Journal of Ardabil University of Medical Sciences

Vol. 19, No. 4, Winter 2020, Pages 489-500

Cytotoxic Effect of Hydroalcholic Extract of *Colutea persica* Leaf Compared to Doxorubicin on the Human Prostate (LNCaP) and Breast (MCF-7) Cancer Cell Lines

Ezzati Ghadi F*[1], Aghaabbasi K[2], Askari N[3], Ramzani Ghara A[1], Torkzadeh-Mahani M[3], Bibak H[1]

1 .Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Jiroft, Jiroft, Iran
2. Department of Biotechnology, University of Guilan, University Campus 2 , Rashat, Iran
3 .Department of Biotechnology, Institute of Sciences and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran.
**** Corresponding author.*** Tel: +983443347061, Fax: +983443347065, E-mail: fezzatighadi@yahoo.com

Received: Oct 22, 2019 Accepted: Dec 21, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Cancer is the leading cause of death worldwide. In this study, the cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Colutea persica* leaf and its synergic effect with doxorubicin were investigated on MCF-7, LNCaP and SKM (as control) cell lines**.**

Methods: Hydroalcoholic leaf extract of *Colutea persica* was prepared using maceration method and ethanol 70%. Breast cancer (MCF7), prostate (LNCaP) and fibroblast (SKM) cell lines were cultured in microplates (96 wells) and exposed to various concentrations (10, 7.5, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 and 0.156 mg/ml) of plant extract and doxorubicin (20, 80, 320 and 640 nM) solution. The synergistic effect of 20 nanomol of drug and 0.156 mg / ml of the plant extract was investigated. MTT assay was employed to evaluate the cytotoxic effects of the extract on cell lines at different time intervals (24, 48 and 72 hours). Staining with annexin V and propidium iodide (PI) was used to identify different types of cell death either necrosis or apoptosis**.**

Results: The plant extracts had cytotoxic effect and cell viability rate was lower than fibroblasts. At different times, the concentration of 10 mg /ml of the extract showed the most growth inhibition of breast and prostate cell lines. The combination effect of plant extract with doxorubicin on cells was not significant (p<0.01). The Annexin V/PI flow cytometry results showed that the percentage of initial apoptosis, delayed apoptosis and necrosis in treated cells increased compared to untreated cell**.**

Conclusion: Hydroalcoholic extract of *Colutea persica* leaf inhibits the growth of cancer cells and induce apoptosis in breast and prostate cancer cells.

Keywords: Hydroalcoholic Extract; *Colutea persica*; Breast Cancer; Prostate Cancer; Cytotoxicity

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک *Colutea persica* در مقایسه با داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین بر تکثیر رده‌های سلولی سرطان پستان و پروستات

فرشته عزتی قادی[1]*، کیان آقاعباسی[2]، ناهید عسکری[3]، عبدالله رمضانی قرا[1]، مسعود ترک‌زاده ماهانی[3]، حسین بی‌باک[1]

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت. جیرفت، ایران

۲. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشگاه گیلان، پردیس دانشگاهی، رشت، ایران

۳. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳٤ ٤۳۳٤۷۰٦۱ فاکس: ۰۳٤٤۳۳٤۷۰٦۵ پست الکترونیک: fezzatighadi@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در دنیا است. این تحقیق به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی سینه و پروستات و اثر افزایشی آن با دوکسوروبیسین انجام گرفت.

روش کار: عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک با روش خیساندن و حلال اتانول ۷۰٪ تهیه شد. غلظت‌های ۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره و غلظت‌های ۲۰،۸۰، ۳۲۰ و ٦٤۰ نانومولار از دوکسوروبیسین تهیه شد و اثر هم‌افزایی غلظت ۲۰ نانومولار دارو و غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره مورد بررسی قرار گرفت. رده‌های سلولی سرطان پستان (MCF7)، پروستات (LNCaP) و فیبروبلاست (SKM) کشت داده شدند. تست MTT جهت بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره بر روی رده‌های سلولی در مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت انجام گرفت و میزان آپوپتوز در رده‌های سلول‌های سرطانی از روش Annexin/PI سنجش شد.

یافته‌ها: عصاره‌ها دارای سمیت سلولی بودند و درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی نسبت به فیبروبلاست کم‌تر بود، در مدت زمان‌های مختلف، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیشترین اثر مهار رشد روی سرطان پستان و پروستات نشان داد، اثر ترکیبی عصاره و دارو در هیچ یک از رده‌های سلولی نسبت به کنترل در سطح ۱ درصد معنی‌دار نبود. نتایج Annexin/PI نشان‌داد میزان آپوپتوز اولیه، تاخیری و نکروز در رده‌های سلولی تیمار شده نسبت به بدون تیمار افزایش داشته است.

نتیجه‌گیری: عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی و القاء آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی سینه و پروستات را دارد.

واژه های کلیدی: عصاره هیدروالکلی، دغدغک، سرطان سینه، سرطان پروستات، سمیت سلولی

دریافت: ۱۳۹۸/۷/۳۰ **پذیرش:** ۱۳۹۸/۹/۳۰

مقدمه

تحقیقات دانشمندان و آمارهای اخیر نشان داده است که سرطان یکی از عوامل اصلی مرگ و میر در کشورهای پیشرفته است و دانشمندان برای درمان این بیماری تلاش‌های بسیاری در این سال‌ها انجام داده‌اند [۱]. پیش‌بینی شده است که در سال ۲۰۳۰

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

سرطان عامل اصلی مرگ و میر در دنیا شود [۲]. در ایران بعد از سوانح یا تصادفات جاده‌ای و سکته قلبی، سومین عامل مرگ و میر است. مجموعه زیادی از بیماری‌های سرطان شناسایی شده‌اند که می‌توان به سرطان پروستات و پستان اشاره کرد. یکی از غدد موجود در دستگاه تولید مثل مردان پروستات نام دارد که ضایعات و بیماری‌های آن از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد[۳]. سرطان پروستات یکی از سرطان‌های رایج مردان در سراسر دنیا به شمار می‌رود. در ایران طبق آخرین گزارش کشوری ثبت موارد سرطانی مربوط به سال ۱۳۸۸ وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، سرطان پروستات بعد از سرطان پوست و سرطان معده با شیوع ۹/٤ درصد کل بدخیمی‌ها در مردان و با میزان بروز سنی (ASR)[1] ۱۲/۵۹ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر، در رتبه سوم ابتلا به سرطان مردان قرار دارد [٤]. با توجه به اهمیت سرطان پروستات و بیماری‌های رایج پروستات، هرگونه تحقیق و کار آزمایشگاهی به منظور دسترسی به شیوه‌های جدید در درمان بیماری‌های غده پروستات از ارزش بسیار زیادی برخوردار است [۵،۶]. سرطان پروستات اگر در مراحل ابتدایی بیماری با کمک بررسی پاتولوژی از نمونه بافت پروستات شناسایی شود، احتمال درمان آن با موفقیت بیشتری همراه خواهد بود [۷]. از سوی دیگر سرطان پستان شایع‌ترین سرطان بدخیم در بین زنان ٤۰ تا ٤٤ ساله می‌باشد. این سرطان باعث مرگ و میر در ۳۳ درصد تمام سرطان‌های زنان و ۲۰ درصد مرگ ناشی از سرطان می‌باشد [۸]. در ایالات متحده امریکا، ۱۲ درصد از کل بانوان در طول عمرشان بیماری سرطان سینه در آنها تشخیص داده می‌شود [۹]. سرطان پستان در ایران کمتر از نقاط دیگر آسیا شیوع دارد ولی در طی چند سال اخیر شیوع این سرطان در زنان ایرانی رشد بالایی داشته است که نگران کننده می‌باشد. علاوه بر آن در زنان ایرانی حداکثر سن ابتلا به سرطان پستان حدود یک دهه کمتر از زنان در کشورهای پیشرفته می‌باشد. سن و جنس مهم‌ترین متغیرهای دخیل در بروز سرطان سینه هستند. کارشناسان می‌گویند از هر هشت زن ایرانی، یک نفر شانس ابتلا به سرطان پستان را دارا است و حدود یک‌چهارم کل سرطان‌های زنان در کشور مربوط به سرطان پستان می‌باشد [۱۰]. روش‌های مختلفی برای درمان سرطان وجود دارد که یکی از رایج‌ترین و معمولی‌ترین آنها شیمی درمانی است. دوکسوروبیسین از داروهای شیمی درمانی است که متعلق به خانواده آنتراسیکلین‌ها است. این دارو با نام تجاری آدریامایسین (ADR) شناخته شده است و بطور اولیه از *Streptomyces peucetius mutan* جدا شده است، یکی از موثرترین و وسیع‌ترین داروهای سیتوتوکسیک در درمان تومورها می‌باشد. مکانیسم عمل اصلی داروی دوکسوروبیسین شامل اتصال به DNA و مهار توپوایزومرازها و همچنین اتصال به آهن موجود در سلول‌ها و تولید رادیکال‌های آزاد می‌باشد، از عوارض جانبی استفاده از این دارو بی‌حالی، از دست رفتن موها، خستگی، کاهش ایمنی و بویژه مشکلات قلبی را می‌توان نام برد [۱۳-۱۱]. در چند دهه اخیر از روش‌های متعددی برای درمان انواع سرطان‌ها استفاده می‌شود ولی در اکثر موارد پاسخ به درمان بسیار ضعیف بوده و اغلب با اثرات جانبی نامطلوب بسیار زیادی همراه می‌باشند. تولید داروهایی با منشاءِ گیاهی در چند دهه اخیر در مبارزه با سرطان رواج پیدا کرده است، داروهای شیمی درمانی مانند وین کریستین و وین بلاستین از اولین داروهای گیاهی برای درمان سرطان هستند که در علم داروسازی نوین از آنها استفاده می‌شود [۱٤،۱۵]، از اوایل دهه ۱۹۵۰ تاکنون ترکیبات جدید برای شیمی درمانی سرطان و مشتق‌سازی از آنها، از برنامه‌های غربال‌گری وسیع گیاهان شناسایی شده است [۱۶]. امروزه دانشمندان گیاهان را جایگزینی مناسب برای درمان سرطان می‌دانند. یکی از داروهایی که از

[1] Age-standardized Rate

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

گیاهان منشاءِ گرفته و امروزه بسیار زیاد مورد استفاده قرار می‌گیرد تاکسول است. این دارو از یک نوع گیاه سرخس‌دار گرفته می‌شود و مهمترین ترکیب گیاهی است که در درمان سرطان از آن استفاده می‌شود [۱۷]. متابولیت‌های ثانویه مختلفی از جمله کارتنوئیدها، ترپنوئیدها، فلاوونوئیدها، پلی‌فنول‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، آنزیم‌ها، مواد معدنی، ویتامین‌ها و غیره در گیاهان دارویی موجود هستند. این ترکیبات دارای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هستند که در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده می‌شود [۱۸]. جنس *Colutea* بیست و شش گونه گیاهی را در بر می‌گیرد که شامل درختچه‌های خزان کننده و درخت‌های کوچک با پراکنشی از منطقه مدیترانه و جنوب شرقی اروپا و شمال شرقی آفریقا است [۱۹]. گونه *Colutea persica* که در فارسی دغدغک نامیده می‌شود، دارای ارتفاع ۱ تا ۳ متر و برگ‌های تک‌شانه‌ای است و گل‌های زرد و سرخ رنگ دارد. این گونه در اطراف تهران، مازندران، کرمان، آذربایجان و سیستان و بلوچستان دیده شده است [۲۰]. از مهمترین ترکیبات آن می‌توان اسیدکولوتئیک را نام برد، این گیاه ملین، صفرا آور و برای درمان یبوست توسط بومیان استفاده می‌شود، بطوری‌که ۲۰ تا ۳۰ گرم از برگ این گیاه به صورت دم‌کرده مورد استفاده قرار می‌گیرد. گونه‌های این جنس به عنوان علوفه برای دام مورد استفاده قرار می‌گیرند [۲۱]. با توجه به نرخ بالای مبتلایان به سرطان در کشورمان انجام تحقیقات بیشتر به منظور پی‌بردن به مکانیسم‌های ایجاد سرطان و ابداع روش‌های درمانی مؤثرتر ضروری بنظر می‌رسد. با توجه به آنکه گیاه مذکور به عنوان گیاه دارویی با ترکیبات ثانویه شناخته شده است، در این تحقیق به بررسی اثر مقایسه‌ای عصاره گیاه *Colutea persica* بر رشد و تکثیر رده سلول‌های سرطانی پروستات و سینه در مقایسه با داروی ضد سرطان دوکسوروبیسین پرداخته شد.

روش کار

عصاره‌گیری با روش خیساندن

برگ‌های تازه گیاه دغدغک از منطقه سردسیر دلفارد (از توابع بخش ساردوئیه شهرستان جیرفت، با مختصات جغرافیایی ۵۷ درجه و ۳۶ دقیقه طول شرقی و ۲۹ درجه و ۱ دقیقه عرض شمالی)، توسط عضو هیئت علمی گیاه شناسی دانشگاه جیرفت جمع‌آوری شدند. بعد از آن‌که در سایه به مدت ۶ روز خشک شدند، کاملاً آسیاب شدند تا به شکل پودر درآیند و در مرحله بعد، ۴۰ گرم پودر برگ گیاه در ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۷۰٪ حل گردید و این محلول به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و سپس نمونه‌ها از کاغذ صافی واتمن ۱ عبور داده شدند و در نهایت برای خشک شدن در خلاءِ در دمای ۵۰-۴۵ درجه از دستگاه چرخش در خلاءِ استفاده شد و با کمک کاردک عصاره خشک از پلیت‌های شیشه‌ای جداسازی شد. عصاره هیدروالکلی از برگ گیاه تهیه شد و برای ماندگاری بیشتر عصاره تا زمان آزمایشات مربوطه در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تهیه محلول کار عصاره‌ها و داروی دوکسی‌روبیسین

در ابتدا برای تهیه استوک اولیه ۱۰ mg/ml، مقدار ۱۰۰ mg از عصاره خشک هیدروالکلی وزن گردید و سپس به آن مقدار ۴۰۰ میکرو لیتر DMSO[1] و ۶۰۰ میکرولیتر محیط (RPMI[2]) اضافه شد و با محیط کشت ۹ میلی‌لیتر حجم استوک را به ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. استوک‌های ثانویه را به ترتیب ۷/۵mg/ml، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ از استوک اولیه تهیه شدند. داروی دوکسوروبیسین به صورت محلول با نام تجاری Ebedoxo با غلظت ۵۰mg بر ۲۵ ml تهیه شد و برای تهیه غلظت‌های ۶۴۰ نانومولار، ۳۲۰، ۸۰، ۲۰ از فرمول $m_1v_1= m_2v_2$ استفاده شد. در این تحقیق غلظت ۲۰ نانومولار دارو و غلظت عصاره ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نیز با هم

[1] Dimethyl sulfoxide
[2] Roswell Park Memorial Institute

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]
[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

ترکیب شدند تا اثر هم‌افزایی دارو و عصاره مورد بررسی قرار گیرند.

کشت سلولی و تست MTT

رده‌های سلولی سرطان پستان (MCF7)، پروستات (LNCaP) و فیبروبلاست (SKM) از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند، سپس به صورت کشت تک‌لایه‌ای[1] در ترکیبی از ۹۰ درصد محیط RPMI-1640 و ۱۰ درصد سرم جنینی (FBS)[2] کشت گردید و ۶۲/۵mg/ml پنی سیلین و ۱۰۰mg/ml استروپتومایسین و ۲mg/ml ضد قارچ آمفوتریپسین B مکمل شد و در اتمسفر مرطوب ۵٪ دی‌اکسیدکربن در $37^{\circ}C$ قرار گرفت و پس از انجام حداقل ده پاساژ موفق، بر روی آن‌ها آزمایشات انجام شده است. تستMTT یکی از روش‌هایی است که جهت بررسی اثرات سمیت مواد گوناگون بر روی رده‌های مختلف سلولی از جمله سرطانی و غیرسرطانی، استفاده می‌شود، به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی ترکیبات به کار رفته در این پژوهش نیاز بود که سلول‌ها از فلاسک T25 به فلاسک‌های ۹۶ خانه‌ای منتقل شوند. در هر خانه فلاسک ۹۶ خانه‌ای ۷۰۰۰ سلول از رده‌های سلول‌های سرطانی و فیبروبلاست کشت شد و در نهایت حجم هر خانه با محیط کشت به ۱۰۰µl رسانده شد. پیش از تیمار سلول‌ها در فلاسک ۹۶ خانه‌ای، نیاز بود که تراکم سلول‌ها به ۷۰٪ برسد، در نتیجه فلاسک‌های ۹۶ خانه‌ای به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا تراکم حدود 7×10^{3} سلول را بدست آورند. سپس محیط کشت اولیه دور ریخته شد و غلظت‌های ۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ عصاره در دوره‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، غلظت‌های دوکسوروبیسین و ترکیب غلظت ۲۰ نانومولار دارو و غلظت عصاره ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪CO_2 انکوبه شدند. بعد از سپری شدن مدت زمان لازم به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر MTT اضافه گشت. پلیت‌ها به مدت۴ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت محیط رویی آنها دور ریخته شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از حلال DMSO اضافه شد. به مدت ۲۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند و سپس توسط یک میکروتیتر پلیت ریدر (ELISA-reader, Organon-Teknika, Netherland) در ۴۹۰ و ۶۳۰ نانومتر خوانده شد.

تعیین میزان مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی

رده‌های سلولی با عصاره هیدروالکلی (غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که تقریباً ۲۰ درصد از میزان رشد رده‌های سلولی را مهار کرده بود) تحت تیمار قرار گرفتند و به منظور تعیین مقدار مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (آپوپتوز) در رده سلول‌های تیمار شده و بدون تیمار (کنترل) از روش Annexin/PI با کیت تشخیصی (BD Pharmingen™, USA) و با کمک دستگاه فلوسایتومتری (CYFlow شرکتpartec G mbH ساخت آلمان) انجام گرفت. آزمایش به این صورت انجام شد که رده‌های سلولی با عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند. سلول‌ها با محلول نمکِ فسفات با خاصیت بافری (PBS) شستشو و بعد از سانتریفیوژ سلول‌ها، به رسوب حاصل بافر بایندینگ اضافه شد. سپس ۵ میکرولیتر از رنگ annexin V اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و سلول‌ها با محلول بایندینگ شستشو و در مرحله بعد ۱۰ میکرولیتر رنگ PI به سلول‌ها اضافه شد و در پایان کار آنالیز و میزان مرگ سلولی توسط دستگاه فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

تجزیه و تحلیل

هریک از عصاره‌ها به همراه دارو و اثر ترکیبی آنها به عنوان تیمارهای مختلف در نظر گرفته شد و هر یک از آنها در ۳ تکرار مختلف تاثیرشان بر رده‌های

[1] Monolayer
[2] Fetal Bovine Serum

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]
[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

سلولی مورد ارزیابی قرار گرفت به منظور مقایسه نتایج حاصله از نرم‌افزار آماری نسخه ۲۰ و آزمون آماری ANOVA استفاده شد. حداقل سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

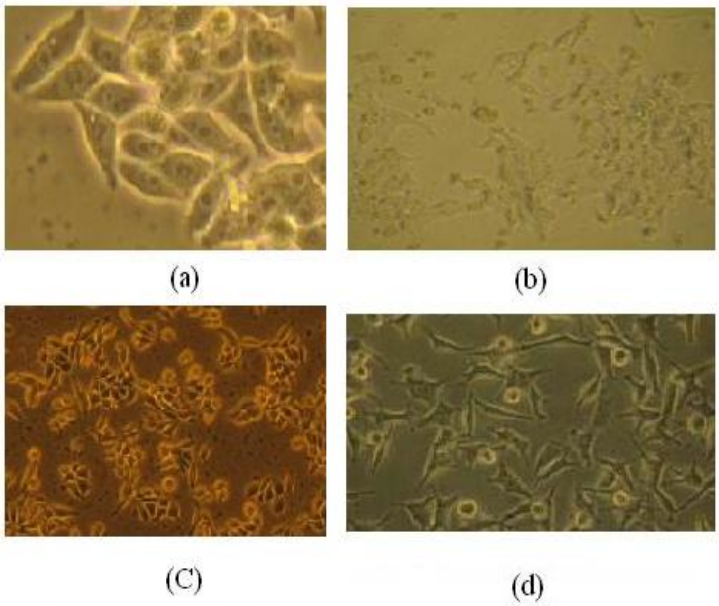
نتایج حاصل از آزمون سمیت سلولی به این شکل بود که عصاره گیاه دغدغک در غلظت‌های مورد استفاده دارای سمیت سلولی بوده و میزان زنده‌مانی سلولی را کاهش داده است، به طوری که در سطح یک درصد تفاوت معناداری بین نمونه کنترل و غلظت‌های مختلف عصاره در هر سه رده سلولی در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت مشاهده شد و همچنین تغییر شکل ظاهری رده‌های سلولی نشان‌داد که عصاره‌ها بر روی آنها اثرگذار بودند (شکل ۱). در مدت زمان ۲٤ ساعت، غلظت‌های ۱۰، ۷/۵ و ۵ در رده سلول‌های پستان و غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سرطان پروستات بیش از ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی رشد نشان دادند (شکل ۲)، در مدت زمان ٤۸ ساعت غلظت‌های ۱۰، ۷/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سرطان پستان و غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پروستات بیش از ۵۰ درصد سمیت سلولی نشان داد. در مدت زمان ۷۲ ساعت غلظت‌های ۷/۵،۱۰ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پستان و غلظت‌های ۷/۵،۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پروستات سمیت سلولی بیشتر از ۵۰ درصد نشان دادند (شکل ۳). نتایج بررسی غلظت‌های مختلف دوکسوروبیسین بر بقای سلول‌های MCF-7 و LNCaP با استفاده از تست MTT نشان داد که داروی دوکسوروبیسین در دوز مورد استفاده دارای اثرات سمیت سلولی بوده و بقای سلولی را کاهش می‌دهد و در دوز ٦٤۰ نانومولار اثرات سمیت قابل توجهی روی سرطان سینه دارد، به‌طوری که بیش از ۵۰ درصد مهار رشد سلولی داشته است، دوزهای دیگر نیز اثرات سمیت سلولی قابل توجهی روی هر دو رده سلولی نشان داد ولی بیش از ۵۰ درصد مهار رشد سلولی نبودند. در این تحقیق اثر ترکیبی غلظت ۲۰ نانو مولار با غلظت ۰/۱۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد بررسی قرار گرفت و در هیچ یک از رده‌های سلول‌های سرطانی نسبت به کنترل در سطح ۱ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ٤).

تست فلوسایتومتری

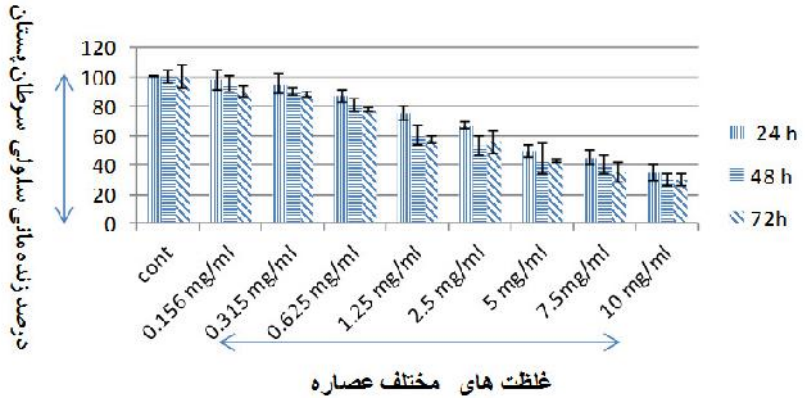
نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری رده سلول‌های پستان، پروستات تیمار شده با عصاره هیدروالکلی با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نمونه کنترل - (بدون تیمار) بعد از ۲٤ ساعت نشان داد که سلول‌های کنترل پروستات، سینه، به ترتیب میزان زنده‌مانی سلول‌ها ۹٤/۰۲، ۹۲/٤٤ و مقدار آپوپتوز اولیه ۲/۹۸، ۱/۷٤ و درصد آپوپتوز تاخیری ۲/۲۱، ۳/۵۹ و درصد نکروز در سلول‌های کنترل ۰/۷۹ و ۲/۲۳ نشان داده شد (شکل ۵). میزان آپوپتوز و نکروز دیده شده در رده‌های سلول‌های کنترل به این شکل بود که درصد زنده‌مانی سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی-گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی دغدغک در رده-های سلولی پروستات، پستان به ترتیب ۷۷/۶۷، ۷٤/۵۶، میزان آپوپتوز اولیه ۱۱/٤۲، ۱۹/۹۵ درصد، میزان آپوپتوز ثانویه به ترتیب ۷/٤۳، ۵/۸۶ و همچنین درصد نکروز در سلول‌های تحت تیمار به ترتیب ۳/٤۹، ۵/۸۶ بوده است. میزان درصد آپوپتوز اولیه، آپوپتوز تاخیری و نکروز دیده شده در رده‌های سلولی تیمار شده با عصاره هیدروالکلی نسبت به رده‌های سلولی بدون تیمار افزایش چشم‌گیری داشته است.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

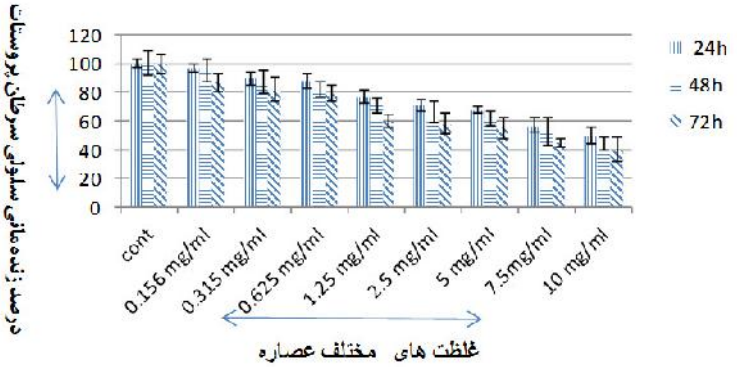
[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]



شکل ۱. تغییرات شکل ظاهری رده‌های سلول‌های سرطانی تحت تیمار با عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک، a: سلول‌های کنترل سرطان پروستات، b: سلول‌های سرطانی پروستات تحت تیمار غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دغدغک، c: سلول‌های کنترل سرطان پستان، d: سلول‌های سرطانی پستان تحت تیمار غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره دغدغک بزرگ نمایی x۲۰۰



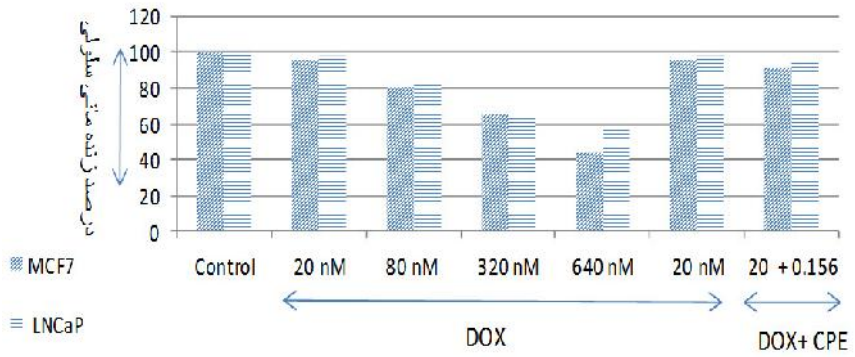
شکل ۲. درصد زنده‌مانی و بقای سلولی سرطان پستان تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است



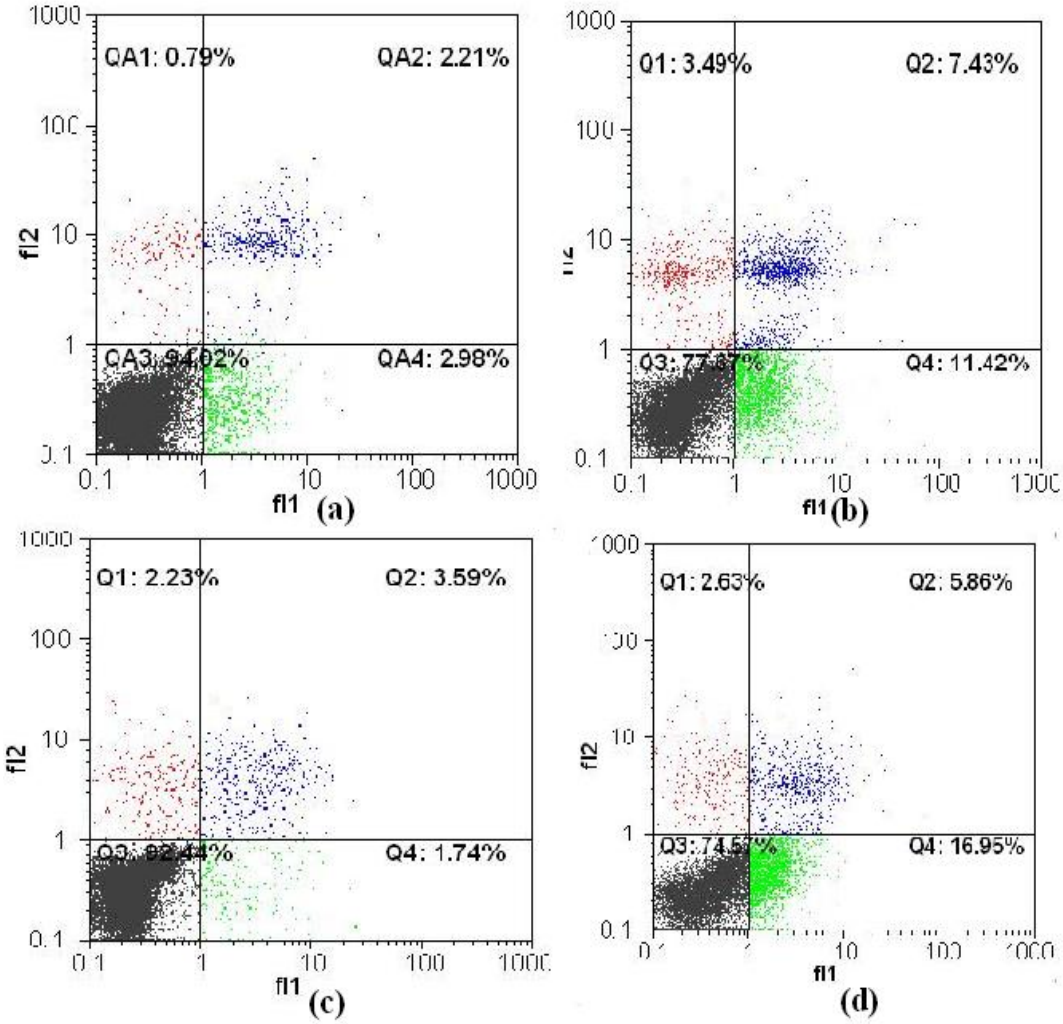
شکل۳. درصد زنده‌مانی و بقای سلولی سرطان پروستات تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، نتایج به صورت میانگین ± خطای استاندارد نشان داده شده است.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]



شکل ٤. نمودار تغییرات درصد زنده‌مانی رده سلول‌های سرطانی پستان و پروستات در مجاورت داروی دوکسوروبیسین و نمودار اثر متقابل دارو و عصاره، DOX: غلظت‌های متفاوت داروی دوکسوروبیسین، D0X+CPE: تیمار ترکیبی غلظت ۲۰ نانومولار داروی دوکسوروبیسین و غلظت ۱/۲۵ میلی-گرم بر میلی-لیتر عصاره



شکل ۵. نتایج به دست آمده از دستگاه فلوسایتومتری رده سلول‌های سرطانی پستان، پروستات: Q_1= درصد میزان نکروز، Q_2= درصد آپوپتوزیس تاخیری، Q_3= درصد میزان سلول‌های زنده، Q_4= درصد سلول‌های که وارد آپوپتوزیس اولیه شدند. سلول‌های کنترل یا بدون تیمار، (a) پستان و (c) پروستات – سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در (b) پستان و(d) پروستات

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

بحث

زمانی که سلول‌های طبیعی از فرایند رشد معمولی خارج شده و به سرعت بر تعداد و اندازه آن‌ها افزوده شود، یک تومور یا توده ایجاد می‌کنند. این تومور به رشد نامحدود خود ادامه داده و به بافت‌های سالم دیگر گسترش می‌یابد به چنین توموری، تومور بدخیم گفته می‌شود [۲۲]. تحقیقات نشان داده است که بسیاری از متابولیت‌های ثانویه از منشاءِ گیاهی، دارای خواص ضدسرطانی و ضدمیکروبی هستند و با مطالعه و تحقیق کامل و جامع و جداسازی ماده موثره گیاهان می‌توان ترکیبات مفید آنها را جداسازی کرد و اثرات ضدمیکروبی و ضدسرطانی آنها را شناسایی کرد. در این تحقیق از گیاه دغدغک، یک گیاه بومی از خانواده Fabaceae که دارای خواص دارویی است، استفاده شد. غلظت‌های ۱۰ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک، بر روی سرطان سینه، پروستات بیش از ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی رشد داشتند. در تحقیق مشابهی که در سال ۲۰۱۵ در جنس هم‌خانواده دغدغک صورت گرفت. مشخص شد که عصاره الکلی ریشه گیاه *Eschynomene fascicularis* توانایی مهار رشد سلول‌های HELA را داشت و می‌توان از آن در تولید داروهای ضدمیکروبی و ضدسرطانی استفاده کرد [۲۳]. پورعلی و همکاران تاثیر عصاره هسته تمبرهندی از خانواده Fabaceae بر روی رده‌های سلولی سرطان روده بزرگ و پروستات را مورد بررسی قرار دادند. نتایج این تحقیق نشان داد غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی هسته تمبرهندی بر روی رده‌های سلولی سرطانی دارای اثرات مهارکنندگی رشد هستند و غلظت‌های بالا بیشترین اثر مهارکنندگی رشد را داشتند و عصاره هیدروالکی تمبر هندی اثر مهاری رشد کمتری روی رده‌های سلولی فیبروبلاست نشان داد، در این تحقیق عصاره هیدروالکلی برگ دغدغک از خانواده Fabaceae در غلظت‌های مختلف بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی پروستات و پستان اثر کشندگی داشت و غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بالاترین اثر مهارکنندگی رشد دارد و این عصاره، اثر مهاری رشد کمتری روی رده‌های سلولی نرمال نشان داد [۲۴]. برادارن و محمدی اثر آپوپتوتیک عصاره دی‌کلرومتانولی گیاه گزنه بر روی سلول‌های سرطانی سینه مورد بررسی قرار دادند و نتایج نشان داد که عصاره گیاه گزنه به طور معنی‌داری سلول‌های سرطانی را از بین می‌برد و در سلول‌های سرطانی آپوپتوز را القا می‌کنند[۲۵]، نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره برگ دغدغک در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانایی القاءِ آپوپتور در رده سلول‌های سرطانی پروستات و پستان را دارد. اثر سمیت سلولی عصاره پوست گونه‌های مختلف مرکبات بر رده سلول‌های سرطانی MCF7 توسط دهپور و حسن پور بررسی شد و نتایج نشان داد که غلظت‌های ۱۰ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اتانولی ۸۰٪ پوست مرکبات دارای سمیت سلولی بر رده سلول‌های سرطانی پستان هستند[۲۶]. در این تحقیق عصاره اتانولی ۷۰٪ برگ دغدغک در غلظت-های ۱۰ و ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیشترین اثر سمیت سلولی را نشان داد. در تحقیقی مشابه که بر روی شیرین‌بیان گیاه هم‌خانواده با دغدغک صورت گرفت تاثیر عصاره آبی، متانولی و کلروفرمی این گیاه بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی MCF-7 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تست MTT نشان داد عصاره این گیاه دارای خواص ضدسرطانی است و ترکیب β-glycyrrhetic acid موجود در گیاه شیرین‌بیان دارای خواص دارویی از جمله خواص ضدسرطانی است [۲۷]. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد گیاهان این خانواده از جمله شیرین‌بیان، تمبرهندی، *Aeschynomene fascicularis* و دغدغک، دارای اثرات سمیت سلولی بر روی رده‌های سلول‌های سرطانی هستند و با تحقیق بیشتر می‌توان اطلاعات تکمیلی بیشتری در مورد آنها به دست آورد.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

در تحقیق اسماعیلی ماهانی و همکاران اثر ماده موثره گیاه دارویی درمنه را بر روی رده سلول‌های سرطانی سینه و اثر ترکیبی آن با داروی دوکسوروبیسین مورد بررسی قرار دادند و علاوه بر آنکه Artemether ماده موثره گیاه درمنه باعث جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانیMCF-7 شد [۲۸]، ماده موجود با ترکیب با داروی دوکسوروبیسین اثر هم‌افزایی داشته و تاثیری به مراتب بهتر بر روی مهار رشد رده‌های سلولی سرطان سینه داشته است. در این تحقیق اثر ترکیبی دارو و عصاره هیدروالکلی مورد بررسی قرار گرفت ولی هیچ‌گونه اثر هم‌افزایی نشان نداد، در ادامه این تحقیق می‌توان با جداسازی ماده موثره گیاه به طور دقیق‌تری در مورد اثر هم‌افزایی ترکیبات این گیاه صحبت کرد و همچنین با مطالعه بالینی و تست‌های حیوانی می‌توان اطلاعات بیشتر و دقیق‌تری از تاثیرات دارویی و ضد سرطانی این گیاه به دست آورد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه سرطان یکی از اصلی‌ترین عوامل مرگ و میر در دنیا می‌باشد، بنابراین تحقیق و بررسی برای درمان و پیشگیری آن برای بهداشت عمومی جامعه از اهمیت قابل توجهی برخوردار می‌باشد. در سال‌های اخیر، ترکیبات گیاهی به عنوان داروی ضدسرطان بررسی شده اند. از جمله مزایای عصاره‌های گیاهی، کم بودن اثرات جانبی، هزینه پائین فراورده گیاهی، دارا بودن اثرات مفید و خاصیت دارویی گیاهان و عصاره‌های به دست آمده از آن‌ها در درمان بیماری‌ها شناخته شده و کسب نتیجه مطلوب‌تر از آن‌ها است. از این رو امروزه محققین به داروهای گیاهی رو آورده اند. گیاه دغدغک از جمله گیاهانی است که در مناطق جنوبی و شمال ایران توسط بومیان به عنوان گیاه دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرد و دارای ترکیباتی دارویی از جمله تانن می‌باشد، کاندید مناسبی برای مطالعه درمانی روی انواع سرطان است. نتایج به دست آمده از پژوهش انجام شده نشان‌دهنده خاصیت پروآپوپتوتیک گیاه دغدغک و اثربخشی آن بر روی رده‌های سلولی سرطان سینه و پروستات می‌باشد. استفاده از غلظت‌های بالاتر عصاره به همراه داروی شیمیایی ضدسرطان دوکسوروبیسین می‌تواند موجب افزایش اثرات ضدسرطانی این دارو شده و در نهایت می‌تواند به عنوان جایگزینی برای این دارو باشد. نتایج این پژوهش بیان‌گر سمیت انتخابی عصاره گیاه دغدغک با اثر وابسته به دوز، بر سلول‌های سرطانی پروستات و سینه است. در رابطه با مکانیسم احتمالی اثر عصاره گیاهان مختلف، اگرچه در مطالعات مختلف دلایل زیادی همچون مهار چرخه سلولی، وقوع آپوپتوزیس برای توجیه اثر سمیت سلولی ذکر شده است اما با توجه به نتایج تحقیق حاضر می‌توان احتمال داد که عصاره گیاه دغدغک با دارا بودن تانن که نقش اساسی در نابودی سلول‌های سرطانی دارد، سبب سمیت سلولی می‌شود. بر اساس مطالب ذکرشده، تعیین داروهایی که اثر اختصاصی و چشم‌گیری بر سلول‌های سرطانی دارند و توانایی مهار رشد سلول‌های سرطانی را داشته باشند کاملاً محسوس و ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از نتایج طرح پژوهشی دانشگاه جیرفت به شماره ۱۹-۹۵-۳۸۱۸ حاصل شده است. در پایان از تمامی مسئولین آزمایشگاه کشت سلولی و آزمایشگاه بیوتکنولوزی دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان که تمامی امکانات و وسایل آزمایشگاهی را در اختیار محققین قرار دادند و از مسئولین محترم دانشگاه جیرفت که هزینه مالی آن را بر عهده داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

References

1- Kraljevic S, Sedic M, Scott M, Gehrig P, Schlapbach R, Pavelic K .Casting light on molecular events underlying anti-cancer drug treatment: what can be seen from the proteomics point of view. Cancer Treat Rev. 2006 Dec;32(8):619-29.
2- Hassanipour-Azgomi S, Mohammadian-Hafshejani A, Ghoncheh M, Towhidi F, Jamehshorani S, Salehiniya H. Incidence and mortality of prostate cancer and their relationship with the Human Development Index worldwide. Prostate Int. 2016 Sep;4(3):118-24.
3- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics: American Cancer Society.CA Cancer J Clin. 2005 Jan-Feb;55(1):10-30.
4- Islamic Republic of Iran, Ministry of Health and Medical Education, Office of Deputy, Center for Diseases Control, Cancer office. Iranian Annual National Cancer Registration Report. 2009.
5- Vlaeminck-Guillem V, Bandel M, Cottancin M, Rodriguez-Lafrasse C, Bohbot JM, Sednaoui P. Chronic prostatitis dose not influence urinary PCA3 score. Prostate. 2011 Jul. 72:549-554.
6- Basu S, Tindall DJ. Androgen action in prostate cancer. Horm Cancer. 2010 Oct;1(5): 223-2.
7- Wang D, Foran DJ, Ren J, Zhong H, Kim IY, Qi X. Explorin automatic prostate histopathology image gleason grading via local structure modeling. Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc. 2015:2649-52 (EMBC), 2015 June:37:2649-52.
8- O'Hara M , Kiefer K, Farrell K, Kemper K. A review of 12 commonly used medicinal herbs. Arch Fam Med. 1998 Nov-Dec;7(7):523-536.
9- National Institutes of Health; National Cancer Institute. Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer stat facts: female breast cancer. Available from: https://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast. html. Accessed January 23, 2018.
10- Ahmadi M, Asadi F, Jalali-fard B, Sadoghi F. [Management of health information]. Tehran:Nopardaz publications; 2005.
11- Barnabé N, Zastre JA, Venkataram S, Hasinoff BB. Deferiprone protects against doxorubicin-induced myocyte cytotoxicity. Free Radic Biol Med. 2002 Jul;33(2):266-75.
12- Dobbs NA, Twelves CJ, Gillies H, James CA, Harper PG, Rubens RD. Gender affects doxorubicin pharmacokinetics in patients with normal liver biochemistry. Cancer Chemother Pharmacol. 1995 Nov; 36(6):473-476.
13- Frederick CA, Williams LD, Ughetto G, van der Marel GA, van Boom JH, Rich A, et al. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. Biochemistry. 1990 Mar;29(10):2538-49.
14- Newman DJ, Cragg GM, Sanders KM J. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. J Nat Prod. 2003 Jul;66(7):1022-37.
15- Srivastava V, Negi AS, Gupta MM, Khanuja SPS. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. Bioorg. Med. Chem. 2005;13(21):5892-908.
16- Voss C, Eyol E, Berger MR. Identification of potent anticancer activity in *Ximenia American* aqueous extracts used by African traditional medicine. Toxicol Appl Pharm. 2006;211:177-187.
17- Reinecke P, Knopf C, Schmitz M, Schneider EM, Gabbert HE, Gernarz CD. Growth inhibitory effects of paclitaxol on human epithelioid sarcoma in vitro: heterogeneity of response and the multidrug resistance phenotype. Cancer. 2000 Apr. 88(7):1614-22.
18- Dixit S, Ali H. Antioxidant Potential Some Medicinal Plants of Central India. JCT. 2010 Jan;1(2):87-90.
19- Pijut PM. *Colutea* L., Bladder-Senna. USDA Forest Service Hardwood Tree Improvement and Regeneration Centre, USA, www.nsl.fs.fed.us/wpsm/Colutea.pdf.2008 Apr.
20- Ghahraman A. Basic Botany, University of Tehran Publications. 2006. Vol 3. [Full text in Persian]
21- Aguinagalde I, Perez-garcia F, Gonzalez AE. Flavonoids in Seed Coats of two Colutea Species-Ecophysiological Aspects. Journal of Basic Microbiol.1990 Jan; 30(8):547-553.
22- Bahar MA, Kuby Immunology, Kindt T,Chapter 21 : Cancer Immunology. Tehran University of Medical Sciences publitions,2011, p.1121 [Full text in Persian]

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]

23- Caamal-Fuentes EE, Peraza-Sánchez SR, Torres-Tapia LW, Moo-Puc RE. Isolation and identification of cytotoxic compounds from *Aeschynomene fascicularis*, a mayan medicinal plant **.** Molecules.2015 July, 20(8):13563-74.
24- Pourali M, Yaghobi MM. A study on effect of *Tamarindus indica* kernel and *Tribulus terrstris* fruit extract on proliferation of the human prostate and colon cancerous cells in vitro [dissertation], Kerman Graduate University of Technology **.**2011 Mar. p**.**75-96**.[**Full text in Persian]
25- Mohammadi A, Baradaran B. Apoptotic Effect of the *Urtica dioica* plant extracts on breast cancer cell line (MDA-MB-468). J Ardabil Univ Med Sci. 2015 Aug **.**15(3):283-90. [Full text in Persian]
26- Dehpourjouybari A, Hassanpour Z. Evaluation of the cytotoxicity of skin extract of different citrus species on MCF-7 cancer cell line. Anim Biol J. 2015 May;8**(**2**)**:19-25. [Full text in Persian].
27- Rathi SG, Suthar M, Patel P, Bhaskar VH, Rajgor NB. In-vitro Cytotoxic Screening of Glycyrrhiza glabra L. (Fabaceae): A Natural Anticancer Drug. J Young Pharm. 2009 July;1(3):239-43.
28- Samandari-Bahraseman M.R ,Sarhadi S ,Esmaeili-Mahani S, Artemether effect and its interaction with vincristine and doxorubicin on human breast carcinoma MCF-7 cells. Physiol Pharmacol **.**2016 June; *20*(2)**:**117-21.

[Downloaded from ejournals.arums.ac.ir on 2025-01-07]

[DOI: 10.29252/jarums.19.4.489]