

بررسی خواص ضد جهشی و ضد سرطانی لیمو شیرین *Citrus Limon*

ملیحه انتظاری^۱، احمد مجد^۲، فتح... فلاحیان^۳، صدیقه مهرابیان^۴، مهرداد هاشمی^۵

^۱ دانشجوی دکترای سلولی تکوینی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۲ استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

^۳ استاد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

^۴ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم

^۵ استادیار، ژنتیک مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران

چکیده

سابقه و هدف: در حال حاضر سرطان یکی از عوامل مرگ و میر در جهان می باشد. بسیاری از مواد شیمیایی جهش زا باعث مرگ میلیون ها بیمار سرطانی هستند. امروزه دانشمندان در حال بررسی و پیدا کردن مواد غذایی طبیعی هستند که بتوانند از بروز سرطان پیشگیری کنند. در این تحقیق، خواص ضد جهشی و ضد سرطانی آب میوه لیمو شیرین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی، سلول های سرطانی آستروسیتوما ی انسانی در محیط DMEM (Gibco) بعلاوه ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum)، L-گلوتامین، پنی سیلین و استرویتومایسین در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ روز کشت و سپس با آب میوه لیمو شیرین تیمار شدند و توان زیستی سلول ها با روش MTT ارزیابی شد. همچنین خواص ضد جهشی و ضد سرطانی آب میوه لیمو شیرین بر حسب روش استاندارد سنجش جهش برگشتی (آزمون ایمز) مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون ایمز، از سوش سالمونلا تیفی موریوم TA100 استفاده شد که جهشی در ایران هیستیدین خود دارد و جهت رشد نیازمند به منبع هیستیدین خارجی می باشد. سوش مذکور در مقابل مواد سرطان زا (آزید سدیم) ایجاد کلنی برگشتی می کند.

یافته ها: در روش MTT، سلول های سرطانی آستروسیتوما ی انسان مرگ سلولی معنی داری را نسبت به گروه های کنترل نشان دادند ($p < 0.01$) در آزمون ایمز، آب میوه از موتاسیون برگشتی جلوگیری نمود و درصد بازدارندگی در سنجش ضد جهشی لیمو شیرین نیمه رسیده ۷۱/۷٪ و لیمو شیرین رسیده ۳۴/۴٪ و این میزان در سنجش ضد سرطان زایی در لیمو شیرین نیمه رسیده ۸۳/۳٪ و لیمو شیرین رسیده ۵۰٪ بود.

نتیجه گیری: در این بررسی برای اولین بار خواص ضد جهشی و ضد سرطانی آب میوه لیمو شیرین مشخص گردید و این اثر در لیمو شیرین نیمه رسیده بیشتر از اثر لیمو شیرین رسیده بود.

واژگان کلیدی: ضد جهشی، ضد سرطانی، لیمو شیرین، سلول های سرطانی آستروسیتوما ی انسان، آزمون ایمز

مقدمه

در حال حاضر سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در جهان می باشد که در اثر عوامل مختلفی از جمله مواد جهش زا و مواد شیمیایی سرطان زا در محیط بوجود می آید. بر طبق

برآوردهای انجام شده ممکن است بیش از ۷۵٪ سرطان ها دارای منشأ محیطی باشند (۱،۲). آسیب ها و تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در توالی DNA و بروز جهش در ژنها و دیگر تغییرات در ساختار کروموزومی در سرطان زایی نقش بسزایی دارند (۳). بسیاری از مواد جهش زا و سرطان زا از طریق رادیکال های آزاد از جمله گونه های اکسیژن واکنش گر (ROS: Reactive Oxygen species) اثر تخریبی خود را نشان می دهند. موادی که به عنوان آنتی اکسیدان عمل می کنند،

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، ملیحه

انتظاری (email: entezarimail@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۷/۲/۵

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۵/۱۲

چسبندگی بوده و برای ارزیابی بایستی در شرایط نرمال رشد قرار داشته باشند، تمامی آزمایش‌ها بعد از ۱۸ ساعت انکوباسیون در چاهک های پلیت کشت سلول (چسبیدن کامل سلول به پلیت) انجام گرفت.

در صد سلول های زنده در سوسپانسیون سلولی (viability test) تعیین شد. هدف از انجام این تکنیک، تنظیم و کنترل مقدار سلول‌ها و دانسیته آنها در محیط کشت سلولی است. این تکنیک ناشی از اثر رنگ MTT بر روی سلول‌ها است که سلول‌های زنده را می‌توان از طریق کریستالهای ارغوانی ناشی از احیا شدن رنگ توسط دهیدروناز میتوکندریایی آنها است، شمارش و از طریق فرمول زیر درصد سلول های زنده تعیین می‌گردد:

viability (توان زیستی) = (تعداد سلول های زنده تقسیم بر کل سلول های کشت داده شده) ضرب در ۱۰۰

بعد از گذشت ۱۸ ساعت به منظور چسبیدن کامل سلول به سطح پلیت، غلظت‌های مختلف آب میوه (صفر به عنوان کنترل، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میکرولیتر در میلی لیتر) را به سلولها اضافه و پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵٪ نگهداری شدند.

برای رنگ آمیزی از روش MTT استفاده شد. این روش بر اساس احیای رنگ MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide) محلول به یک فرآورده نامحلول (Formazan) بنفش آبی توسط فعالیت آنزیم دهیدروناز میتوکندری در سلول‌های زنده استوار است. برای تهیه محلول MTT با غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر، ۵۰ میلی گرم از پودر MTT در ۱۰ میلی لیتر از PBS ۰/۱۵ مولار حل شد و هنگام استفاده در رنگ آمیزی ۱۰ برابر با PBS رقیق گردید تا محلول ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر MTT به دست آید. لازم به ذکر است که پس از تهیه PBS، محلول اتوکلاو گردید. پس از انکوباسیون سلول‌های سرطانی با غلظت‌های مختلف آب میوه در زمان ۴۸ ساعت، پلیت‌هایی که در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و CO₂ ۵ درصد انکوبه شده بودند با محلول MTT ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر رنگ آمیزی شدند. پس از ۳ تا ۵ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد مایع رویی سلول‌ها برداشته شد و به جای آن ۲۰۰ میکرولیتر محلول ایزوپروپانل (Merck, Germany) به حفره‌های مربوط اضافه شد و پلیت مربوط بمدت ۱۰ الی ۱۵ دقیقه روی شیکر قرار گرفت. سپس آن را توسط یک

می‌توانند آثار زیان بار ROS را کاهش دهند. ROS در سبب شناسی بیماری‌هایی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی-عروقی، مشکلات عصبی و پیری نقش دارد. لذا مصرف روزانه آنتی اکسیدان‌ها دفاع و ایمنی بدن را در مقابل تولید رادیکال‌های آزاد افزایش داده و به عنوان ضد سرطان عمل می‌کند (۴-۶). برخی میوه‌ها و سبزیجات به علت داشتن مقدار زیادی آنتی اکسیدان‌ها مانند پلی فنل‌ها، ویتامین C، ویتامین E، بتاکاروتن و لیپوتن، از مواد غذایی اصلی ضد سرطان محسوب می‌گردند (۷). مرکبات از میوه‌های غنی از آنتی اکسیدان هستند (۸،۹). از شایع‌ترین آزمایش‌ها برای سنجش اثرات ضد سرطانی و ضد جهشی آزمون ایمز با بکارگیری باکتری‌های دارای جهش خاص (۱۰،۱۱) و تاثیر مواد مورد نظر بر سلول‌های سرطانی کشت شده در *in vitro* می‌باشد. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر ضد سرطانی آب میوه لیمو شیرین نیمه رسیده و رسیده از طریق تاثیر بر سلول‌های سرطانی و نیز آزمون ایمز برای اولین بار می‌باشد.

مواد و روشها

در این تحقیق تجربی برای بررسی اثر سایتوتوکسیسیته آب میوه لیمو شیرین بر رده سلول سرطانی (*in vitro*) از روش آزمون توان حیاتی (MTT) استفاده شد و نتایج بر حسب اندکس تحریک محاسبه و به روش آماری آزمون t مورد ارزیابی قرار گرفت.

برای ارزیابی اثر ضد سرطانی و ضد جهشی آب میوه‌ها، از روش استاندارد آزمون ایمز (Ames) بر روی باکتری‌های جهش یافته سالمونلا تیفی موریوم استفاده گردید و نتایج بر حسب رشد کلونی‌های باکتری در شرایط انتخابی با آزمون آماری ANOVA تحلیل شدند.

در این مطالعه از سلول‌های سرطانی آستروسیتومای انسانی (لاین ۱۳۲۱) استفاده شد. سلول‌های مورد آزمایش، در محیط DMEM دارای ۱۰ تا ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS (Fetal Bovine Serum) و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵ درصد گاز CO₂ کشت داده شدند. برای انجام آزمایش‌ها و انکوباسیون سلول‌ها با مواد مورد نظر، پس از رشد و ازدیاد سلول‌ها، سلول‌های چسبندگی به کمک تریپسین ۰/۲۵٪ از کف فلاسک جدا و پس از شمارش به میزان ۵۰۰۰ سلول به فلاسک منتقل شدند. در تمامی موارد برای هر آزمایش فلاسک در نظر گرفته شد و کلیه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. از آنجا که برخی از سلول‌های فوق

و افزایش آن شده بود. کبدها در محلول کلرید پتاسیم ۰/۱۵ مولار هموژن گردیده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۹۰۰۰ در دقیقه و دمای ۴ سانتی گراد عمل سانتریفوژ انجام شد. مایع رویی (مخلوط، S9) جدا شد و باکوفاکتورهای لازم (NADP و گلوکز ۶ فسفات) مخلوط شدند و ۰/۵ میلی لیتر برای بررسی خاصیت ضد سرطانی به مخلوط Top agar اضافه شد. همچنین پس از شمارش کلنی‌ها در آزمون ضد جهش‌زایی- ضد سرطانی، درصد بازدارندگی یا آنتی‌اکسیدانی از فرمول ذیل محاسبه گردید (۱۲).

$$\text{درصد بازدارندگی} = (1 - T/M) \times 100$$

T نشان دهنده کلنی‌های برگشتی در هر پتری‌دیش در مجاورت ماده جهش‌زا و آب میوه‌ها و M نشان دهنده کلنی‌های برگشتی موجود در پتری‌های مربوط به کنترل مثبت (ماده جهش‌زا) می‌باشد.

یافته‌ها

از مقایسه نتایج حاصل از آزمون MTT بر سلول‌های سرطانی که در مجاورت غلظت‌های مختلف آب میوه قرار گرفته بودند، مشخص گردید که سلول‌های سرطانی توان زیستی خود را از دست داده‌اند و تفاوت معنی‌داری بین اثر آب میوه نیمه‌رسیده و رسیده در سرکوبی رشد سلول‌های سرطانی دیده شد ($P < 0.05$) و اثر بازدارندگی آب میوه نیمه‌رسیده بیشتر بود (نمودار ۱).

از مقایسه نتایج حاصل از شمارش کلنی‌ها که در مجاورت غلظت ۲۵ میکرولیتر آب میوه (با توجه به نتایج آزمون توان زیستی) قرار گرفته بودند، مشخص گردید تاثیر آب میوه‌های نیمه‌رسیده و رسیده تفاوت آماری معنی‌داری در خاصیت ضد جهشی رشد کلنی نسبت به کنترل‌ها (آزید سدیم و آب مقطر) دارند ($P < 0.05$). آب میوه‌های رسیده اثر ضد جهشی متوسط و آب میوه‌های نیمه‌رسیده اثر ضد جهشی قوی داشتند، به طوری که درصد بازدارندگی جهشی در آب میوه‌های رسیده ۳۴/۳۶ درصد و در آب میوه‌های نیمه‌رسیده ۷۱/۷۱ درصد بود. برای بررسی اثر ضد سرطانی پس از اضافه کردن S₉ برای فعال شدن متابولیسم آب میوه‌ها، آزمون ایمز تکرار گردید. آب میوه‌های نیمه‌رسیده و رسیده اثر بیشتری در خاصیت ضد سرطانی زایی رشد کلنی نسبت به کنترل‌ها (آزید سدیم و آب مقطر) داشتند ($P < 0.05$).

میکروتیتر پلیت ریدر (ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland) در ۵۷۰ نانومتر مطالعه نمودیم. میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از فرمول ذیل مورد محاسبه قرار گرفت.

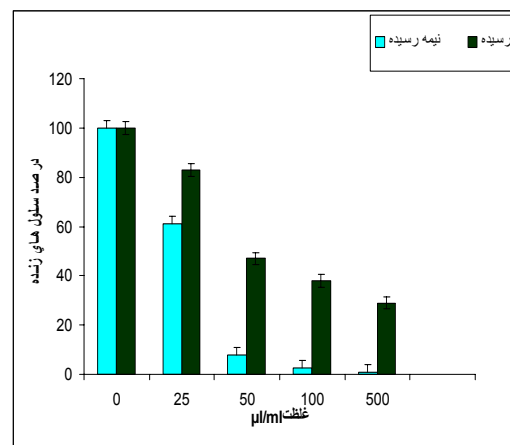
$$\begin{aligned} \% \text{Cytotoxicity} &= (1 - \text{mean absorbance of toxicant}) \times 100 / \\ &\quad \text{mean absorbance of negative control} \\ \% \text{ Viability} &= 100 - \% \text{ Cytotoxicity} \end{aligned}$$

برای کم کردن میزان خطای آزمایش در چند چاهک بدون سلول نیز رنگ MTT اضافه و سپس شستشو داده شد و همراه دیگر چاهک‌ها میزان جذب آن خوانده شد و در نهایت از کل جذب‌ها کم گردید.

از باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 برای آزمون Ames استفاده شد. سوش سالمونلا تیفی موریوم TA100 موتان محتاج به هیستیدین مستقیماً از پروفیسور ایمز دریافت شد. برای آزمون می‌بایست از کشت تازه باکتری استفاده شود و مدت زمان انکوباسیون در کشت تازه شبانه باکتری در محیط نوترینت براث نباید از ۱۶ ساعت تجاوز کند. غلظت مناسب باکتریها $10^6 \times 1-2$ سلول در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد. پس از بررسی اثر سایتوتوکسیسیته آب میوه بر روی سلول سرطانی، آزمون ایمز با اضافه کردن آب میوه به ۰/۵ میلی لیتر کشت تازه شبانه TA100 و ۰/۵ میلی لیتر محلول هیستیدین و بیوتین به میزان ۰/۵ میلی مول از هر کدام در لوله محتوی ۱۰ میلی لیتر تاپ آگار (50 gr/lit Agar + 50 gr/lit NaCl) و ماده سرطان‌زای آزید سدیم (1.5 µgr/ml Sodium azide) صورت گرفت. محتویات این لوله پس از ۳ ثانیه تکان‌دهی در سطح محیط گلوکز آگار حداقل (گلوکز ۴۰ درصد) گسترده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد. در این آزمون پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون ۳۷ درجه سانتی‌گراد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های آزمایشی و کنترل شمارش شدند و در نتایج پس از تبدیل زاویه‌ای به روش تجزیه واریانس مقایسه گردیدند.

بسیاری از مواد در شکل اصلی خود از نظر جهش‌زایی و سرطان‌زایی غیر فعالند و بسیاری از ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی (سرطان‌زایی) از نظر متابولیسمی می‌بایست فعال شوند؛ لذا افزودن آب میوه استریل به عصاره میکروزمی سلول‌های کبد پستانداران مانند موش الزامی است. بر این اساس پس از ۲۴ ساعت گرسنگی ۱۰ موش نر، کبد آنها جدا گردید. گرسنگی باعث تحریک ترشح آنزیمهای کبدی

همچنین تفاوت معنی داری بین تاثیر آب میوه های نیمه رسیده و رسیده وجود داشت ($P < 0.05$)، البته هر دوی آنها اثر ضد سرطانی قوی داشتند و درصد بازدارندگی سرطان زایی در آب میوه های رسیده ۵۰ درصد و در آب میوه های نیمه رسیده ۸۳/۳۳ درصد بود.



نمودار ۱ - نتایج توان زیستی سلولهای سرطانی پس از تیمار با آب میوه رسیده و نیمه رسیده

آزمایشاتی بر روی نوبیلتین (فلاونوئید موجود در پوست مرکبات) مشخص گردید که این ماده فعالیت ضد سرطانی، ضد ویروسی و ضد التهابی دارد (۱۸). در سال ۲۰۰۶ با جداسازی لیمونوئیدهای مرکبات اثر ضد سرطانی آنها بر روی سلول های سرطانی نوروبلاستوما (SH-SY5Y) و آدنوکارسینوما (Caco-2) به روش MTT تایید شد و مشخص گردید نوروبلاستوما حساسیت بیشتری دارد (۱۹). طی مطالعه ای مشخص گردید القای آپوپتوزیس با فعال سازی مسیر کاسپازی انجام می شود (۲۰). مسیرهای انتقال سیگنال ها که باعث آغاز فعال شدن آبشاری آنزیم های بنام کاسپاز می گردد، آسیب های سلولی که افزایش نفوذ پذیری غشاء میتوکندری ها و فعال شدن آنزیم های کاسپازی اتفاق می افتد، آسیب DNA که منجر به تجمع پروتئین P53 و تسهیل ترمیم DNA توسط پروتئین فوق صورت می گیرد و مسیر آسیب های غشاء سلولی که باعث فعال شدن آنزیم اسفنگومیلیناز و نهایتا تولید عامل سرامیدی از ترکیبات لیپیدی غشاء سلول می شود، چهار سیستم اصلی در راه اندازی آپوپتوزیس می باشد (۲۴-۲۱).

با توجه به حساسیت سلول های سرطانی نوروبلاستوما، در این تحقیق نیز اثر ممانعت از رشد آب میوه لیمو شیرین بر سلول سرطانی آستروسیتوما ی انسانی به روش MTT تایید شد. در سال ۲۰۰۲ با آنالیز ترکیبات میوه مرکبات از جمله ویتامین C، بتاکاروتن، فلاونوئید، لیمونوئید و فولیک اسید خاصیت ضد سرطانی آنها مطرح شد (۲۵). با توجه به اینکه تا کنون اثر ضد جهشی و ضد سرطانی آب میوه لیمو شیرین نیمه رسیده و رسیده گزارش نشده است، در این راستا برای بررسی اثر ضد سرطانی آن از روش های آزمون توان زیستی و آزمون Ames استفاده گردید و این آزمون با توجه به تاکید های به عمل آمده بر روی استفاده از باکتری سالمونلا تیفی موریوم برای شناسایی میزان جهش زایی و ضد سرطانی مواد شیمیایی انتخاب گردید. در تحقیق حاضر لیمو شیرین نیمه رسیده و رسیده خاصیت ضد جهشی و ضد سرطانی را نشان دادند. طبق تئوری Ames که در سال ۱۹۸۲ ارائه شده است، در صورتی که تعداد کلنی ها بر روی محیط کشت کنترل مثبت (حاوی ماده جهش زا) دو برابر نمونه آزمایش باشد ماده ضد جهش زا و ضد سرطان محسوب می گردد. زمانی که درصد بازدارندگی بین ۲۵ الی ۴۰ درصد باشد، اثر متوسط فرض می شود؛ هنگامیکه درصد بازدارندگی بیشتر از ۴۰ درصد باشد، اثر ضد جهشی نمونه آزمایشی قوی است و در صورتی که کمتر از ۲۵ درصد باشد، اثر ضد جهشی منفی است که این موضوع در زمان بررسی اثر ضد سرطانی با اضافه کردن S9 برای فعال

بحث

از آنجایی که روش های معمول در درمان سرطان (جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی) علاوه بر سلول های توموری بر سلول های طبیعی در حال تقسیم نیز اثرات کشنده یا مهار تقسیم سلولی را به همراه دارد (۱۳)، در سال های اخیر استفاده از دارو های طبیعی گیاهی برای پیشگیری و درمان سرطان مطرح شده است. در این روش نه تنها سلول های توموری کنترل می شوند، بلکه به سلول های سالم آسیب رسانده نمی شود (۱۴). اثر انواع آنتی اکسیدان های خوراکی بر سرطان و بیماری های قلبی - عروقی به اثبات رسیده و مشخص شده که این مواد موجب افزایش بیش از شصت درصد طول عمر می گردند (۱۵). طی بررسی های آزمایشگاهی بر روی فلاونوئید های پلی متوکسیله از جمله تانگرتین مشخص شده است که این مواد اثرات آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی و محافظت کننده نورون ها را دارند (۱۶). در سال ۲۰۰۱ اثر لیمونین ها (فلاونوئیدها) بر چرخه سلولی بررسی و نشان داده شد که این مواد سبب تغییر در تقسیم سلولی و یا مرگ سلولی (آپوپتوزیس) می گردند که این توقف تقسیم سلولی در مرحله G1 تقسیم رخ می دهد (۱۷). در سال ۲۰۰۵ با انجام

همان‌طور که در آزمون ضد جهش‌زایی مشخص گردید، آب میوه لیموشیرین به تنهایی قادر به بروز خاصیت ضد جهشی است. در این تحقیق از آب میوه مذکور همراه با عصاره کبدی موش (S9) آزمون به عمل آمد. بسیاری از مواد ضد سرطانی تا زمانی که در یک فعالیت آنزیمی الکتروفلیک وارد نشوند، غیرفعال می‌مانند و نمی‌توانند به DNA متصل شوند. لذا چون باکتری فاقد این سیستم می‌باشد، از عصاره کبد S9 سیستم فعال سیتوکروم P-450/P-448 برای فعال‌سازی این مواد استفاده می‌شود (۲۸). همان‌طور که ملاحظه شد آب میوه همراه با عصاره کبدی S9 فعالیت ضد سرطانی دارد و درصد بازدارندگی لیمو شیرین نیمه‌رسیده نسبت به رسیده در این سیستم نیز بیشتر است. قوی‌تر بودن خاصیت ضدسرطانی آب میوه رسیده نسبت به خاصیت ضدجهشی می‌تواند حاکی از این موضوع باشد که احتمالاً ترکیباتی در آب میوه موجود است که برای فعال شدن نیاز به سیستم آنزیمی P-450/P-448 دارد.

شدن متابولیکی نیز صادق است (۱۱،۱۰). این خواص در نمونه‌های آب میوه لیمو شیرین مشاهده گردید. در بررسی اثر *in vitro* آب میوه لیموشیرین بر کشت سلولهای سرطانی مشخص گردید که آب میوه موجب سرکوب سلول‌های سرطانی می‌شود و هم‌چنین اثر آب میوه لیموشیرین نیمه‌رسیده بیشتر از لیموشیرین رسیده است. با بررسی درصد بازدارندگی یا آنتی‌اکسیدانی آب میوه‌ها مشخص گردید، هر دو نوع آب میوه‌ها اثرات بازدارندگی جهش زائی و سرطان زائی داشته و این اثر در لیموشیرین نارس بسیار بیشتر می‌باشد. در سال ۲۰۰۰ القای مرگ سلولی یا آپوپتوزیس در سلولهای سرطانی HL-60 توسط فلاونوئید موجود در لیمو گزارش گردید (۲۶). در سال ۲۰۰۷ پیشنهاد شد تغییرات pH در سلول‌های سرطانی می‌تواند خاصیت ضدسرطانی داشته باشد (۲۷). همسو با گزارش مذکور تصور می‌کنیم که علت تاثیر بیشتر میوه نیمه‌رسیده مربوط به تفاوت مقدار فلاونوئیدها یا pH در این آب میوه‌ها می‌باشد.

REFERENCES

1. Moller P, Wallin H, Knudsen LE. Oxidative stress associated psychological stress and life-style factor. *Chem Bio Interact* 1996;102:1-36
2. Namiki M. Antioxidants/antimutagenes in foods. *Crit Rev.Food Sci Nutr* 1990;29:273-300.
3. McCord JM. Free radicals and prooxidants in health and nutrition. *Food Technol* 1994;48:106-10.
4. Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidant: What role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr* 2000;72:637-46.
5. Fujiki H, Suganuma M, Imai K, Nakachi K. Green tea: Cancer preventive beverage and /or drug. *Cancer Lett* 2002;188:9-13
6. Chen SC, Chung KT. Mutagenicity and antimutagenicity studies of Tannic acid and related compounds. *Food Chem Toxicol* 2000;38:1-5.
7. Ghasemian A, Mehrabian S, Majd A. Peel Extracts of two Iranian cultivars of Pomegranate(*punica granatum*) have antioxidant and antimutagenic activities. *Pak J Biol Sci* 2006;7:1402-405.
8. Jacob R, Hasegawa Sh, Manners G. The potential of Citrus Limnoids as anticancer agents. *perishables Handling Quarterly* 2000;102:6-8.
9. Mazaki M, Ishii T, Uyeta M. Mutagenicity of hydrolysates of citrus fruit juices. *Mutat Res* 1982;101:283-91.
10. Ames BN. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 1976;31:347-49.
11. Ames BN, Durston WE, Yamasaki E, Lee FD. Carcinogenes are mutagens: A simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc Natl Acad Sci* 1973;70:2281-85.
12. Ong T, Wong WZ, Stewart JD, Brockman HE. Chlorophyllin: A potent antimutagen against environmental and dietary complex mixture. *Mutat Res* 1986;173:111-15.
13. Chabner BA, Friedman MA. Progress against rare and not so-rare cancer. *New Engl J Med* 1992;236:564-68.
14. Franks LM, Teich NM. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. New York: Oxford university press; 1997.
15. Sunj J, Chu YF, Wu X. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. *J Agric Food Chem* 2002;25:7449-54.
16. Bennett JP, Gompert S, Wollenweber E. Inhibitory effects of natural inflavonoids on secretion from mast cells and neutrophils. *Arzneimittelforschung* 1981;31:433-37.

17. Nijveldt RJ, Nood EV, Boelens PG. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74:418-25.
18. Li S, Yu H, Ho CT. Nobiletin: efficient and large quantity isolation from orange peel extract. *Biomed Chromatogr* 2006;20:133-38.
19. Poulou SM, Harris ED, Datil BS. Anti-proliferative effects of Citrus Limonoids against Human Neuroblastoma and colonic adenocarcinoma cells. *Nutr Cancer* 2006;56:103-12.
20. Poulou SM, Harris ED, Patil BS. Citrus limonoids induce apoptosis in human neuroblastoma cells and have radical scavenging activity. *Am Soci Nutr Sci* 2005;135:870-77.
21. Lynch DH, Ramsdell F, Alderson MR. Fas and FasL in the homeostatic regulation of immune responses. *Immuol Today* 1995;16:569-574.
22. Nozawa K. Soluble Fas (apo- 1, CD95) and soluble Fas ligand in rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 1997;40:1126-29.
23. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben- Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nucleow DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
24. Kerr JFR, Searle J, Harmon BV, Bishop CJ. Apoptosis. In: Potten CS (ed). *Perspectives on mamalian cell death*. Oxford : Oxford University Press; 1987: 93.
25. Sillani J. Anticancer and health protective properties of fruit components. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002;11:79-84.
26. Ogata S, Miyake Y, Yamamoto K, Okumura K, Taguchi H. Apoptosis induced by the flavonoid from lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) and its metabolites in HL-60 cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000;64:1075-78.
27. Gross L. Manipulating cellular pH suggests novel anticancer therapy. *PLoS Biol* 2007;5: e10
28. Hakura A, Shimada H, Nakajima M, Sui H, Kitamoto S, Suzuki S, et al. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis* 2005;20:217-28.