال هر دو گروه جهت تهیه مقاطع ۳-۴ میکرونی و انجام رنگ آمیزی تالل نمونه برداری به عمل آمد (۱۱). تغییرات آپوپتوزیس در بافت کولون به عنوان متغیر وابسته مورد بررسی قرار گرفت.

جهت ایجاد تجربی سرطان روده بزرگ در جوندگان از ماده ۱,۲-dimethylhydrazine (DMH) استفاده می شود که قابلیت کارسینوژنیک در روده بزرگ و کوچک داشته و با القای کریپت‌های نابجا در روده و متعاقب آن ایجاد تومور، روش استاندارد مطالعه تجربی سرطان در روده بزرگ و کوچک است (۱۲، ۱۳)، با این حال ارگان هدف آن روده بزرگ است (۱۳، ۱۴). از طرف دیگر، انسانها با DMH و دیگر مشتق‌های هیدرازین از طریق محیط (۱) و غذا در ارتباط هستند. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که DMH از طریق استرس اکسیداتیو و القاء موتاسیون اثرات خود را بر جای می‌گذارد (۱۵، ۴). جهت ارزیابی سرطان ایجاد شده توسط DMH، کریپت‌های نابهجهای ایجاد شده ایجاد شده توسط ACF (Aberrant Crypt Foci) مورد بررسی قرار می‌گیرد. کریپت‌های نابهجهای ایجاد شده در روده از عوامل مستعد کننده روده برای ایجاد پولیپ و مراحل پیشرفته سرطان هستند و از طریق بررسی آنها می‌توان در شناسایی زودهنگام سرطان کمک گرفت. برای القاء کارسینوم کولون ماده شیمیایی ۱۹ دی متیل هیدرازین با دز ۴۰ میلی گرم/ کیلوگرم محلول در EDTA به روش زیر جلدی تزریق می‌گردد. مدت زمان تزریق هر هفته دو تزریق با فاصله مساوی، به مدت دو هفته است (۱۶، ۱۷).

به منظور تهیه عصاره گل همیشه بهار، ابتدا گل‌ها خشک و پودر شده و سپس به روش ماسرسایون (خیساندن) در سرما توسط حلal ان-هگران چربی زدایی شدند. جهت حصول عصاره با محتوای مواد موثره حداکثر، از حلal متانل ۷۰ درصد استفاده گردید. استخراج نمونه در سرما به روش ماسرسایون انجام و عمل گردید. عصاره‌های بدست آمده تحت خلا و در دمای پائین کاملاً خشک و جهت مطالعه اثر آن در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت. عصاره هیدروالکلی فوق به صورت پودر به همراه سرم سالین با دوز ۲۰۰ میلی گرم/ کیلوگرم گاواز گردید.

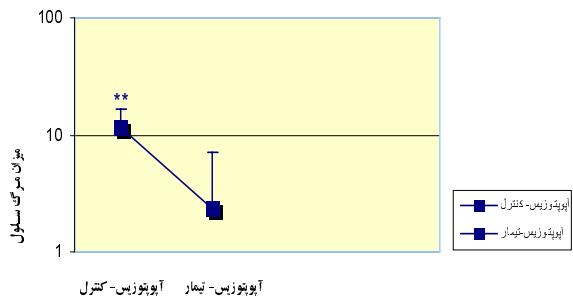
برای تشخیص آپوپتوز، از کیت تالل (in situ cell death detection kit، کمپانی Roche، آلمان) استفاده شد. تکنیک تالل به شرح زیر انجام شد:

همایتی اجزای اشاره شده هنوز به درستی مشخص نشده است. به نظر می‌رسد تجمع زیاد سلول‌های جهش یافته در روده بزرگ و رکتوم باعث ایجاد تومور و بدخیمی می‌شود (۴). سرطان روده بزرگ یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در مردان و زنان به خصوص در آینده و افزایش شهرهای صنعتی خواهد بود (۳، ۶). از عوامل مهارکننده سرطان روده بزرگ می‌توان به گیاهان دارویی و میوه‌جات اشاره کرد که به صورت روزانه مورد مصرف قرار می‌گیرند، ولی باید قبل از مصرف آنها اثرات محافظتی و ضدسرطانی آنها شناسایی شود. مطالعات در مورد نقش گیاهان مختلف در پیشگیری از سرطان روده از مدتی قبل آغاز شده است (۷). مطالعات قبلی حاکی از اثرات مفید گیاه همیشه بهار (*Calendula officinalis*) در التهابات، تسريع التیام زخم‌ها، اثرات مفید در بثورات پوستی در مصارف خارجی و اثرات مفید در کوله‌سیستیت، کولانزیت، گاستریت، سیستیت و ضد هایپرلیپیدمی در مصارف داخلی است (۸). گاهی در منابع قدیمی به اثرات سیتوکسیک و آنتی‌توموری آن اشاره شده (۸)، ولی در مطالعاتی که اخیراً انجام شده است اثرات زنوتوكسیک و ضدزنوتوكسیکی در رده سلول‌های کبدی (۹) و اثرات آپوپتوزیک آن بصورت *In vitro* بر روی سلول‌های سرطان رده سلول‌های لوسمی، ملانوما، فیبروسارکوما، پستان، پروستات، سرویکس، پانکراس و کولورکتال مورد بررسی قرار گرفته است. به طوری که عصاره گیاه فوق با مهار تقسیم سلولی در فاز G0/G1 و فعل کردن آنزیم کاسپیاز-۳ باعث راه اندازی آبشار کاسپیازی و آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی در شرایط *In-vitro* می‌گردد (۱۰). با توجه به اثرات ضدتوموری و القاگر عصاره گیاه همیشه بهار و عدم مطالعه اثرات این گیاه به صورت *In vivo* تا اثرات آن در آپوپتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک در مدل تجربی کارسینوم کولون را مورد بررسی قرار دهیم.

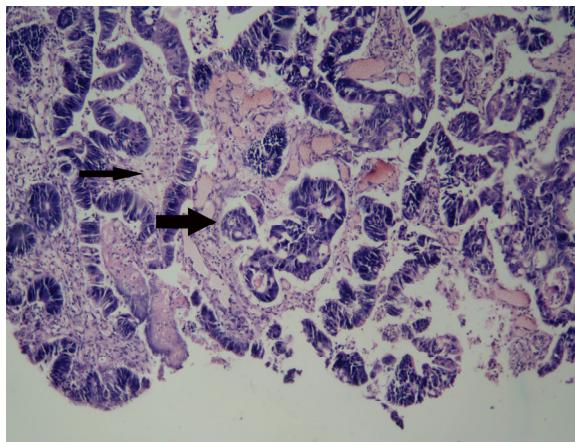
مواد و روشها

در این مطالعه تجربی مداخله‌ای، تعداد ۵۶ سرموش صحرائی نر نژاد ویستار با سن ۱۲ هفته و وزن ۳۰۰-۲۰۰ گرم انتخاب و به صورت تصادفی به دو گروه مساوی تیمار و شاهد تقسیم گردیدند. رت‌های نر در شرایط ۵ حیوان در هر گفses و نیز با سیکل ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت ۲۲±۲ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۵۵±۱۰ درصد نگهداری شدند.

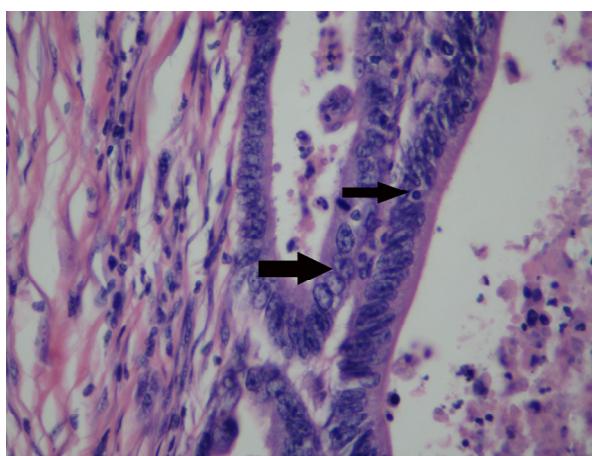
برای القاء سرطان کولورکتال در هر دو گروه تیمار و شاهد از ماده کارسینوژن ۱۹-دی متیل هیدرازین (ساخت کمپانی سیگما) به



نمودار ۱- میانگین تغییرات آپوپتوزیس در بافت کولون گروه تیمار و شاهد (n=28). داده‌ها بصورت میانگین ± خطای معیار نمایش داده شده است.
**<0.01 در مقایسه با گروه شاهد.



شکل ۱- نمای ریزبینی از بافت اپیتلیوم کولون موش صحرائی گروه شاهد که تحت تاثیر ۲۱ دی متیل هیدرازین قرار گرفته است. به تغییرات دیسپلاستیک بافت اپیتلیالی توجه نمائید. تعداد کثیری از کریپت‌های دیسپلاستیک یا Aberrant Crypt Foci (فلش ضخیم) به همراه ارت翔 سلول‌های آماسی در لامینا پروپریا و شکل گیری خونی نیز قابل مشاهده می‌باشد. (بزرگنمایی ۲۰ برابر؛ رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اژوزین)



شکل ۲- نمای ریزبینی از بافت اپیتلیوم کولون موش صحرائی گروه تیمار که در آن تعدادی از سلول‌های دیسپلاستیک (فلش ۱) و سلول آپوپتوزیک (فلش ۲) قابل مشاهده می‌باشد. (بزرگنمایی ۲۰ برابر و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-اژوزین)

۱- ابتدا مقاطع تهیه شده، پس از پارافین‌زدایی و آب دهی با بروتئیناز K مجاور و پس از انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر شستشو گردیدند.

۲- مقاطع بافتی با محلول واکنش‌گر تالل به میزان ۵۰ میکرولیتر به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مجاور گردیدند، سپس با محلول فسفات بافر شستشو داده شدند.

۳- در این مرحله، مقاطع بافتی پس از انکوباسیون با محلول کالورتر (۵۰ میکرو لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با محلول فسفات بافر شستشو و سپس با محلول دی‌آمینو بنزیدین تراکلراید نیز مجاور گشته و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۲۵ سانتی‌گراد مجدداً انکوبه گردیدند.

۴- سپس برش‌ها با فسفات بافر شستشو و باتولوئیدین بلو رنگ آمیزی شدند (۱۸، ۱۹).

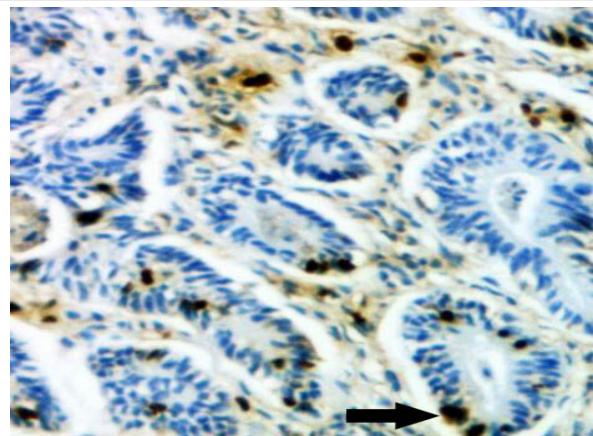
بر اساس جدول کوهن و ضریب اثر ۰/۵ و توان آزمون ۹۰ درصد، حداقل حجم نمونه ۲۸ مورد به دست آمد. سلول‌های آپوپتوزیک در ۱۰ میدان میکروسکوپی بطور تصادفی شمارش گردیدند. برای تحلیل داده‌ها و مقایسه میانگین سلول‌های آپوپتوز دو گروه تیمار و شاهد از آزمون t مستقل استفاده شد.

یافته‌ها

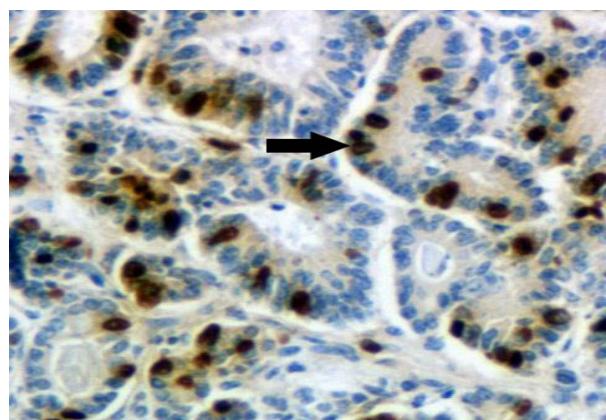
در مقاطع بافتی که به روش رنگ آمیزی معمول هماتوکسیلین-اژوزین تهیه شده بودند، سلول‌های دیسپلاستیک، نئوپلاستیک، کریپت‌های غیرعادی یا Aberrant Crypt Foci (فلش ضخیم) به همراه سلول‌های آماسی تک‌هسته‌ای مشاهده گردیدند که نشانگر تاثیر کارسینوژنیک ماده شیمیائی ۲۱ دی متیل هیدرازین می‌باشد (شکل ۱ و ۲). مطالعات میکروسکوپی از مقاطع بافتی بخش دیستال کولون که به روش رنگ آمیزی تالل تهیه گردیده بودند، نشانگر تعداد کثیری از سلول‌های آپوپتوزیک در اپیتلیوم کریپت‌های دیسپلاستیک کولون (Aberrant Crypt Foci) گروه تیمار بود که در مقایسه با گروه شاهد تعداد سلول‌های آپوپتوزیک بیشتری داشتند (شکل ۳ و ۴) و اختلاف معنی‌داری بین دو گروه تیمار و شاهد مشاهده شد. میانگین (\pm انحراف معیار) میزان آپوپتوزیس در گروه تیمار $11/7 \pm 2/1$ و در گروه شاهد $2/4 \pm 1/4$ بود ($p < 0.1$). در نمودار ۱ تغییرات آپوپتوزیس در بافت کولون گروه تیمار و شاهد نشان داده شده است.

گل همیشه بهار و آپوپتوزیس کارسینوم کولون موش صحرایی

سرکوب کننده رشد تومور و مشوق آپوپتوزیس شناخته شده است. محصول ژن APC پروتئینی است به وزن ۳۱۲ کیلو دالتون که دارای دو منهای متعددی است که از آن طریق با سایر پروتئین‌ها باند می‌شود که شامل پروتئین بتا-کاتین، آکسین، IQGAP1 و میکروتوبول می‌باشد. نقش دیگری که برای APC بیان شده اتصال و مهاجرت سلولی، سازمان‌دهی آکتین و شبکه میکروتوبولی سلول‌ها است و از این نظر می‌توان تغییرات آنالاستیک مشاهده شده در مطالعه حاضر را تفسیر نمود، زیرا که با نقص ایجاد شده در شکل‌گیری دوک‌های تقسیم سلولی و اتصال بین سلولی (موتاسیون ژن APC) شرایط برای برحک خودن پلاستیک سلولی و تشکیل سلول‌های پلی‌بوئیدی مساعد می‌گردد که نتایج گویای آن است (۲۰). تاثیرات آنتی‌موتاسیونی عصاره گل همیشه بهار در پدیداری پروتئین‌های مشوق آپوپتوزیس نظیر پروتئین APsC نیز نمی‌تواند در توجیه نتایج معنی‌دار مطالعه حاضر مطرح باشد. البته نباید نقش پروتئین بتا-کاتین را نیز در این مورد فراموش نمود که عصاره گل همیشه بهار به شکل غیرمستقیم بر روی آن اثر گذاشت و الگوی مرگ سلول‌های دیسپلاستیک را در کارسینوم کولورکتال تحت تاثیر قرار می‌دهد. لیس و همکاران در سال ۱۹۹۰، جیمنز در سال ۲۰۰۶ و باراجیز در سال ۲۰۰۶ به این نتیجه رسیدند که عصاره گل همیشه بهار دارای خاصیت ضد سرطانی است که دلیل آن وجود ماده شیمیائی بنام ساپونین در آن می‌باشد. ساپونین موجود در عصاره گل همیشه بهار آنتی‌موتاسیون و مشوق آپوپتوزیس می‌باشد (۹، ۱۸، ۱۰). همچنین موتوفیوکو و همکاران در سال ۲۰۰۶ بیان داشتند که دو ترکیب شیمیایی موجود در عصاره گل همیشه بهار بنام تریترین‌گلیکوزیداز-۹ و ۱۰ دارای خاصیت سیتوکسیسیتی می‌باشند که توانسته‌اند در رده‌های سلولی سرطان‌های کولون، ملانوم و لوسمی در حد ۵۰ درصد پتانسیل القاء مرگ سلولی را نشان دهند. ناگفته نمانت که محصول تریترین‌گلیکوزیداز-۱۰ حاصل از عصاره گل همیشه بهار در مهار فرآیندهای التهابی نیز موثر بوده است (۲۱). نتایج مطالعات سایر دانشمندان و مقایسه آن با نتایج مطالعه حاضر نشانگر آن است که عصاره گل همیشه بهار تا حدودی می‌تواند در القاء آپوپتوزیس سلول‌های دیسپلاستیک کولون در شرایط *in vivo* موثر واقع گردد، هر چند باید با دسترسی به ترکیبات موثرتر عصاره گیاهی فوق و مطالعات بیشتر به نتایج دقیق‌تر و راه‌گشایی دست یافتد و با استفاده از عوامل موجود در طبیعت تا حدودی در درمان بیماری‌های نئوپلاستیک موفق بود.



شکل ۳ - نمای ریزیبینی از کریپت اپی‌تیلوم کولون موش صحرایی گروه شاهد که در آن سلول‌های تائل مثبت به رنگ قهوه‌ای (فلش) قابل رویت می‌باشد. (بزرگنمایی ۴۰ برابر و رنگ آمیزی تائل)



شکل ۴ - نمای ریزیبینی از کریپت اپی‌تیلوم کولون موش صحرایی گروه تیمار که در آن سلول‌های متعدد تائل مثبت متعدد به رنگ قهوه‌ای (فلش) قابل رویت می‌باشد. (بزرگنمایی ۴۰ برابر و رنگ آمیزی تائل)

بحث

نتایج حاصل از مطالعات جیمنز و همکاران وی در سال ۲۰۰۶ نشان می‌دهد که عصاره گل همیشه بهار توانسته است در محیط‌های کشت، سلول‌های سرطانی متعد نظیر لوسمی، ملانوما، فیبروسارکوم، کارسینوم‌های پستان، پروستات، سرویکس، ریه، پانکراس و کولورکتال را در حد ۷۰ الی ۱۰۰ درصد از بین ببرد. آنها این موضوع را چنین نمودند که عصاره گل همیشه بهار به واسطه اثر مهاری بر تقسیم سلولی در فاز G0/G1 و فعال نمودن مسیر آبشار کلیپازی باعث القاء آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی محیط کشت می‌شود. همچنین اشاره داشتند که مهم‌ترین مسیر آنزیمی موثر، آنزیم کاسپاز-۳-۱۰ می‌باشد (۱۰، ۸). آکوئی و همکاران و دینا در سال ۲۰۰۷ بیان نمودند که ژن Adenomatous Polyposis Coli یا APC

REFERENCES

1. Willett WC, Stamfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. *N Engl J Med* 1990; 323: 1664–72.
2. Wynder EL. The epidemiology of large bowel cancer. *Cancer Res* 1975; 35: 3388–94.
3. Reddy BS. Nutritional factors and colon cancer. *Crit Rev Food Sci Nutr* 1995; 35: 175–90.
4. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–67.
5. Mason JB. Nutritional chemoprevention of colon cancer. *Semin Gastrointest Dis* 2002; 13: 143–53.
6. Negri E, D'Avanzo B, Tavani A. The role of vegetables and fruit in cancer risk. In: Hill MJ, Giacosa A, Caygill CP, Eds. *Epidemiology of diet and cancer*. London: Ellis Horwood; 1994. P.327–34.
7. Shike M, Winamer SJ, Greenwald PH, Bolch A, Hill M, Swaroop SV. Primary prevention of colorectal cancer. *Bull World Health Org* 1998; 68: 377–85.
8. Pérez-Carreño NG, Cruz-Jiménez JA, Licea-Vegab E. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol In Vitro* 2001; 16: 253–58.
9. Barajas-Farias LM, Pérez-Carreón JI, Arce-Popoca E. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in a rat hepatocarcinogenesis model. *Planta Med* 2006; 72: 217–21.
10. Jimenez-Medina E, García-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 2006; 6: 119.
11. Thurnherr N, Deschner EE, Stonehill EH, Lipkin M. Induction of adenocarcinomas in the colon in mice by weekly injection of 1,2-dimethylhydrazine. *Cancer Res* 1973; 33: 940–45.
12. Kamaleeswari M, Deeptha K, Sengottuvan M, Nalini N. 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* 2005; 214: 290–96.
13. Dias MC, Spinardi-Barbisan AL, Rodrigues MA, de Camargo JL, Terán E, Barbisan LF. Lack of chemopreventive effects of ginger on colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine in rats. *Food Chem Toxicol* 2006; 44, 6,877–884.
14. Manju V, Nalini N. Chemopreventive efficacy of ginger, a naturally occurring anticarcinogen during the initiation, post-initiation stages of 1,2 dimethylhydrazine-induced colon cancer. *Clin Chim Acta* 2005; 358: 60–67.
15. Chithra V, Leelamma S. *Coriandrum sativum* — effect on lipid metabolism in 1,2-dimethyl hydrazine induced colon cancer. *J Ethnopharmacol* 2000; 71: 457–63.
16. Bird RP. Role of aberrant crypt foci in understanding the pathogenesis of colon cancer. *Cancer Lett* 1995; 93: 55–71.
17. Rodrigues MAM, Silva LAG, Salvadori DMF, Camargo JLV, Montenegro MR. Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. *Brazilian J Med Biol Res* 2002; 35: 351–55.
18. Dikavsakaya D, Schiffmam D, Lan P. Loss of APC incidence polypoidy as results of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol* 2007; 176: 183–95.
19. Boucaud-Maitre Y, Algernon O, Raynaud J. Cytotoxic and antitumoral activity of *Calendula officinalis* extracts. *Pharmazie* 1988; 43: 220–21.
20. Aoki K, Taketo M. Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J Cell Sci* 2007; 120: 3327–35.
21. Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Anti-Inflammatory, anti-tumor-promoting, and cytotoxic activities of constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) flowers. *J Nat Prod* 2006; 69: 1692–96.