

ORIGINAL RESEARCH

The Effect of Cisplatin and Eucalyptus Extract on KRAS Gene Expression in A549 Cell Line of Lung Cancer

Mahsa Kavousi^{1*} , Ehsan Rahimi¹ , Jalil Fallah Mehrabadi² 

1. Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Lister Laboratory of Microbiology, Tehran, Iran.

ARTICLE INFORMATION

Article history

Received: 11 December 2018

Accepted: 20 April 2019

Published online: 10 June 2019

Keywords

Cisplatin

Eucalyptus extract

KRAS gene

Lung cancer

* Corresponding Author:

Mahsa Kavousi, P.O. Box 1866113118, Department of Biology, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Ghiamdasht Town, Imam Reza Highway, Tehran, Iran.

Fax: +98 21 3358 4011

Email: mkavoosi@iauet.ac.ir

ABSTRACT

Background and Aim: Lung cancer is one of the most contagious cancers in all of the world. Recently, several potential oncogenes and carcinogens have been identified, including EGFR, BRAF, KRAS and ALK genes. With due attention to the high prevalence of lung cancer, its death rate, the complications of chemotherapy and the efforts to find effective and less effective drugs, this study was done to investigate the effect of a plant extract so that results are available to manufacturing centers.

Materials and Methods: In this study, the effect of Eucalyptus extract and cisplatin on the expression of KRAS gene in A549 lung cancer cell line was investigated. To determine the cell survival, MTT was used and IC50 was determined. After determining IC50, the cells were exposed to less than IC50 concentrations of the extract and drug for 48 hours. Then, the amount of β -ACTIN and KRAS genes expressions in control and extract treated and drug treated groups were determined. For this purpose, a specific primers were designed for β -ACTIN and KRAS, and Real-Time PCR was done.

Ethical Considerations: This study with research ethics code IR.IAU.East Tehran.REC.1396.3 has been approved by research ethics committee at Islamic Azad University, Tehran- East Branch, Iran.

Findings: The results showed that the amount of IC50 of the extract and drug was 8.75 and 1.77 mg/ml, respectively. In addition, the expression of genes in control and treated cells with extract and drug was compared. The expression of the KRAS gene relative to the reference gene in the cancer cell line treated with extract and drug, for 48 hours, was significantly decreased 2.89 and 9.25, respectively ($p = 0$).

Conclusion: Regarding the reduction of the relative gene expression in the A549 treated group, future studies on targeted lung cancer treatment can be promising and the potential for the use of plant compounds is more evident.

© Copyright (2019) Arak University of Medical Sciences

Use your device to scan and read this article online:



Kavousi M., Rahimi E., Fallah Mehrabadi J. The Effect of Cisplatin and Eucalyptus Extract on KRAS Gene Expression in A549 Cell Line of Lung Cancer. J Arak Uni Med Sci. 2019; 22(2): 84-95.



JAMS

مجله دانشگاه علوم پزشکی اراک

دوره بیست و دو، شماره دو، خرداد و تیر ۱۳۹۸

journal homepage: <http://jams.arakmu.ac.ir>



مقاله پژوهشی

بررسی اثر داروی سیس پلاتین و عصاره اوکالیپتوس بر روی بیان ژن KRAS در رده سلولی A549

سرطان ریه

مهسا کاوسی^{۱*}، احسان رحیمی^۱، جلیل فلاح مهرآبادی^۲

۱. گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. آزمایشگاه میکروبی شناسی لیستر، تهران، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: سرطان ریه یکی از همه گیرترین سرطان‌ها در سراسر جهان است. اخیراً چند انکوژن بالقوه شناخته شده‌اند که شامل KRAS، BRAF، EGFR و ژن ALK هستند. با توجه به شیوع بالای سرطان ریه، میزان مرگ ناشی از آن، عوارض شیمی‌درمانی و تلاش برای یافتن داروهای مؤثر و با عوارض کمتر، تحقیق حاضر با این هدف انجام شد که تأثیر یک عصاره گیاهی را بررسی کرده تا نتایج آن در اختیار مراکز تولیدی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، تأثیر عصاره اوکالیپتوس و داروی سیس پلاتین بر روی میزان بیان ژن KRAS در رده سلولی A549 سرطان ریه بررسی شد. به منظور تعیین زنده‌مانی سلول‌ها از روش MTT استفاده و IC50 تعیین شد. پس از تعیین IC50 سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت در معرض تأثیر غلظتی کمتر از IC50 عصاره و دارو قرار گرفتند. سپس میزان بیان ژن KRAS نسبت به ژن کنترل β -ACTIN در گروه‌های کنترل و تیمار با عصاره و دارو تعیین شد. بدین منظور، پرایمر اختصاصی برای ژن β -ACTIN و KRAS طراحی و Real-Time PCR انجام شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه با کد IR.IAU.East Tehran.REC.1396.3 در کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق به تصویب رسیده است.

یافته‌ها: نتایج نشان داد میزان IC50 عصاره و دارو به ترتیب ۸۵/۷ و ۱/۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بوده است. هم‌چنین، میزان بیان ژن‌ها در سلول‌های تیمار شده و کنترل با عصاره و دارو مقایسه گردید. بیان نسبی ژن KRAS به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی تیمار شده با عصاره و دارو به ترتیب به میزان ۲/۸۹ و ۹/۲۵ برابر طی ۴۸ ساعت به‌طور معنی‌دار ($p=0$) کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: با توجه به کاهش بیان نسبی ژن در رده A549 تیمار شده می‌توان به مطالعات آینده در خصوص درمان هدف‌مند سرطان ریه امیدوار بود و از این‌رو پتانسیل استفاده از ترکیبات گیاهی آشکارتر شود.

اطلاعات مقاله

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۹/۲۰

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۳۱

تاریخ انتشار: ۹۸/۰۳/۲۰

واژگان کلیدی

ژن KRAS

سرطان ریه

سیس پلاتین

عصاره اوکالیپتوس

* نویسنده مسئول:

مهسا کاوسی

آدرس پستی: ایران، تهران، بزرگراه امام رضا،

شهرک قیامدشت، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

تهران شرق، گروه زیست‌شناسی.

کد پستی: ۱۸۶۶۱۱۳۱۱۸.

نمابر: +98 21 3358 4011

E-mail: mkavoosi@iauet.ac.ir

۱. مقدمه

سرطان ریه در ابتدا در مردان شایع بود، اما امروزه مرگ در اثر سرطان ریه در زنان، از مرگ در نتیجه سرطان پستان پیشی گرفته است (۱). در حالی که رابطه بین مصرف سیگار و سرطان ریه به خوبی مشخص است، اما آمارها نشان می‌دهد که سرطان ریه فرآیندی چند عاملی می‌باشد (۲). محققان مختلف اثبات کرده‌اند که باید بیش از بیست تغییر ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی مختلف تجمع یابند تا سرطان ریه ایجاد شود. در بین ژن‌های ایجادکننده تومور، انکوژن‌ها اولین ژن‌هایی بودند که شناسایی شدند. آن‌ها برای ایجاد سرطان به عوامل دیگری مانند جهش در ژن‌های دیگر یا فاکتورهای محیطی مثل عفونت ویروسی نیاز دارند (۳). یکی از انکوژن‌ها گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمال (*EGFR*) یا *ERB-I* است که پس از اتصال لیگاند دمین تیروزین کیناز درون سلولی، فعال شده و فسفریله می‌گردد. پیام‌رسانی *EGFR* برای تکثیر طبیعی سلولی ضروری است، اما اختلال در تنظیم آن موجب سرطان‌زایی، رگ‌زایی جدید، متاستاز و مهار آپوپتوز می‌گردد. در سرطان سلول غیر کوچک ریه (NSCLC) پیشرفته، *EGFR* افزایش بیان یافته یا با میزان بقای کم و مقاومت به مواد شیمی درمانی از قبیل سیس‌پلاتین مرتبط است (۴). خانواده *RAS* در انتقال پیام‌های پیش‌برنده رشد از غشاً به هسته و تکثیر سلولی بسیار مهم هستند. ژن‌های خانواده *RAS* شامل ژن‌های *HRAS*، *KRAS* و *NRAS* می‌باشد. ژن‌های *RAS* چهار پروتئین بسیار همولوگ به نام P21 را رمز می‌کنند که به غشای پلاسمایی متصل شده و می‌تواند از آن‌جا با فعال‌کننده‌های بالادست و هدف‌های پایین‌دست میان‌کنش داشته باشد. پروتئین‌های *RAS* در حالت فعال به GTP متصل شده و با فعالیت GTPase ذاتی و تغییر شکل فضایی *RAS*، GTP به GDP هیدرولیز می‌گردد و *RAS* پس از میان‌کنش با سوبسترای خود به حالت غیرفعال خود باز می‌گردد. این مسیر انتقال پیام را گاهی آبشار میتوزنیک SOS-RAS-RAF-MAPK نیز می‌نامند. جهش‌های نقطه‌ای در ژن *RAS* در سلول‌های بدخیم می‌تواند پروتئین *RAS* را در فعالیت GTPase دچار نقص کند. اکثر این جهش‌ها $G \rightarrow T$

است که توسط بنزو پیرن دی اتیل اکسید، نیتروز آمین‌ها و مواد دیگری که در دود تنباکو وجود دارد ایجاد می‌شود (۵). پروتئین‌های تنظیم‌کننده *RAS* به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند: عوامل مبادله نوکلئوتید گوانین (GEF_s) و پروتئین‌های فعال‌کننده $GTPase$ (GAP_s). GEF_s مسئول تبدیل GDP به GTP هستند و کیفیت پیوند GTP فعال از پروتئین *RAS* را ارتقا می‌دهند، از آن‌جایی که GAP_s هیدرولیز GTP را تحریک می‌کنند، کیفیت پیوند GDP غیرفعال از پروتئین *RAS* را ارتقا می‌دهند. یکی از ژن‌هایی که غالباً در آدنوکارسینوما جهش پیدا می‌کند، *KRAS* است که تقریباً در ۳۰ درصد آدنوکارسینوما ریه (۳۴ درصد در سیگاری‌ها و ۶ درصد در غیرسیگاری‌ها) جهش می‌یابد و بنابراین بسیار مورد توجه است (۶). در این تحقیق، به دلیل میزان بیان بالا در سرطان ریه، این ژن انتخاب شده است. هم‌چنین از داروی سیس‌پلاتین استفاده شد که دارویی بر اساس شیمی درمانی پلاتینوم بوده و برای درمان در مراحل انتهایی سرطان سلول غیر کوچک ریه استفاده می‌شود. سه مسیر متابولیسمی شناسایی شده که در میزان تأثیر سیس‌پلاتین روی سرطان سلول غیر کوچک ریه نقش دارند، شامل: تقویت سیستم ترمیم حذفی نوکلئوتیدی، کاستن از جذب انتقال‌دهنده‌های مس و کاهش گلوکوتیون ترانس‌فرازها (۷). سیس‌پلاتین از طریق اتصال به سایر ماکرومولکول‌ها و با مکانیسم جذب گذرا می‌تواند وارد سلول شود. هم‌چنین این دارو با واسطه انتقال فعال مس می‌تواند وارد سلول گردد. وقتی دارو وارد سلول شد می‌تواند به صورت تجمع یافته درآمده و به سلول شارژ مثبت دهد. در این حالت دارو می‌تواند با DNA واکنش داده، پیوندهای تقاطعی را شکل دهد تا هلیکس DNA از هم باز شود. این موضوع باعث مهار همانندسازی DNA شده و در نهایت سلول توموری دچار آپوپتوز و نکروز می‌شود (۸). بیش از ۹۰ درصد ترکیباتی که در نتیجه تداخل سیس‌پلاتین با DNA شکل می‌گیرد d(GpG) و d(ApG) هستند. این ترکیبات و پیوندهای تقاطعی ایجاد شده می‌توانند توسط سیستم ترمیم حذفی نوکلئوتیدی شناسایی شوند. بعد از شناسایی این آسیب‌ها، یک کمپلکس مولکولی

گفت با وجود تحقیقات صورت گرفته در مورد حضور SNPها در ژنهای ذکر شده، تاکنون فقط نقش ژن *ERCC1* به عنوان یک بیومارکر اندازه گیری حساسیت و مقاومت سلول به سیس پلاتین شناخته شده است و تحقیق در مورد سایر ژنها ادامه دارد (۱۱). در کنار داروهای شیمیایی، داروهای گیاهی به عنوان یک شیوه درمانی مکمل یا جایگزین برای معالجه سرطان نیز کاربرد دارند. آمار نشان می دهد که از بین هر ۱۰ فرد مبتلا به سرطان، حدود ۶ نفر در کنار شیوه های درمانی مرسوم از داروهای گیاهی نیز استفاده می کنند (۱۲). اوکالیپتوس با نام علمی *Eucalyptus camadulensis* Dehnh. درختی از تیره Myrtaceae می باشد. روغن اوکالیپتوس برای سرفه، برونشیت و روماتیسم و برگ اوکالیپتوس برای سرفه و برونشیت مفید می باشد. داروهای گیاهی با سابقه استفاده در طی قرن ها به عنوان روشی جایگزین یا مکمل در نظر گرفته می شوند که به بیماران کمک می کند تا وضعیت جسمی و روانی بهتری داشته باشند (۱۳). روغن اکالیپتوس اثر ضد تکثیر سلول های سرطانی دارد. روغن های اساسی در سلول های سرطانی مسیرهای چندگانه در فعالیت ضد تکثیر سلول را فعال می کنند. اهمیت استفاده از روغن های اساسی به عنوان عوامل مناسب ضد سرطان از آن جا ناشی می شود که عوارض جانبی وسیع و آشکاری در سلول های عادی بدن ندارند (۱۴). ترکیباتی که در روغن اساسی اکالیپتوس وجود دارند سطوح ROS را افزایش می دهند. ROS در داخل سلول ها در پاسخ به محرک های محیطی یا استرس در شرایط عادی تولید می شوند. افزایش سطوح ROS در سلول های غیر عادی، آن ها را وادار به آپوپتوز می کند (۱۵).

با توجه به موارد مطرح شده در خصوص شیوع بالای سرطان ریه، میزان مرگ ناشی از آن، عوارض شیمی درمانی و از سوی دیگر تلاش برای یافتن داروهای مؤثر و با عوارض کمتر، تحقیق حاضر با این هدف انجام شد که تأثیر یک عصاره گیاهی و داروی سیس پلاتین به صورت مقایسه ای بر روی میزان بیان ژن *KRAS* بررسی گردد.

شامل پروتئین ترمیمی ERCC1 و پروتئین های XPF شکل می گیرد و یک محدوده ۲۳ نوکلئوتیدی واقع در بالادست ناحیه آسیب دیده حذف می شود. رده های سلولی که فاقد این دو پروتئین هستند حدود ۴۰ برابر بیشتر به داروی سیس پلاتین حساس هستند. این موضوع اهمیت این پروتئین ها را نشان می دهد و این که وجود پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در ژن های مربوطه می تواند در میزان حساسیت به سیس پلاتین نقش داشته باشد (۹). سلول های مقاوم به سیس پلاتین نسبت به تجمع دارو در داخل خودشان مقاوم هستند. همچنین سلول های مقاوم به دارو می توانند مس را وارد و دارو را خارج سازند. جذب مس به داخل سلول با واسطه پروتئین hCTR1 صورت می گیرد که این پروتئین توسط ژن *CTR1* (یا *SLC31A*) کد می شود. نتیجه تحقیقات نشان داده است که سلول های مقاوم به سیس پلاتین میزان mRNA کمتری از ژن *CTR1* دارند. کاهش بیان این ژن سبب ایجاد مقاومت سلول به سیس پلاتین می شود. می توان از اندازه گیری میزان بیان این ژن به این مسئله پی برد که سلول تا چه حد به سیس پلاتین مقاوم است و از آن به عنوان بیومارکر استفاده نمود. البته شواهد بالینی بیشتری برای نتیجه گیری این موضوع لازم است. تجمع داخل سلولی مس توسط دو پروتئین تنظیم می شود: *ATP7A* و *ATP7B*. سلول های سرطان سلول غیر کوچک ریه میزان بالایی از این دو پروتئین را تولید می کنند. به عبارت دیگر، وجود پلی مورفیسم های تک نوکلئوتیدی در میزان بیان این پروتئین ها دخالت دارند (۱۰). گلوکوتایون ترانس فرازاها در سم زدایی سلول از سیس پلاتین و کمک به شکل گیری ترکیب پلاتینوم-گلوکوتایون غیر فعال نقش دارند. تحقیقات نشان داده است که نقص در ژن های *GST* باعث کاهش سم زدایی ترکیبات پلاتینوم مانند سیس پلاتین در داخل سلول شده و در نتیجه سلول به سیس پلاتین حساسیت بیشتری نشان می دهد. به دنبال این موضوع، میزان تجمع سیس پلاتین در داخل سلول بیشتر می شود. باز هم در این جا حضور SNP ها در ژن های کد کننده *GST* باعث بروز حساسیت متفاوت سلول های سرطانی در واکنش به درمان با سیس پلاتین می شود. در نهایت می توان

۲. مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهی

گیاه اوکالیپتوس از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. عصاره گیاهی در این پژوهش از روش خیساندن تهیه شد. در این روش به ازای هر ۲۰ گرم گیاه از ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد استفاده و پس از فیلتر توسط کاغذ صافی واتمن، حلال تا زمان تبخیر کامل در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. جهت فراهم نمودن استوک اولیه از عصاره گیاه، ۰/۵ گرم از عصاره استخراج شده در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت (RPMI 1640) حل شده و مورد استفاده قرار گرفت. لازم است عصاره تهیه شده در ظروف پوشیده شده با ورقه آلومینیومی نگهداری شده تا از اکسید شدن آن ممانعت به عمل آید. ۵ میلی‌لیتر FBS به همراه ۵۰۰ میکرولیتر پِنسترپ داخل لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتر استریل ریخته شد و با افزودن محیط کشت، حجم آن روی ۵۰ میلی‌لیتر تنظیم گردید.

کشت رده سلولی A549

رده سلولی A549 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران خریداری شد. جهت نگهداری سلول‌ها، می‌توان آن‌ها را به‌طور منظم پاساژ داد. پس از شمارش سلول‌های A549، حجمی از سوسپانسیون سلولی که حاوی 10^4 سلول می‌باشد به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه منتقل شده و مقداری محیط کشت کامل روی آن اضافه گردید و برای حدود ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. جهت خشک کردن عصاره اوکالیپتوس قبل از تیمار با سلول‌ها چند میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر به‌صورت جداگانه توزین شد. ۵۰۰ میکرولیتر از عصاره که به خوبی مخلوط شده بود داخل هر تیوب ریخته و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌صورت در باز نگهداری شد تا عصاره کاملاً خشک گردید. سپس میکروتیوب‌های حاوی عصاره خشک مجدداً توزین شد که اختلاف وزن میکروتیوب معرف وزن عصاره خشک می‌باشد. عصاره خشک شده در یک میکروتیوب توسط ۱ میلی‌لیتر محیط کشت کامل، به آرامی و به کمک سمپلر به‌صورت سوسپانسیون درآمد.

انجام MTT Assay

برای بررسی تأثیر عصاره اوکالیپتوس و داروی سیس‌پلاتین بر روی بقای رده سلولی A549 از روش MTT Assay استفاده شد. به منظور تیمار سلول‌ها و بررسی بیان ژن‌های موردنظر، باید IC_{50} را به‌دست آورد. برای این کار با استفاده از MTT Assay، چندین غلظت مختلف از عصاره و دارو به سلول‌ها اثر داده شد. معرف MTT یک نمک تترازولیوم زرد رنگ است. میتوکندری سلول‌های فعال متابولیک آن را جذب کرده و در اثر فعالیت آنزیم‌های دهیدروژناز، بلور فورمازان بنفش رنگ تولید می‌شود که در حلال مناسب حل شده و میزان رنگ تولیدشده با اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری می‌شود. برای هر نوع سلولی باید با رسم منحنی استاندارد خطی، رابطه متناسبی از تعداد سلول و رنگ تولید شده محاسبه گردد. ۱۰۰ میکرولیتر از سلول‌ها در ظرف کشت ۹۶ خانه در محیط کشت، حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. هر کدام از رقت‌های عصاره و داروی سیس‌پلاتین به چاهک‌های جداگانه به‌صورت ۳ تکرار اضافه شدند. انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت ادامه یافت. ۲۰ میکرولیتر از محلول رنگ MTT به هر چاهک اضافه شده و انکوباسیون به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. مایع رویی حذف شده و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شد. بعد از پیپتاژ، جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از ELISA Reader خوانده شد.

سیس با توجه به این‌که برای هر غلظت عصاره، داروی سیس‌پلاتین و هم‌چنین برای کنترل، سه بار تست تکرار شده بود، از این‌رو، از سه جذب حاصل میانگین گرفته شد و به کمک فرمول زیر درصد تأثیر عصاره و داروی سیس‌پلاتین روی مرگ سلولی در هر غلظت تعیین گردید:

$$\left(\frac{OD_{\text{treated}}}{OD_{\text{untreated}}} \right) \times 100 = \text{the \% inhibition}$$

در نهایت با رسم منحنی نقطه‌ای در نرم افزار اکسل و تعیین بهترین خط ممکن و با کمک فرمول خط، میزان غلظتی از

میکرولیتر با هم مخلوط شدند. ۱۰ میکرولیتر از RNA به هر لوله افزوده و ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و بعد بلافاصله در یخ قرار داده شد. پس از حدود دو دقیقه مخلوط واکنش با مقادیر Nuclease free water به حجم ۴/۵ میکرولیتر، M-MuLV 10X buffer به حجم ۲ میکرولیتر، M-MuLV (۲۰۰ واحد بر میکرولیتر) به حجم ۰/۵ میکرولیتر تهیه و به هر لوله به مقدار ۷ میکرولیتر از این مخلوط اضافه گردید، به طوری که حجم نهایی واکنش در نهایت ۲۰ میکرولیتر شد. واکنش به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

طراحی پرایمر و انجام Real-Time PCR

پرایمرهای پژوهش حاضر با استفاده از نرم‌افزارهای Gene runner و Allele ID طراحی شد. توالی mRNA ژن‌های مورد نظر از مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) به دست آمد و اتصال صحیح پرایمرها به توالی مربوطه بررسی شد و سپس اتصال پرایمرها به توالی‌های دیگر توسط برنامه Blast در NCBI مورد بررسی قرار گرفت.

لازم به ذکر است که پرایمرها پس از بررسی توسط همین نرم‌افزار جهت ساخت به شرکت ماکروژن سفارش گردید. پرایمرها با آب مقطر استریل به حجم مورد نظر (۱۰۰ پیکومول بر میکرولیتر) رسید و رقت یک دهم از هر پرایمر تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. توالی پرایمرهای مورد بررسی در جدول ۱ آمده است.

عصاره و سیس‌پلاتین که IC_{50} برای آن دوره زمانی محاسبه گردید ۴۸ ساعت به دست آمد. سپس تیمار رده سلولی با عصاره گیاهی و داروی سیس‌پلاتین انجام شد.

استخراج RNA و سنتز cDNA پس از انجام تیمار با عصاره و دارو، RNA با استفاده از روش RNX-Plus استخراج شد. برای استخراج RNA از کیت BIOZOL Total RNA Extraction Reagent شرکت Bioflux (Bioer technology Co. Ltd) استفاده شد. خلوص و غلظت RNA استخراج شده توسط NanoDrop Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) بررسی شد و طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر برای تمام نمونه‌ها بین ۱/۷ تا ۱/۹ بود. کیفیت RNA توسط ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. حضور باندهای RNA ریبوزومی 18S و 28S نشان‌دهنده سالم بودن و دست نخورده بودن RNA است. نمونه‌هایی با کیفیت عالی، حداقل اسمیر را در بالا، بین و پایین باندهای مذکور نشان می‌دهند و شدت باند 28S تقریباً دو برابر شدت باند 18S می‌باشد. فقدان باندهای واضح 18S و 28S نشان‌دهنده تجزیه‌ی نمونه RNA توسط آنزیم RNase است، به خصوص اگر حالت اسمیر محدود به بخش تحتانی ژل باشد. برای سنتز cDNA از کیت Revert Aid First Stand cDNA Synthesis Kit شرکت Thermo Scientific استفاده شد. مواد لازم برای سنتز cDNA، Random Hexamer (۴۰ میکرومول) به حجم ۱ میکرولیتر، Oligo dt (۱۰۰ میکرومول) به حجم ۱ میکرولیتر و dNTP (۱۰ میلی‌مول) به حجم ۱

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در تحقیق حاضر

ژن	پیشرو	پسرو	طول محصول (bp)
β -ACTIN	5'-TCCTCCTGAGCGCAAGTAC-3'	5'-CGGTGGACGATGGAGGGGCC-3'	123
KRAS	5'-TGAGGACTGGGGAGGGCTTT-3'	5'-ACCATAGGTACATCTTCAGAG-3'	121

با استفاده از شیب خط منحنی به دست آمده و رابطه زیر بازده واکنش برای هر پرایمر محاسبه شد:

$$E = 10^{(-1/\text{slope})} - 1$$

E= بازده واکنش

Slope= شیب خط منحنی

تست PCR برای هر تکرار در نمونه‌های تیمار و کنترل به طور جداگانه برای بررسی ژن‌های β -ACTIN و KRAS انجام شد.

کمک فرمول بهترین خط، میزان IC_{50} داروی سیسپلاتین و عصاره در دوره زمانی ۴۸ ساعت به دست آمد. سپس RNA سلول‌هایی که به مدت ۴۸ ساعت تحت تاثیر عصاره و دارو قرار گرفتند استخراج شد.

به منظور کسب اطمینان از عدم تجزیه RNA ی استخراج شده، کیفیت نمونه‌های RNA به کمک الکتروفورز ژل آگارز و کمیت آن‌ها با اسپکتروفتومتری بررسی شد. در بررسی ژل دو باند 18S و 28S RNA ی ریبوزومی به وضوح مشاهده شد که بیان‌گر عدم تجزیه RNA می‌باشد.

در بررسی با اسپکتروفتومتری نیز نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر، ۳۸۰ نانوگرم بر میکرولیتر به دست آمد که نشان‌دهنده درجه خلوص بالای RNA و نیز آغستگی کم آن با پروتئین و DNA ژنومی می‌باشد.

در مجموع، این نتیجه حاکی از آن است که RNA ی استخراجی می‌تواند با اطمینان در مراحل بعدی تحقیق استفاده شود. قبل از انجام Real-Time PCR ضروری است که پرایمرهای طراحی شده با استفاده از روش Conventional PCR مورد ارزیابی قرار گیرند تا عملکرد آن‌ها بررسی گردد. این کار با استفاده از سایت NCBI و نرم‌افزار Primer-BLAST انجام شد. سپس در ادامه، واکنش PCR با پرایمرهای مذکور انجام شد.

با بررسی منحنی ذوب ژن‌ها می‌توان گفت که هیچ‌گونه آلودگی در نمونه‌های تکثیر یافته وجود نداشته است (نمودار ۳ و ۴). در نهایت، نتایج با استفاده از نرم‌افزار REST 2009 نسخه ۲,۰,۱۳ آنالیز گردید. مقایسه میزان بیان ژن‌های *KRAS* و *β -ACTIN* در تیمار عصاره اوکالیپتوس و داروی سیسپلاتین در نمودار ۵ و جدول ۲ مشخص شده است.

میزان بیان ژن *β -ACTIN* همواره ثابت است و تغییرات میزان بیان ژن *KRAS* با آن مقایسه می‌شود.

همان‌طور که در جدول ۲ مشخص است، چون ژن مرجع، تغییرات میزان بیان ندارد، ستون نتیجه مربوط به آن خالی است.

ترکیب فوق به آرامی مخلوط و Spin شد و پروتکل ترموسایکلر توسط دستگاه Thermocycler convergent-Great Bratin انجام شد.

قبل از انجام واکنش Real-Time PCR، نیاز است تا کارایی پرایمرها بررسی شده و منحنی استاندارد رسم شود. ابتدا از cDNA های هر گروه رقت‌های ۱ به ۱، ۱ به ۵، ۱ به ۲۵ و ۱ به ۱۲۵ تهیه شد. سپس واکنش Real-Time PCR به صورت دوبرار تکرار برای این رقت‌ها همراه با هر کدام از پرایمرها به صورت جداگانه انجام شد.

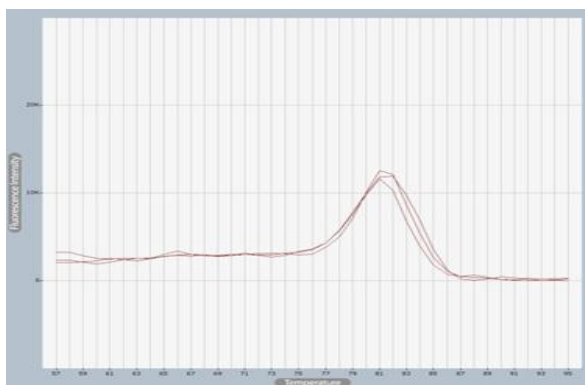
در پایان، منحنی استاندارد برای هر پرایمر، بر اساس مقادیر Ct به دست آمده در مقابل رقت‌های مورد استفاده رسم گردید. درون هر میکروتیوپ مواد لازم در مقادیر ارائه شده اضافه شد. تکثیر ژن‌ها صورت گرفته و تعیین کمیت نسبی در آن به وسیله اندازه‌گیری میزان افزایش نور فلوروسانس در اثر اتصال سایر گرین توسط دستگاه ABI 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) انجام شد. سپس میزان بیان ژن با استفاده از $\Delta\Delta Ct$ محاسبه شد.

۳. ملاحظات اخلاقی

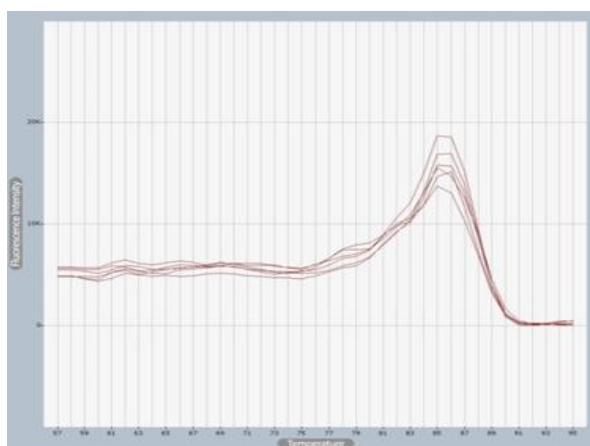
در این پژوهش، تمامی اصول اخلاق در پژوهش رعایت شده است. این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.East Tehran.REC.1396.3 توسط کمیته اخلاق پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی تهران شرق به تصویب رسیده است.

۴. یافته‌ها

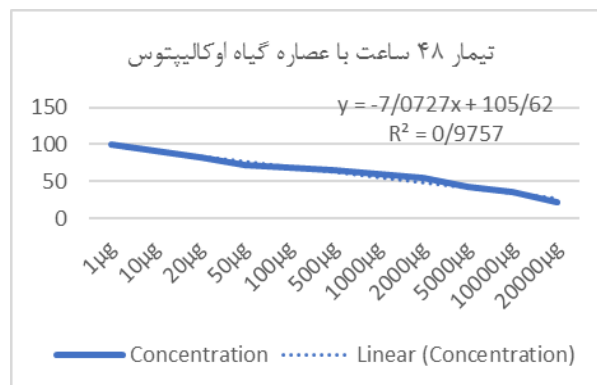
تیمار سلول‌های A549 با غلظت‌های مختلف عصاره اوکالیپتوس و داروی سیسپلاتین در غلظت‌های متوالی طی مدت ۴۸ ساعت انجام شد. بر اساس نتایج MTT غلظتی از عصاره اوکالیپتوس که ۵۰ درصد سلول‌های A549 را می‌کشد ۷/۸۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و برای سیسپلاتین ۱/۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد (نمودار ۱ و ۲). پس از ترسیم نمودار و به



نمودار ۳. نتیجه مربوط به منحنی ذوب محصول PCR ژن β -ACTIN

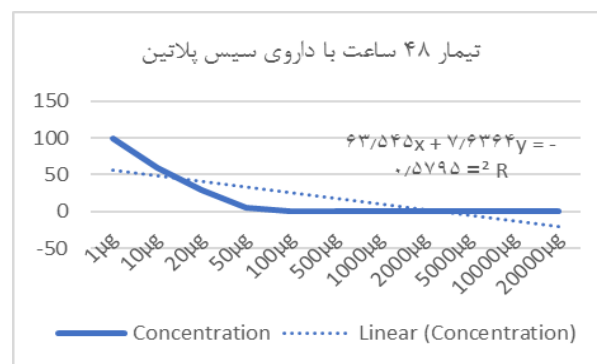


نمودار ۴. نتیجه مربوط به منحنی ذوب محصول PCR ژن KRAS



$$IC_{50} = \frac{50 - 105}{-7} = \frac{-55}{-7} = 7.85 \text{ mg/ml}$$

نمودار ۱. نمودار IC_{50} در تیمار ۴۸ ساعت با عصاره اکالیپتوس



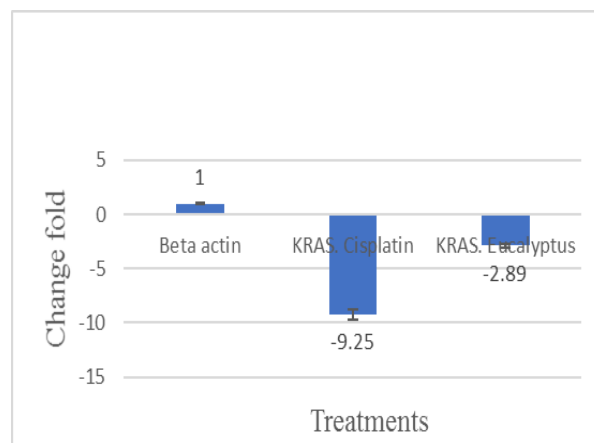
$$IC_{50} = \frac{50 - 63.54}{-7.63} = \frac{-13.54}{-7.63} = 1.77 \text{ mg/ml}$$

نمودار ۲. نمودار IC_{50} در تیمار ۴۸ ساعت با داروی سیس پلاتین

جدول ۲. نتیجه مربوط به تغییرات بیان ژن KRAS در مواجهه با عصاره و دارو

نتیجه	P(HI)	95% C.I.	خطای استاندارد	بیان	بارده واکنش	نوع	ژن
				۱	۱	REF	β -ACTIN
DOWN	۰	۰/۰۷۴ - ۰/۱۷۴	۰/۰۸ - ۰/۱۵۲	۰/۱۰۸	۱	TRG	KRAS. Cisplatin
DOWN	۰	۰/۲۰۳ - ۰/۶۱۰	۰/۲۵۲ - ۰/۴۸۱	۰/۳۴۵	۱	TRG	KRAS. eucalyptus

در نمودار ۵، همان‌طور که انتظار می‌رود تغییرات میزان بیان ژن مرجع با عدد ۱ نشان داده شده است. چون ژن مرجع همواره و در تمام سلول‌ها میان بیان ثابتی دارد. در مورد تغییرات میزان بیان ژن KRAS در سلول‌هایی که تحت تیمار با داروی سیس پلاتین بوده‌اند می‌توان مشاهده کرد که نتیجه کاهش بیان ژن بوده است. ستون نتیجه مربوط به این تیمار از جدول ۲ کاهش بیان ژن را نشان می‌دهد. با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (با مقدار عددی $0/174 - 0/074$) و مقدار $p < 0/05$ (با مقدار عددی برابر با صفر) این کاهش بیان معنادار است. همان‌طور که در نمودار ۵ مشخص است، میزان بیان ژن در سلول‌هایی که



نمودار ۵. میزان بیان ژن KRAS در تیمار سلول‌های A549 با عصاره و دارو

تحت تیمار با دارو بوده‌اند ۹/۲۵ برابر کاهش یافته است که با توجه به مقدار $p = 0$ موجود در جدول ۲ کاهش بیان ژن معنادار است. در مورد تغییرات میزان بیان ژن *KRAS* در سلول‌هایی که تحت تیمار با عصاره اکالیپتوس بوده‌اند می‌توان مشاهده کرد که نتیجه به‌دست آمده با توجه به ستون نتیجه مربوط به این تیمار از جدول ۲، کاهش بیان ژن بوده است. با ضریب اطمینان ۹۵ درصد (با مقدار عددی $0/610 - 0/234$) و مقدار $p < 0/05$ (با مقدار عددی برابر با صفر) این کاهش بیان ژن معنادار است. همان‌طور که در نمودار ۵ مشخص است، در این سلول‌ها میزان بیان ژن ۲/۸۹ برابر کاهش نشان می‌دهد که با توجه به صفر بودن مقدار p کاهش بیان ژن معنی‌دار است (جدول ۲).

۵. بحث

مطالعه‌ای بر روی تأثیر ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد سرطانی عصاره به‌دست آمده از ساقه، برگ و گل‌های دو گونه از اکالیپتوس در رده سلولی MCF7 و HepG2 انجام شد. نتیجه بررسی نشان داد که عصاره اکالیپتوس از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (۱۴). در مطالعه حاضر نیز استفاده از عصاره اکالیپتوس باعث کاهش معنادار بیان ژن *KRAS* در سلول‌های سرطانی گردید. در تحقیق دیگری که بر روی روغن‌های اساسی حاصل از گیاهان دارویی انجام شده است، نشان داده شد که این ترکیبات از طریق مسیرهای چندگانه و مکانیسم‌های درگیر در آپوپتوز عمل می‌کنند مثل توقف چرخه سلولی، داشتن ترکیبات ضد متاستازی و ضد رگ‌زایی، افزایش مقدار اکسیژن فعال و انواع نیتروژن (ROS/RNS). اثر روغن‌های اساسی و اجزای اصلی آن‌ها بر روی متوقف کردن پروتئین‌های تومور p53 و Ekt، رونویسی فاکتورهای مثل AP-1، مسیر MAPK و آنزیم‌های سم‌زدایی مثل SOD، کاتالازها، گلوکاتایون پراکسیداز و گلوکاتایون ردوکتازها مورد بررسی قرار گرفت. روغن اکالیپتوس اثر ضدتکثیر سلول‌های سرطانی دارد. روغن‌های اساسی در سلول‌های سرطانی، مسیرهای چندگانه در فعالیت ضدتکثیری سلول را فعال می‌کنند و حتی در مدل‌های حیوانی استفاده از آن‌ها به‌طور

مؤثری اندازه تومور را کاهش داده است. این امر اهمیت استفاده از روغن‌های اساسی را به عنوان عوامل مناسب ضد سرطان نشان می‌دهد که عوارض جانبی وسیع و آشکاری در سلول‌های عادی بدن ندارند. ترکیباتی که در روغن اساسی اکالیپتوس وجود دارند از دو طریق جلوگیری از تکثیر سلولی و ممانعت از مکانیسم‌های تعمیر DNA در سلول‌های سرطانی از توسعه سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کنند. روغن‌های اساسی سطوح ROS را افزایش می‌دهند. ROS در داخل سلول‌ها در پاسخ به محرک‌های محیطی یا استرس در شرایط عادی تولید می‌شوند. افزایش سطوح ROS در سلول‌های غیر عادی، آن‌ها را وادار به آپوپتوز می‌کند. چنین پاسخی در سلول سرطانی که تحت تیمار با روغن اساسی قرار گرفته است، می‌تواند به عنوان یک روش درمانی مؤثر مشاهده شود و سلول‌های سرطانی را وادار به آپوپتوز کند (۱۵). در مطالعه حاضر استفاده از عصاره اکالیپتوس باعث کاهش معنادار بیان ژن در سلول‌های سرطانی و در نتیجه تکثیر کمتر گردید. تحقیق دیگری در رده‌های سلولی Jurkat و Hella و عصاره دو گونه از جنس اکالیپتوس بر اساس آزمون MTT و در ارتباط با فعالیت سایتوتوکسیک انجام شده است. نتایج فعالیت LDH نشان داد که فعالیت سایتوتوکسیک نمونه‌ها در برابر سلول‌های Jurkat شامل مرگ سلول توسط آپوپتوزیس است (۱۶). روغن‌های اساسی حاصل از برگ‌های جوان و بالغ *E. benthamii* اثر سایتوتوکسیک در برابر رده‌های سلولی تومور نشان دادند که این اثر پتانسیل ضدتوموری آن‌ها را نشان می‌دهد؛ اگرچه ویژگی‌های دارویی و توکسولوژیکی به‌طور جامع مورد تحقیق قرار نگرفته است (۱۶). کلادوکال، یک تریترین فرمیل‌شده‌ای است که از برگ‌های گونه سلولی *E. cladocalyx* استخراج شده و اثر سایتوتوکسیک روی لاین سلولی میلونید لوکمی HL-60 نشان داده است. معمولاً برای مطالعه فعالیت دهیدروژنازی میتوکندریایی، MTT به عنوان آزمون سایتوتوکسیک انجام می‌شود (۱۶). روغن‌های فرار حاصل از برگ‌های جوان و بالغ *E. benthamii* به‌طور بالقوه در برابر تغییرات فعالیت آنزیمی میتوکندریایی و آغاز آسیب اولیه که منجر به مرگ سلولی می‌شود مؤثر هستند. به علاوه، گزارش

سلول‌هایی که جهش *KRAS* (G12C) را داشتند کمترین حساسیت به درمان را در محیط‌های *invitro* و *in vivo* نشان دادند. آنالیزهای منظم از جذب دارو از ورود به ساختمان DNA نشان داد که جهش *KRAS* (G12C) احتمالاً خاص است، زیرا می‌تواند واکنش‌های برشی و تعمیری را برای حذف سریع پلاتینوم از DNA تحریک کند، حتی قبل از آن که اتصالات متقابل تشکیل شود. نتیجه نشان داد که بر اساس حالت *KRAS* جهش‌یافته، الگوی مقاومت/حساسیت متفاوت به سیس‌پلاتین وجود دارد. این یافته می‌تواند ثابت کند که عملکرد *KRAS* می‌تواند چگونگی پاسخ سرطان سلول غیر کوچک ریه را به درمان با دارو پیش‌بینی کند (۱۸). در مطالعه‌ای دیگر رابطه بین miR-375 و مقاومت به سیس‌پلاتین در سرطان سلول غیر کوچک ریه بررسی شد.

نتیجه نشان داد که بیان القا شده miR-375 به‌طور قابل‌ملاحظه‌ای از آپوپتوز جلوگیری کرده، تکثیر سلولی را افزایش داده و مقاومت سلول‌های تومور به سیس‌پلاتین را در سلول‌های H1975 NSCLC بیشتر می‌کند. علاوه بر این، ضربه مؤثر miR-375 برگرداندن این اثرات بر روی سلول‌های H1975 و افزایش حساسیت این سلول‌ها به شیمی‌درمانی سیس‌پلاتین است. در نهایت این نتیجه به دست آمد که miR-375 ژن *KRAS* را مورد هدف قرار می‌دهد و به‌طور مستقیم بیان *KRAS* mRNA را تنظیم می‌کند. این نتایج اثبات می‌کنند که miR-375 می‌تواند یک نقش مهم در ایجاد مقاومت به سیس‌پلاتین در NSCLC داشته باشد (۱۹). رانگا و همکاران در هند تأثیر یک گیاه محلی به نام *Rasagenthi* و *Lehyam* را روی رده‌های سلولی A549 و H-460 سرطان ریه و رده سلولی غیرسرطانی BEAS-2B اپیتلیال برونش بررسی نمودند. این محققین گزارش دادند عصاره کلروفورمی این گیاه توانسته میزان بیان ژن‌های *P53* و *BAX* و فعالیت ژن *CASPASE-3* را بیشتر کند. در عین حال، عصاره کلروفورمی این گیاه توانسته میزان بیان *BCL-2* را کاهش دهد. همچنین میزان حساسیت به پرتو را در دو رده سلولی سرطانی افزایش داده، اما تأثیری روی رده سلولی غیرسرطانی نداشته است (۲۰).

شده که روغن‌های اساسی می‌تواند باعث آسیب به غشای میتوکندری شود، زیرا آن‌ها غیرقطبی شدن غشاهای میتوکندریایی توسط کاهش پتانسیل غشا را تحریک و سیالیت غشاها را طوری تغییر می‌دهند که به‌طور غیرعادی نفوذپذیر می‌شوند (۱۶). بررسی‌های بالینی نشان داده که عصاره اکالیپتوس اثرات مثبتی در افزایش طول عمر موش و جلوگیری از رشد تومور در موش دارای EAC داشته است. در تحقیقی از دوزهای ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم چهار گیاه ضدسرطانی *Costus* و *Azadirachta Feronia Eucalyptus* بر روی موش‌های مبتلا به EAC استفاده و میزان کاهش تومور بررسی شد. نتایج نشان داد که *Eucalyptus* ۹۶ درصد، *Feronia* ۷۱ درصد، *Azadirachta* ۸۴ درصد و *Costus* ۸۴ درصد اندازه تومور را کاهش داده‌اند. در بررسی اثر داروهای ضدسرطان عمر بیمار حائز اهمیت می‌باشد که اکالیپتوس در مقایسه با گیاهان دیگر طول عمر بیشتری را در موش مبتلا به EAC ایجاد کرد (۱۷). در تحقیق دیگری نشان داده شد که درمان با اکالیپتوس باعث افزایش ماکروفاژ در ترشحات صفاق شده و افزایش ماکروفاژ ممکن است باعث افزایش محصولات سیتوکین مانند فاکتور TNF (نکروز تومور فاکتور) و اینترلوکین IL در داخل حفره صفاق شود که می‌تواند مسئول کشتن سلول‌های توموری باشد (۱۳). آزمایش دیگری در مورد تأثیر همزمان عصاره اکالیپتوس و داروی بلوئومایسین در سلول‌های سرطانی موش مبتلا به EAC انجام شده است. نتایج مربوط به استفاده از عصاره اکالیپتوس و بلوئومایسین طی ۶ روز با دوزهای ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ میلی‌گرم در موش نشان داد که عصاره ۱۰۰ تا ۹۶ درصد و بلوئومایسین تا ۸۸ درصد مهار رشد سلول را به همراه دارد (۱۷). در تحقیق حاضر نیز میزان بیان ژن *KRAS* در سلول‌های تیمار شده با عصاره و دارو کاهش یافته است. در مطالعه دیگری با فرض این که جهش‌های متفاوت در *KRAS* می‌تواند به‌طور متفاوتی ایجاد سرطان و حساسیت به دارو را تحت تأثیر قرار دهد، آزمایش ویژه‌ای طراحی شد. در این تحقیق کلون‌های سلولی از منشأ سلولی یکسان تهیه شده و اشکال جهشی مختلف از *KRAS* برای تعیین پاسخ به سیس‌پلاتین بیان شد.

در تحقیق حاضر نیز میزان بیان ژن *KRAS* در سلول‌های تیمار شده با عصاره و دارو کاهش یافته است.

۶. نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، با مقایسه میزان بیان ژن *KRAS* در سلول‌های گروه تیمار نشده، گروه تیمار شده با عصاره اوکالیپتوس و گروه تیمار شده با داروی سیس‌پلاتین مشخص گردید که در رده سلولی سرطانی A549 که با عصاره اوکالیپتوس و داروی سیس‌پلاتین تیمار شده‌اند، میزان بیان ژن *KRAS* نسبت به ژن مرجع β -ACTIN به ترتیب به میزان ۲/۸۹ و ۹/۲۵ برابر طی ۴۸ ساعت کاهش یافته است که چون مقدار $p < 0.05$ ($p = 0$) است، کاهش معنادار است. این یافته می‌تواند به مطالعات آینده در خصوص درمان هدف‌مند سرطان ریه کمک کند. همچنین، پتانسیل استفاده از ترکیبات گیاهی بیشتر آشکار می‌شود.

۷. تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق است و هیچ‌گونه حامی مالی نداشته است و با هزینه شخصی دانشجو انجام شده است. بدین وسیله نگارندگان مقاله از داوران محترم و ناشناس مقاله که با نظرات ارزش‌مند خود کیفیت مقاله را افزایش دادند سپاس‌گزاری می‌نمایند.

۸. سهم نویسندگان

تمامی نویسندگان معیارهای استاندارد نویسندگی بر اساس پیشنهادات کمیته بین‌المللی ناشران مجلات پزشکی را دارا بودند.

۹. تضاد منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Von Dincklage JJ, Ball D, Silvestri GA. A review of clinical practice guideline for lung cancer. *Journal of Thoracic Disease*. 2013; 5(suppl 5): S607-S622.
2. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Translational lung cancer research*. 2016; 5(3): 288-300.
3. Cooper WA, Lam DC, O'toole SA, Minna JD. Molecular biology of lung cancer. *J Thorac Dis*. 2013; 5 (suppl 5): S479- S490.
4. Chan BA, Hughes BGM. Targeted therapy for non-small lung cancer: current standards and the promise of the future. *Transl Lung Cancer Res*. 2015; 4(1): 36-54.
5. Su Y, Hu Y, Wang Y, Xu X. A precision-guided MWNT mediated reawakening the sunk synergy in RAS for anti- angiogenesis lung cancer therapy. *Biomaterials*. 2017; 139: 75-90.
6. Tomassini P, Walia P, Labbe C, Jao K, Leigh NB. Targeting the KRAS Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *The oncologist*. 2016; 21: 1450-1460.
7. D'antonio Ch, Milano A, Righini R, Onesti CE. Pharmacogenomics in Lung Cancer Chemotherapy: A Review of What the Oncologist Should Know. *Anticancer Res*. 2014; 34: 5241-5250.
8. Mukherjea D, Rybak LP. Pharmacogenomics of cisplatin-induced ototoxicity. *Pharmacogenomics*. 2011; 12(7): 1039-1050.
9. Boland DJ, Brooker MIH, Chippendale GM, Donald MC, Maurice W, Bradbury PA, Kulke MH, Heist RS, Zhou W. Cisplatin pharmacogenetics, DNA repair polymorphisms, and esophageal cancer outcomes. *Pharmacogenet Genomics*. 2009; 19(8): 613-625.
10. Rose MC, Kostyanovskaya E, Huang RS. Pharmacogenomics of Cisplatin Sensitivity in Non-small Cell Lung Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2014; 12: 198-209.
11. Cardenas ME, Cruz MC, Del Poeta M, Chung N, Perfect JR, Heitman J. Antifungal activities of antineoplastic agents: *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study drug action. *Clin.Microbiol. Rev*. 1999; 12: 583-611.
12. Cragg Gordon M, Newman A, David J. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100 (1-2): 72-9.
13. Islam F, Khatun H, Khatun M , Mohsin Ali ShM, Khanam JA. Growth inhibition and apoptosis of Ehrlich ascites carcinoma cells by the methanol extract of *Eucalyptus camaldulensis* .*Pharm Biol*. 2014; 52(3): 281-290.
14. Ashour HM. Antibacterial, antifungal and anticancer activities of volatile oils and extracts from stems, leaves and flowers of *Eucalyptus sideroxylon* and *Eucalyptus torquata*. *Cancer Biology and Therapy*. 2008; 22(17): 399-403.
15. Gautam N, Mantha A, Mittal S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed Research International*. 2014; Article ID 154106.
16. Patr'icia M, D'oll-Boscardin, Sartoratto A. In Vitro Cytotoxic Potential of Essential Oils of *Eucalyptus benthamii* and Its Related Terpenes on Tumor Cell Line. 2012; Article ID 342652.
17. Islam F, Khatun H, Ghosh S , Ali MM, Khanam JA. Bioassay of *Eucalyptus* extracts for anticancer activity against Ehrlich ascites carcinoma (EAS) cells in Swiss albino mice. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 2(5): 394-39.
18. Caiola E, Salles D, Frapolli R, Lupi M, Rotella G, Ronchi A, Garassino MC, Mattschas N, Colavecchio S, Brogginini M, Wiesmuller L, Marabese M. Base excision repair- mediated resistance to cisplatin in KRAS (G12C) mutant NSCLC cells. *Oncotarget*. 2015; 6(30): 30072-30087.
19. Yong L, Wang P, Li XH, Wang HJ, Sji GN. microRNA-375 confers cisplatin resistance by regulating KRAS expression in non- small cell lung cancer cell. *Int J Clin Exp Pathol*. 2016; 9(3): 3286-3294.
20. Ranga RS, Sowmyalakshmi S, Burikhanov R, Akbarsha MA, Chendil D. A herbal medicine for the treatment of lung cancer. *Mol Med Biochem*. 2005; 280(1-2): 125-33.