Archive of SID.ir

مجله نخبگان علوم و مهندسی

Journal of Science and Engineering Elites

جلد ۹- شماره ۳ - سال ۱۴۰۳

www.ElitesJournal.ir

مروری بر تاثیر عصاره گیاهان دارویی در کنترل سلول های سرطانی

فاطمه مویدی نژاد [۱*]، الیزا زندی [۲]، مریم زراعتکار [۳]، فاطمه گل اور [٤]، غزاله باقری [٥]

۱- دانشجوی کارشناسی پیوسته، میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
۲- دانشجوی کارشناسی پیوسته، میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
۳- دانشجوی کارشناسی پیوسته، میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
٤- دانشجوی کارشناسی پیوسته، میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران
٥- دانشجوی کارشناسی پیوسته، میکروبیولوژی، موسسه آموزش عالی آپادانا، شیراز، فارس، ایران

*mwydynzhadfatmh@gmail.com

ارسال: خرداد ماه ۱۴۰۳ پذیرش: مرداد ماه ۱۴۰۳

چکیده

امروزه با توجه به عوارض استفاده ار مواد شیمیایی و پرتو درمانی استفاده از گیاهان دارویی می تواند برای درمان سرطان عوارض کمتری داشته باشد. تمامی اثرات عصاره هیدروالکلی گیاهان روی میزان بقای سلول ها با استفاده از MTT انجام شد. هدف از این مطالعه بررسی آثار احتمالی ضد سرطانی عصاره هیدرو الکلی گیاهان رازیانه، آشواگاندا، رزماری، اسطوخودوس و سنبله ای کرکدار که با تاثیر بر تغییر بیان ژن و خواص آنتی اکسیدانی قادر به تغییرات چرخه سلولی با افزایش بیان ژن های TCI- P53- HT-29 HeG2- BIM بر رده سلولی سرطان هایی نظیر تیروئید، تخمدان، پستان،کبد و کولورکتال شده و سبب القای اثرات ضد سرطانی می شود.

واژگان کلیدی: رازیانه، اشواگاندا، سنبله ای کرکدار، اسطوخودوس، رزماری، چرخه سلول.

۱- مقدمه

سرطان نوعی بیماری است که در اثر تغییرات ژنتیکی غیر معمول ایجاد می شود[۱]. سرطان پستان از رایج ترین انواع سرطان و دومین عامل مرگ میر ناشی از سرطان در میان زنان به شمار می آید[۲]. سالانه بیش از یک میلیون سرطان پستان تشخیص داده می شود که بیش از ۵۰۰ هزار نفر در اثر این بیماری جان خود را از دست می دهند[۳]. در میان این روش های درمانی شیمی درمانی بیشترین کاربرد را در این زمینه دارد اما از عوارض بسیاری برخوردار است که از عوارض این روش می توان به ریزش مو، اختلالات خواب، مشکلات حافظه و تمرکز اشاره کرد[۴]. در این راستا ،استفاده از گیاهان دارویی در دهه های اخیر مطرح بوده است و در دهه های اخیر از این گیاهان به عنوان فراورده های دارویی استفاده می شود[۵]. گیاه رزماری متعلق به خانواده Labiabida است اجزا فعال از این خانواده از این گیاهان عبارتند از دی ترپن ها و تری ترپن ها که این ترکیبات اثرات انتی اکسیدانی بالایی دارند. با توجه به خواص ضد سرطانی و انتی اکسیدانی ترکیبات رزماری، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر اسانس رزماری بر بیان ژن BIM در رده سلولی MCF_7 سرطان پستان می باشد. سرطان کبد در مردان پنجمین و در زنان هفتمین سرطان شایع می باشد [۶].

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

طبق گزارشات مونوترپن ها و مشتقات پرلین الکلهای موجود در اسطوخودوس دارای ویژگی برای جایگزینی شیمی درمانی را دارند[۷ -۸]. مطالعه ای در رابطه با بررسی اثراسانس اسطوخودوس سیتوتوکسیک و اپوپتوتیک موجب مهار شدن سلولهای hela درسلولهای سرطانی فاز G1 و تایید اثر ضد توموری با مهار تکثیر سلولی و القای اپوپتوز بود[۱۰-۹]. یکی از ترکیبات آنتی اکسیدانیگاهی مربوط به مربوط به تیره نعنایان می باشد. سنبله ای کرکدار از این خانوده است که اغلب در دامنه ارتفاعات کوهستانی می روید. این گیاه دارای ساقه های کوتاه و پوشیده از کرک برگ هایی نسبتا ساده و باریک و گل هایی صورتی مایل به سفید دارد. در بخش های هوایی این گیاه به درمان مشکلات تنفسی، عفونی، روماتوئیدی و التهابی می پردازد. این گیاه به دلیل دارا بودن تری ترپنوئید های لاکتون استروئیدی C-۸۲ که به ویتانولید ها هم شناخته میشود در مبارزه با انواع سرطان ها بسیار موثر است[۱۱]. با توجه به خواص ضد سرطانی و آنتی اکسیدانی ترکیبات آشواگاندا هدف از انجام این مطالعه بررسی عصاره آشواگاندا بر بقا و بیان ژنP53 در رده سلولی A2780 سرطان تخمدان می باشد. ژن TC1 در ایجاد کارسینوم های مختلف و بدخیم های هماتولوژی دخالت دارد. همچنین بیان ژنTC1 منجر به بدخیمی در غده تیروئید می شود به طوری که می توان از آن به عنوان نشانگر بدخیمی استفاده کرد[۱۲]. رازیانه دارای یک ماده ضد التهاب به نام آنتول است که خواص ضد سرطانی فوق العاده ای دارد و در پیشگیری از سرطان تیروئید موثر است.

۲- متدولوژی

با توجه به تحقیق ارائه شده توسط مژگان شخص نیائی و همکاران ۱۴۰۱[۱۳]:

۲-۱- استخراج اسانس

برای تهیه اسانس گیاه رزماری از دستگاهی به نام کلونجر استفاده می شود ابتدا گیاه رزماری را به صورت پودر دراورده و درون بالن دستگاه ریخته و۳/۲ بالن از اب مقطر پر شد اسانس پس از۶ ساعت جمع آوردی و در یخچال و دور از نور نگهداری شد.

۲-۲- کشت سلول

رده سلولی (MCF_7) از بانک سلولی تهیه شد .برای کشت سلولی از محیط کشت DMEM حاوی۱۰٪سرم(FBS) استفاده شد و سلولها در انکوباتور با دمای 37^{o} سانتی گراد و در شرایط دارای۵٪ CO2 و رطوبت۹۵٪ نگهداری شدند.

بررسی اثر سمیت سلولی اسانس رزماری تست (MTT) ۱۰هزار سلول MCF_7 از هر چاهک از پلیت۹۶ خانه کشت داده شده و پس از۲۴ ساعت و چسبیدن سلولها به کف چاهکها، در معرض غلظت های مختلفی از اسانس رزماری قرار داده شد پس از گذشت زمان پلیت ها در معرض MTT و سپس DMSO قرار داده شدند. در نهایت نتایج توسط میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانو متر خوانده شد.

۲-۳- محاسبه IC^{50}

در هر یک از زمان ها محاسبه IC^{50}جهت به دست اوردن درصد توان حیاتی سلولهای MCF_7 در مقابل دوزهای مشخص از اسانس گیاه رزماری انجام شد.

۲-۴- استخراج RNA

۵۰۰ هزار سلول درون هر چاهک از پلیت۶ خانه کشت داده شد. پس از۲۴ ساعت اسانس رزماری با غلظت های مختلف به چاهک اضافه شد بعد از گذشت۲۴ساعت RNA توسط دستورالعمل کیت خریداری شده انجام شد.

۲-۵- بررسی کیفیت RNA

برای اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده نمونه ها روی ژل اگارز ۲ درصد مشاهده شد.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۲-۶- بررسی کمی RNA استخراج شده

توسط دستگاه نانو دراپ ارزیابی شد.

۲-۷- سنتز cDNA

ساخت cDNA از RNA استخراج شده انجام شد. پس با دستگاه PCR و بر اساس برنامه دمایی و زمانی اشاره شده در جدول۱، cDNA سنتز شد.

جدول۱- سیکل های سنتز cDNA

ردیف	مراحل	مدت زمان
۱	انکوبه شدن در دمای ۲۵ درجه	۱۰دقیقه
۲	انکوبه شدن در دمای۴۷ درجه	۶۰دقیقه
۳	پایان واکنش با دمای ۸۵ درجه	۵دقیقه

۲-۸- طراحی پرایمر ها

طراحی پرایمر ها مطابق جدول ۲ صورت گرفت.

جدول۲- مشخصات اغازگرها

نام ژن	توالی	TM	طول محصول
BIM F BIM R	GGCCCCTACCTCCCTACA GGGGTTTGTGTTGATTTGTCA	۶۰	۸۵
GAPDH F GAPDH R	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	۶۰	۶۶

۲-۹- Real Time PCR

برای سنجش میزان بیان ژن BIMتحت تاثیر اسانس رزماری واکنش Real Time PCR انجام می گیرد. جهت انجام این واکنش ابتدا مخلوط واکنش برای هر نمونه تهیه شد، سپس مخلوط واکنش آماده شد بر روی یخ با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر طی مراحل مختلف واکنش تحت تاثیر برنامه دمایی زمانی به شرح جدول۳ قرارگرفت. پس از پایان واکنش آنالیز منحنی ذوب صورت گرفت.

جدول۳- برنامه زمانی دمایی واکنش Real Time PCR

دما	زمان	مرحله
۹۵درجه	۱۵دقیقه	Pre-denaturing (یک سیکل)
۹۵درجه	۲۰ثانیه	Denaturing (۴۰سیکل)
۶۰درجه	۴۰ثانیه	Annealing(۴۰سیکل)

جهت بررسی تفاوت هایایجاد شده ناشی از تاثیر اسانس به میزان بقای سلولی و بیان ژن BIM در سلول های تیمار شده با اسانس رزماری از ازمون تحلیل واریانس و Student's T_test در سطح معنی داری ۰,۰۵استفاده شد. با توجه به تحقیق ارائه شده توسط مهتاب رضایی و همکاران ۱۳۹۹[۱۴] برای تهیه عصاره گیاهی ابتدا قسمت هوایی گیاه اسطوخودوس جدا شد. بعد از شستن و خشک شدن،ان قسمت به خوبی ساییده شد و به شکل پودر شده درامد. به ۲۵۰ گرم از پودر۱ لیتر اتانول ۷۰ ٪اضافه شد و به مدت۴ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس محتوای ظرف را از فیلتر، صاف و مایع بدست امده روی بن ماری قرار گرفت تا زمانی که اب ان به طور کامل بخار و یک ماده قیر مانند ایجاد شد.در پایان این عصاره ها را گرداوری و برای تهیه غلظتهای مورد نظر در فریزر۲۰- درجه سانتیگراد منتقل شدند.هنگام درمان با سلولهای مذکور در غلظتهای۱، ۱۰، ۱۰۰و ۱۰۰۰ .میکروگرم در میلی لیتر از عصاره ها استفاده شد. برای تعیین غلظتهای فوق اتانول به کار برده شد.برای گروه کنترل هم حدود۱۰۰میکرولیتر از محیط DMEM به ان اضافه شد و مجددا در انکوباکتور قرار گرفت رده سلولی مورد نظر HepG2مربوط به سرطان کبد از مرکز تحقیقاتی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای کشت این سلول ها محیط MEM سوئد در دمای 37^{o}سانتی گراد و میزان ۵ ٪کربن دی اکسید مورد استفاده قرار گرفت.محیط کشت فلاسک کامال تخلیه شد.بعد از خارج کردن PBS به منظور جداشدن سلولها از کف

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

فالسک انزیم تریپسین ایاالت متحده اضافه شد و در دمای ۳۷°درجه سانتی گراد به مدت ۲تا۳دقیقه انکوبه شد و محیط کشت روزانه تعویض و هر ۳تا۴روز پاساژ داده شد.

به منظور سنجش سمیت سلولی نمک MTT به نمونه ها اضافه و توسط یک انزیم میتوکندریایی شکسته می شود و تولید فورمازون نامحلول می کند. به منظور بهینه سازی تعداد سلولها برای تیمار با عصاره الکلی تهیه شده توسط الم هموسایتومتر اندازه گیری شد و انجام تست MTT در دو سری پلیت ۹۶ خانه زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد و ده هزار سلول معادل ۱۰۰میکرولیتر درهر چاهک قرار گرفت .در ادامه ان چهار غلظت از عصاره الکلی اسطوخودوس تهیه و سلول های رده HepG2 با انها درمان شدند که این گروه با گروه کنترل(سلول های فاقد عصاره)مقایسه شدند. میزان جذب رنگ تولیدی در طول موج ۶۰۰تا۵۰۰نانومتر خوانده شد. بر اساس نتایج غلظتی از عصاره که اندازه نصف جذب انجام شده در کنترل منفی است به عنوان ICso در نظر گرفته شد. یعنی غلظتی که باعث ۵۰٪ جمعیت سلولی درمان شدند. به منظور بررسی تاثیر عصاره اسطوخودوس بر سیکل سلولی پس از شست و شوی ،سلولها انکوباسیون و شمارش سلولی ۲,۵ میلی لیتر از حجم سلولی معادل(۲۰۰۰۰۰سلول)و ۹,۵ میلی لیتر محیط کشت به هر چاهک از پلیت ۶خانه ای افزوده و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه و پس از گذر زمان مذکور و انتقال محتویات پلیت به فالکون سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه انجام و به قسمت پالک ۱میلی لیترPBSافزوده شد و پس از چندین مرتبه پیتاژ مجددا سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰دور بر دقیقه و به مدت ۵دقیقه انجام گرفت .سپس به رسوبحاصل ۴,۵ میلی لیتر اتانول ۷۰٪و ۰,۵ میلی لیتر PBS افزوده شد پس از چندین مرتبه پیپتاژ کردن در اخر تست سیکل سلولی محلول پروپیدیوم یدید به ترکیب نهایی افزوده و جذب در طول موج ۶۰۰و۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه فلوسایتومتر خوانده شد.

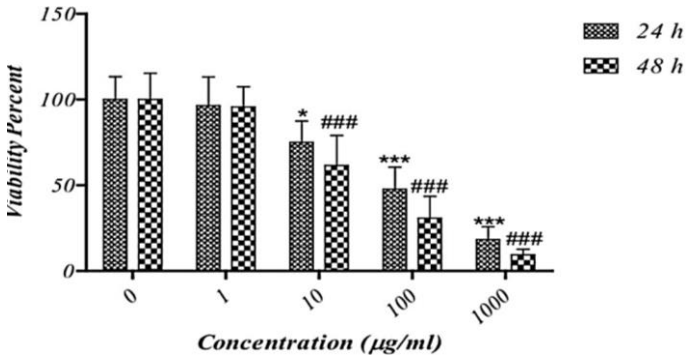
گونه های فعال اکسیژنی ملکول های کوچک ناپایدار و بسیار واکنش پذیری هستند که می توانند پروتئین ،ها لیپیدها و DNA اکسید کنند وبا احیای ناقص ، یک الکترون اکسیژن تشکیل دهند .اماده سازی در این مرحله مربوط به سیکل سلولی بود .با پایان مدت زمان ۲۴و۴۸ ساعت به هر یک از پلیت های ۶،خانه دو عدد فالکون مجزا برا انتقال محتویات از فالکون ها به چاهک های مربوط به خود انتخاب شد.

در اخر ۰,۵ میلی لیترDCHF به پلیت سلولی اضافه شد. به منظور اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپید های، غشایی ۵۰۰۰۰۰سلول شمارش و سپس سانتریفیوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه انجام شد .به رسوب حاصل تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ اضافه شد. بعد سلول ها به مدت ۲دقیقه با تعداد ۶۰ سیکل در ثانیه سونیکیت شدند و بعد از شفاف شدن محلول حاوی سلول و همگن سازی سانتریفیوژ با سرعت ۱۲۰۰دور بر دقیقه به مدت ۱۰دقیقه انجام شد .در مرحله بعد محلول رویی ۰,۵ میلی لیتر تیوباربیورتیک اسید۰,۵٪ اضافه شد و به مدت ۳۰دقیقه در بن ماری در دمای ۱۰۰°سانتی گراد قرار گرفت. در اخر میزان مالونیل دی الدئید حاصل از تخریب لیپید های غشایی با اندازهگیری جذب طول موج ۵۳۲-۶۰۰ نانومتر محاسبه شد. نتایج به صورت میانگین آماری حاصل از حداقل ۳تکرار مستقل بیان شدند .تفاوت معنی داری میان گروه ها با حدود اطمینان ۹۵٪ ($P<0.05$)گزارش شد.

در این مطالعه از رده سلولی سرطانی کبد استفاده شد که تحت دو گروه شاهد و تیمار با عصاره تقسیم شدند طبق ساعات ۲۴و۴۸ساعت صورت گرفت. اثر سمیت عصاره در زمان های مختلف در سلول سرطانی و سلول تحت این عصاره بررسی شد. شکل۱ تاثیر عصاره به روش MTT بر رده سلولی سرطان کبدHepG2 را نشان میدهد.مقدار IC50 حاصل از درمان با عصاره اسطوخودوس در زمان های ۲۴و۴۸ ساعت به ترتیب ۸۰,۶۲ و ۲۶,۵۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

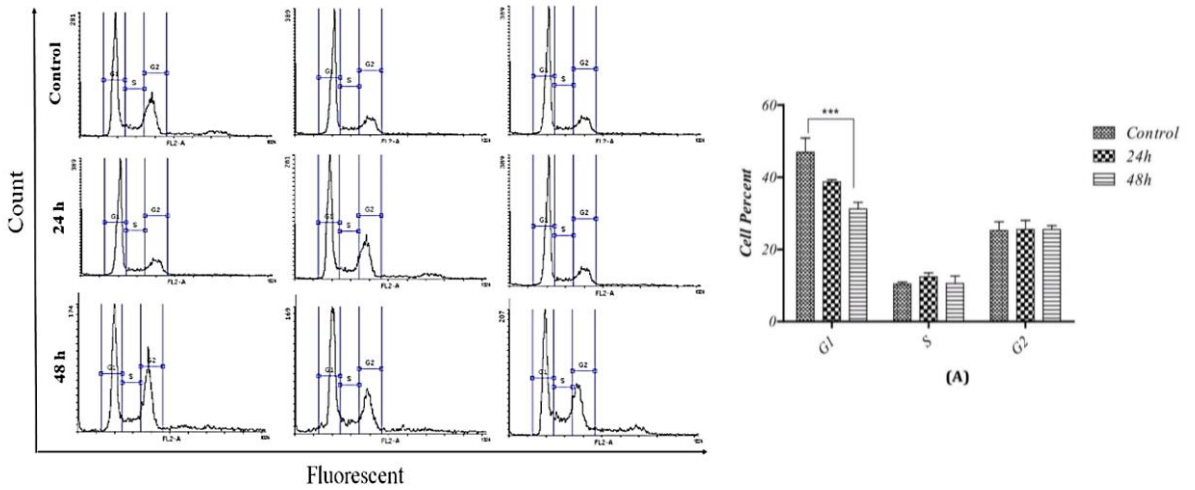


شکل ۱- نمودار دوز-پاسخ؛نتایج حاصل از تست سمیت با استفاده از MTT در غلظت های مختلف عصاره

نتایج حاصل از تست سمیت با استفاده ازMTT در غلظت های مختلف عصاره ها(سطوخودوس۱،۱۰،۱۰۰و۱۰۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر و غلظت صفر به عنوان شاهد)در۲۴ و۴۸ ساعت؛ نتایج به صورت میانگین اماری گزارش شدند.

انالیزهای انجام شده اختلاف معناداری در فاز های G1،G2،S میان گروه شاهد و گروه تیمار ۲۴ساعت نشان نداد. پس این عصاره در ان بازه زمانی فاقد اثر بر سیکل سلولی به معنای، افزایش کاهش و یا حتی القای اپوپتوز در هر یک از فاز های سیکل سلولی و تاثر بر سلولهای سرطانی بافت کبد HepG2 بوده است. اما تیمار ۴۸ساعته در فاز G1 چرخه سلولی اثر داشته است و موجب افزایش میزان نرخ مرگ و میر القای اپوپتوز در سلول های سرطانی شده است.

شکل ۲ نتایج حاصل از معنا داری فاز های سیکل سلولی در دو گروه شاهد و تیمار را نشان می دهد. طی انالیز های انجام شده مقدار p-value درگروه تیمار۲۴ و۴۸نسبت به گروه شاهد به صورت معنادارگزارش شد. نتایج حاصل از میزان تولید گونه های ازاد اکسیژنی در شکل ۳مشاهده می شود. شدت تاثیرگذاری در ۲۴ساعت دون بیشتر گزارش شد و میزان تولید گونه های ازاد واکنشگر افزایش یافت.



شکل۲- نتایج حاصل از معنا داری فاز های سیکل سلولی در دو گروه شاهد وتیمار

اثر عصاره اسطوخودوس روی توضیح چرخه سلولی رده سلولیHepG2 ؛ هیستوگرام فلوسایتومتری گروه شاهد و غلظتهای مختلف تیمار

A) مقایسه سه فاز چرخه سلولی تحت تاثیر عصاره اسطوخودوس پس از۲٤ و٤٨ ساعت

B) عصاره اسطوخودوس سلول را در فازG2 پس از۲٤ ساعت متوقف می کند

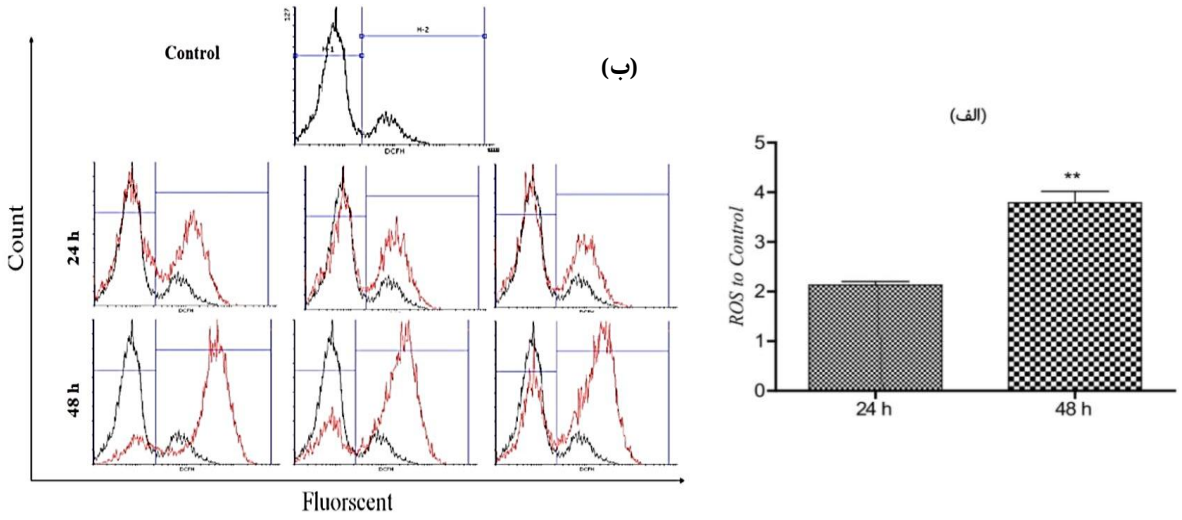
*** بیانگیر معناداری در سطحP<0.001 است**

**** نتایج به صورت میانگین اماری نشان داده شده اند**

همچنین نتایج حاصل از میزان تولید گونه های ازاد اکسیژنی در شکل ۳ مشاهده می شود. شدت تاثیرگذاری در ۲۴ساعت دوز بیشترگزارش شد و میزان تولید گونه های ازاد واکنشگر افزایش یافت.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل۳) نتایج حاصل از میزان تولید گونه های ازاد اکسیژنی
مقایسه میزان تولید گونه های ازاد واکنشگر در گروه تیمار۲٤و٤٨ ساعت
(الف)و گروه شاهد(ب) رده سلولیHepG2 که با دستگاه فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت
****نشان دهنده معنا داری در سطح$P<0.001$ است**
نتایج به صورت میانگین اماری گزارش شده اند

پس از انالیز های انجام شده حاصلخ از نتایج، اولیه اختالف معناداری بین میزان تولید مالون دی الدهید در گروه های شاهد و تیمار ۲۴ساعت و همچنین در مقایسه گروه شاهد و تیمار ۴۸ ساعت سلول های سرطانی بافت کبد در سطح$P<0.05$خ مشاهده شد.

با توجه به تحقیق ارائه شده توسط اسماعیل پناهی کوخدان و همکاران ۱۳۹۸[۱۵]در اینجا اندام هوایی گیاه سنبله ای کرکدار از ارتفاعات کوه و تا استخراج، پس از جمع آوری گیاهان مقدار ۱۰۰ گرم از گیاه در ۸۰۰ میلی لیتر متانول ۷۰ درصد خیسانده شد و به مدت۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت، عصاره آن صاف و باقی مانده بعد از۲۴ ساعت بار دیگر با متا نول عصارهگیری شد و به عصاره اولیه اضافه گردید. بعد از آن حالل در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به وسیله دستگاه روتاری تبخیر و به سیله دستگاه فریز درایر به عصاره خشک تبدیل شد. برای تهیه عصاره آلکالوئید ۲۰۰ گرم پودر گیاهstachys pilifera با ۵۰۰ میلی لیتر پترولیوم اثر به مدت۳ شبانه روز به روش خیساندن (ماسراسیون) عصاره گیری و پس از صاف کردن و تلغیظ با دستگاه روتاری به نسبت برابر متانول ۷۰ درصد سرد به عصاره اضافه در این جا دو فاز ایجاد می شود، فاز رویی عصاره روغنی (حاوی ترکیبات غیرقطبی) ونازوپرین شامل سایر ترکیبات گیاه می باشد در مرحله بعد به نسبت برابر اسید کلریدریک ۲۰ درصد به محلول متانول قبلی اضافه گردید تا سایر ترکیبات رسوب کنند. پس از صاف کردن این محلول به محلول حاصل مقداری آمونیاک اضافه شد در اینجا مجددا دو فاز ایجاد که فاز زیرین حاوی آلکالوئیدهای گیاه می باشد. به مح صول کلروفرم اضافه شد تا آلکالوئیدها وارد فاز کلروفر می شود و سپس این محلول را با کاغذ صافی صاف و درانکوباتور۳۷ . درجه خشک شد[۱۶] رده سلولیHT-29 مربوط به سرطان کلورکتال با منشاء انسانی از انستیتو پاستور ایرانی به صورت ویال خریداری و با محیط کشتMI-1640 سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، پنی سیلین به میزان ۱۰۰ یونیت بر میلی مول در دمای۳۷ درجه سانتی گراد و فشار۵ درصدCo۲ کشت داده شده برای تعیین اثرات بهینه عصاره از دوزهای مفید دارویی غلظت نزدیک به (ic50) در این تحقیق در نظر گرفته شد. همچنین سلول های تیمار شده به عنوان سلول های گروه کنترل و سیس پالتین به عنوان کنترل ثبت استفاده گردید. در اینجا برای افزایش بازده کار آزمایش ها به صورت تریپلیکیت انجام گرفت [۱۷-۱۸](۱-۱۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در نمودار۱ نشان داده شده است. با توجه به تحقیق ارائه شده توسط سیده مهیا مدرسی و همکاران ۱۴۰۲ [۱۹]:

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۲-۱۰- عصاره گیری با روش خیساندن

ابتدا پودر ریشه آشواگاندا با حالل هیدرو الکلی (با نسبت ۵۰/۵۰ شامل ۵۰ درصد اتانول ۹۶ درصد و ۵۰ درصد آب مقطر استریل) مخلوط شده و در دستگاه شیکر انکوباتور برای مدت۴۸ ساعت در دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده سپس عصاره حاصله فیلتر شده و درون انکوباتور۳۷ درجه گراد قرار داده شده تا عصاره صمغ مانندی به دست آید. بعد از دو روز عصاره خشک جمع اوری و در یخچال نگه داری شد. تست های کیفی تشخیص حضور ترکیبات فیتو شیمیایی در عصاره گیاهی عدم وجود ترکیباتی شامل فالونوئید, ترپنوئید, آلکالوئید, تانن, استروئید, ساپونین, استرول, گلیکوزید, پروتئین و ویتامینC در عصاره بررسی شد.

۲-۱۱- کشت سلول

رده سلولی سرطان تخمدان انسان رده (A2780) خریداری شد. برای کشت سلول از محیط کشت RPMI حاوی ده درصد سرم جنین گاوی (PBS) استفاده شد و سلول هاید رون انکوباتور با دمای۳۷ درجه سانتی گراد و۵ درصد کربن دی اکسید و رطوبت۹۵ درصد نگه داری شدند.

۲-۱۲- بررسی اثر سمیت سلولی عصاره آشواگاندا تست (MTT)

تعداد ۱۰ هزار سلولA2780 درهر چاهک از پلیت۹۶ خانه کشت داده شد. پس از۲۴ ساعت زمان محیط کشت رویی تخلیه و ۲۰۰ میکرو لیتر از عصاره با غلظت های ۶۲/۵، ۱۲۵،۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ میکرو گرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه و این تست برای بازه زمانی۲۴, ۴۸, ۷۲ ساعت انجام شد. بعد از هر بازه سلول ها در معرض MTT و سپس DMSO قرار گرفتند. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانو متر با دستگاه الیزا مدل ELx800 بررسی شد.

۲-۱۳- فرمول بقای سلولی

۱۰۰* جذب متوسط نمونه های کنترل /جذب متوسط نمونه های تیمار شده =درصد بقای سلولی

۲-۱۴- محاسبه IC50

میزان غلظتIC50 جهت به دست اوردن درصد توان حیاتی سلول هایA2780 وقابل دوزهای مختلف تیمار با استفاده از نرم فزارprism محاسبه شد.

۲-۱۵- بررسی بیان ژن P53 500

هزار سلول درون هر چاهک از پلیت۶ خانه کاشته بعد از۲۴ ساعت غلظت های ۲۵۰ و۵۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر از عصاره به هر چاهک اضافه شد. طبق برنامه دمایی جدول ۴ با استفاده از دستگاهPCR سنتز c DNA انجام شد.جهت تکثیر قطعه ژنی یک جفت آغازگر اختصاصی برای ژن هایP53 وGAPDH طراحی شد. توالی آغازگر ها مطابق جدول۵ است. طبق برنامه دمایی جدول۶ واکنش در دستگاه ریل تایم انجام شد. پس از پایان واکنش به منظور تایید .اختصاصی بودن و عدم حضور محصوالت غیر اختصاصی آنالیز منحنی ذوب صورت گرفت.

جدو ل٤ - سیکل ها دمایی سنتز c DNA

دما	زمان
۲۵درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه
۴۷درجه سانتی گراد	۶۰دقیقه
۸۵درجه سانتی گراد	۵دقیقه
۴درجه سانتی گراد	۲دقیقه

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

جدول۵- مشخصات اغازگرها

نام ژن	توالی	TM
P53 F P53 R	TGCAGCTGTGGGTTGATTCC AAACACGCACCTCAAAGCTGTTC	59
GAPDH F GAPDH R	AGCCACATCGCTCAGACAC GCCCAATACGACCAAATCC	60

جدول٦- برنامه زمانی و دمایی واکنشReal Time PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
Pre- denaturing	۹۴ درجه سانتی گراد	۱۰ دقیقه	۱
Denaturing	۹۵ درجه سانتی گراد	۱۵ دقیقه	۳۵
Annealing	۵۷ درجه سانتی گراد	۳۰ دقیقه	۳۵
Extension	۷۲ درجه سانتی گراد	۳۰ دقیقه	۳۵
Final extension	۷۲ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه	۱

۲-۱۶-آنالیز آماری

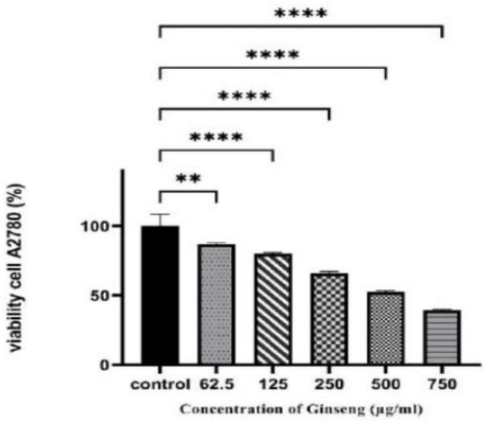
جهت بررسی تفاوت های ایجاد شده ناشی از عصاره آشواگاندا بر میزان بقایای سلول های تخمدان و بیان ژن P53 در سلول های تیمار شده با عصاره از آزمون تحلیل واریانسANOVA و T-test استفاده شده است.

۲-۱۷- نتایج

آزمون های فیتوشیمیایی انجام شده بیانگر وجود ترکیبات متفاوتی مانند: الکالوئیدها تری ترپنوئیدها، ویتامین c پروتئینها،گلیکوزیدها استرول ها، ساپونینها، فالونوئید تانن ها و استروئیدها در عصاره ریشه آشواگاندا همگی نتیجه مثبت داشته اند.

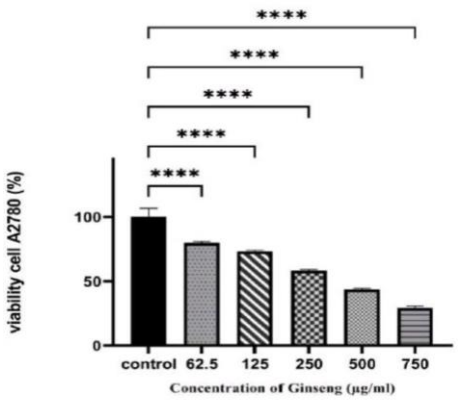
۲-۱۸- بررسی اثر عصاره آشواگاندا بر رشد رده سلولی A2780

با استفاده از ازمون MTTاثر عصاره بر بقای رده سلولی بررسی شد. بدین ترتیب، تاثیر عصاره بر درصد بقای سلولی در سه زمان ۲۴ساعت (شکل۴)،۴۸ساعت (شکل۵)،۷۲ساعت(شکل۶) به دست امد نتایج نشان میدهد که درصد بقای سلولی در مقایسه با گروه کنترل منفی در غلظت های ۶۲، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۲۵/۷۵۰،۵میکرو گرم بر میلی لیتر کاهش دارد کم ترین میزان بقای سلولی ۳/۱۲درصد پس از ۲۷ساعت در غلظت ۰۵۷میکروگرم بر میلی لیتر بود. IC50عصاره پس از تاثیر بر سلولهای A2780در زمانهای ۲۴و ۴۸و۷۲ به ترتیب ۵۱۲/۶ و۳۳۹ و۲۲۶/۴ را نشان می دهد.



شکل٤-تاثیر عصاره آشاواگاندا بر درصد بقای سلولی بر زمان ٢٤ ساعت

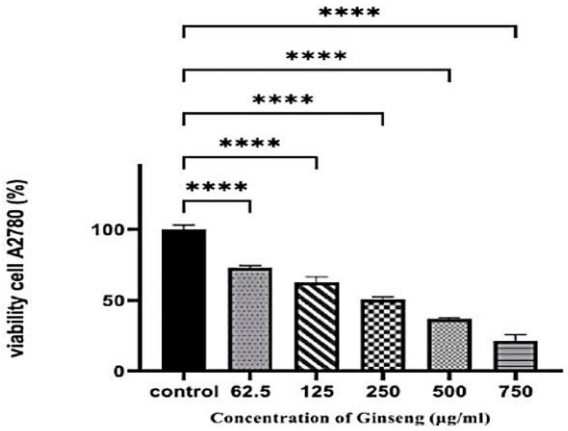
*** (p<۰,۰,۵۰) اختلاف معنادار با گروه کنترل را نشان می دهد.**



شکل٥- تاثیر عصاره آشاواگاندا بر درصد بقای سلولی در زمان ٤٨ ساعت

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



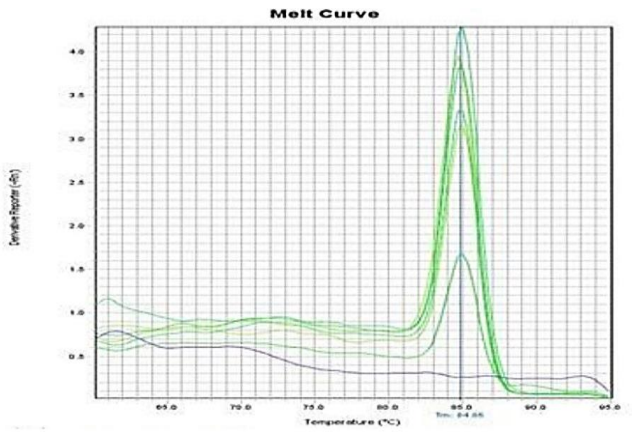
شکل٦- تاثیر عصاره آشواگاندا بر درصد بقای سلولی در زمان ۷۲ساعت
***(P<۰,۰,۵۰) اختلاف معنادار با گروه کنترل را نشان می دهد**

۲-۱۹- نتایج استخراجRNA و بیان ژن P53 تحت تاثیر عصاره آشواگاندا

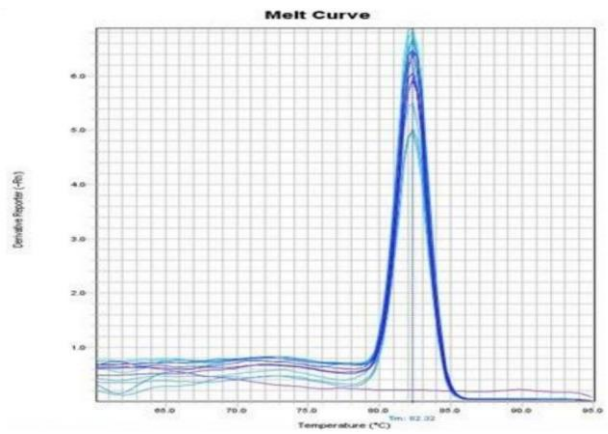
به منظور تعیین غلظت و خلوص RNA استخراج شده با دستگاه نانو دراپ جذب RNA گرفته شد طبق جدول ۷ نمونه های mRNA استخراج شده از غلظت خوب برخوردار بودند شکلهای ۸ و۷ منحنی ذوب هر یک از ژنها را نشان می دهد که نمایان گر دمای یک محصول PCR است. با آنالیز متحتی ذوب می توان وجود باندهای غیراختصاصی و پرایمر دایمر را تشخیص داد که در این مطالعه با استناد به منحنی های ذوب به دست آمده محصولات کاملا اختصاصی و فاقد پرایمر دایمر می باشند و همچنین بیان ژن PS3 با افزایش غلظت عصاره نسبت به گروه کنترل به طور معناداری افزایش یافته است (P≥۰,۰,۵۰).

جدول ٦- نتایج غلظت RNA استخراجی از سلول A2780

کنترل	24H	48H
	۱۳۹,۵	۵۱۰,۷۸
سلول های A2780 تیمار شده با عصاره آشواگاندا غلظت 250mg/ml	۵۱۱,۲	٦۹۰,۳۲
سلول های A2780 تیمار شده با عصاره آشواگاندا غلظت 500mg/ml	۲۸۱,۰٦	۲۹۱,۲۵



شکل۷- منحنی ذوب ژنP53 در سلول های تیمار شده با عصاره آشواگاندا



شکل۸ - منحنی ذوب ژنGAPDH در سلولهای تیمار شده با عصاره آشواگاندا

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

با توجه به تحقیق ارائه شده توسط خدیجه شاهرخ آبادی و همکاران ۱۳۹۸ [۲۰] مقدار ۳۰ گرم از دانه رازیانه توسط آسیاب برقی(مدل نیما-ایران)آسیاب گردید پودر تهیه شده به منظورعصاره گیری همراه با ۳۰۰ سی سی محلول آب و الکل در داخل کاغذ مخصوص در دستگاه سوکسکله قرار داده شد. عصاره گیری به مدت ۲۴ ساعت انجام گر دید وسپس با حذف حلال عصاره خشک شده به دست آمد بازده عصاره محاسبه گردید و سپس در مراحل مختلف آزمایش از غلظت های مختلف عصاره جهت تیمار استفاده شد[۲۱] سپس سلولهای BCPAP و L929 تهیه شده ازانیستیتوپاستوردر محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و۱درصد پنیسیلین- استرپتومایسین در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ در جه و رطوبت ۹۵ درصد رشد داده شدند. همچنین برای انجام آزمایش MTT و سنجش ،سیتوتوکسیسیتی با استفاده از رنگ MTT (dimethyl thiazol tetrazolium bromide)، در سه پلیت ۹۶ خانه ای، سلولهای BCPAP و L929 به صورت سه تایی کشت داده شدند. ۲۴ ساعت پس ازکشت غلظتهای ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به چاهک های سه تایی افزوده شد. یک ردیف سه تایی نیز به عنوان شاهد یا کنترل برای غلظت صفر درنظر گرفته شد. سپس بعد از ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت از انجام تیمارپلیتها با ۲۰میکرولیتر رنگ MTT تیمار گردید[۲۱-۲۲].

۲-۲۰- رازیانه

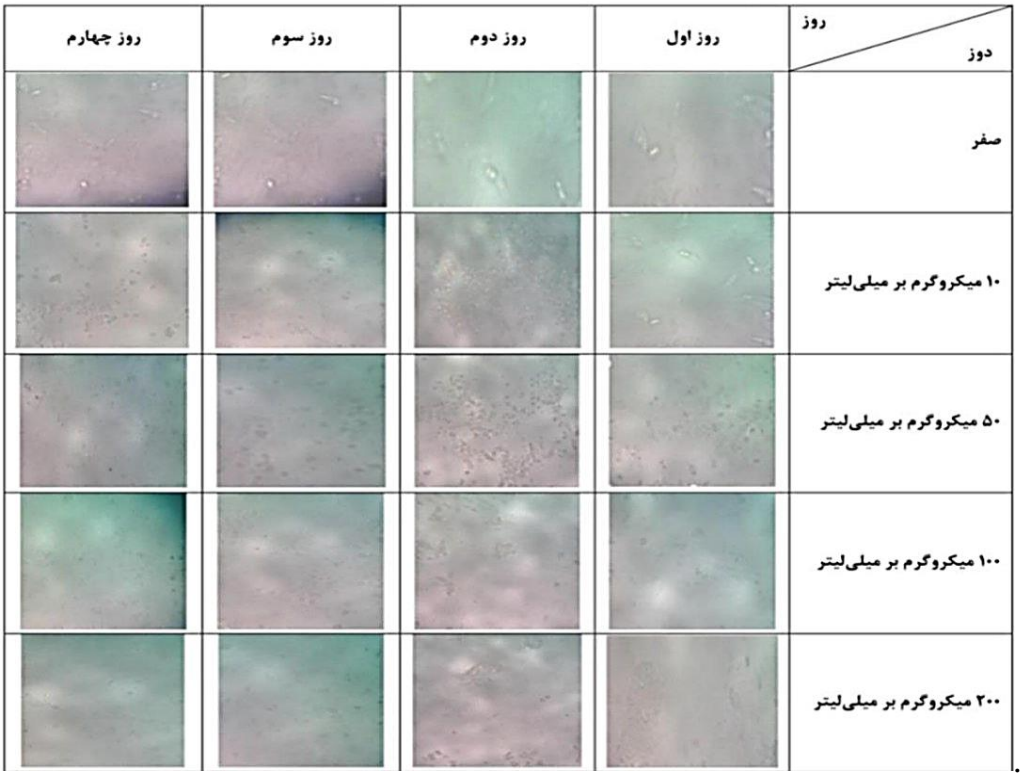
در نمونه های این گروه به تعداد ۱۸ سر عالوه بر القاءتومور پس از توموری شدن در روزهای ۱ و ۷ عصاره تام رازیانه با دوز ۷۵ میلیگرم برکیلوگرم بر حسب وزن بدن موش به صورت زیر پوستی تزریق شد. سپس نمونه برداری در روزهای۱۴، ۲۱ و ۲۸ صورت گرفت. از تمامی گروههای مورد مطالعه نمونه برداری از تیروئید صورت گرفت. از بافت های تهیه شده صورت گرفت. با استفاده از کیت استخراج RNA جهت بررسی کیفیت و کمیتRNA استخراج شده به ترتیب از ژل آگارز درصد استفاده شد. سپس برای تمام نمونه ها سنتز cDNA با استفاده از کیت پارس توس انجام شد [۲۳]. جهت انجام واکنش Real time- PCR ابتدا پرایمرهای ژن TC1 و GAPDH با استفاده از نرم افزار oligo نسخه ۷ واطلاعات ژن در Gene Bank طراحی گردید. سپس جهت اطمینان پرایمرها در NCBI،Blast گردیده است. آنگاه پرایمرها به شرکت ژنفناوران سفارش داده شد. واکنش Real time- PCRتوسط دستگاه EpachTE-آمریکا طبق برنامه زمانی انجام گردید. نتایج با کمک نرم افزار آماری تجزیه و تحلیل گردید و از روشهای آماری تکمیلی مثل آزمونهای t وANOVA استفاده شد. همچنین $p>۰۵/۰$ به عنوان سطح معنی داری درنظر گرفت.

۳- نتایج

همانگونه که در بخش قبل اشاره گردید این مطالعه با هدف بررسی تغییرات بیان ژن TC1 در تومور تیروتید انجام گردید. عصاره گیری از رازیانه به روش سوکسله انجام شد. نتایج نشان داد که بازده عصاره تهیه شده ۸/۱۳ گرم بود. نتایج مرفولوژی و تکثیر سلولی در شکل ۹ آمده است. همانگونه که درشکل ۴ دیده می شود عصاره رازیانه در روز اول و دوم و درغلظت های ۱۰۰ و۲۰۰ میکروگرم برمیلی لیتر منجر به توقف رشد و مرگ سلولها گر دیده است. به این ترتیب را افزایش غلظت عصاره رازیانه وافزایش زمان، تیمار مرگ سلولها نیز افزایش یافته است. مرگ سلولها به صورت دانه دانه یا دسته جمعی با توجه به شکل سلولی، ایجاد غشاءهای چروکیده دانه دار شدن هسته و سیتوپالسم ومرفولوژی به هم ریخته نسبت به گروه کنترل ارزیابی گردید. الزام به ذکر است مطالعات با سه بار تکرار و عکسبرداری هر روز درساعت مشخص و از مناطق نشانه گذاری شده در فالسک های کشت صورت گرفته است. همزمان تست MTT بر رو ی سلولها در زمانهای۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام گردید.

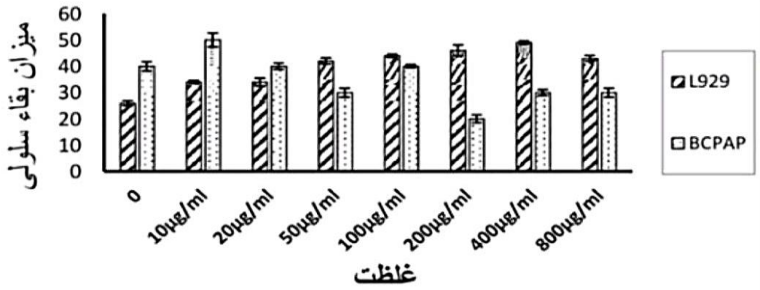
Archive of SID.ir

Archive of SID.ir



شکل۹- سلولهایBCPAP تیمار شده با عصاره رازیانه با غلظت۲۰۰،۱۰۰،۵۰،۱۰ میکرو گرم بر میلی مترو مطالعه آن ها در روز های اول و دوم و سوم وچهارم بعد از تیمار تفاوت تکثیر میان نمونه کنترل نسبت به تیمار های مختلف مشاهده می گردد کاهش تعداد سلولها و مرفو لوژی تغییر یافته به خصوص در تیمارهای۲۰۰و۱۰۰ مشاهد می شود.

نتایج MTT بر روی ردههای سلولی پس از ۴۸ ساعت در شکل۱۰آمده است. همانطور که در شکل مشاهده می شود ردۀ سلولی L929به عنوان رده نرمال سلولی نه تنها در برابر غلظتهای مختلف عصاره، کاهش میزان بقاء نداشته بلکه نمونه تیمار شده نسبت به نمونۀ کنترل رشد بیشتری نیز شته است که بیشترین رشدمربوط به غلظت ۴۰۰میکروگرم بر میلی لیتر بوده است و این افزایش رشد معنیدار (P<۰/۰۵) است. در صورتی که ردۀ سلولیBCPAP در اثر تیمار با عصارۀ کاهش تکثیر و کاهش بقای سلولی نشان داده است که این کاهش نسبت به کنترل معنی داراست (P<۰/۰۵)کمترین بقاء سلولهای BCP AP در غلظت۲۰۰میکروگرم بر میلی لیتر بوده است. الزام به ذکر است نتایج۲۴ساعت مربوط به تست MTT به دلیل معنی دار نبودن تغییرات آن گزارش نشده است.



شکل۱۰- بررسی میزان سمیت عصاره رازیانه برروی رده ی سلولیL929 وBCPAP پس از۴۸ ساعت مقایسه میزان بقا در نمونه های کنترل نسبت به تیمار،کاهش میزان بقا در غلظت های۲۰۰ به بعد معنی دار است

هدف مهم دیگر این تحقیق بررسی میزان تغییرات بیان ژنTC1، به عنوان یکی از چندین ژن تغییر دهندهم سیرسیگنالینگ سلولهای سرطانی بود. بنابراین درمیان نمونه های توموری روزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بیشترین بیان ژن مربوط به روز ۲۸ است. افزایش معنی دار بیان ژنTC1، ۲۸ روز پس از القاء تومور نشان دهنده ارتباط ژن TC1 با مراحل سرطانی شدن تیروئید است. همچنین در میان نمونه

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

های تیمار شده با عصاره رازیانه،کاهش بیان ژن در روز ۲۸ نشان دهنده عملکرد مطلوب عصاره درجلوگیری از بیان ژن TC1 است الزام به ذکر است معنی داری درسطح p>۰۵/۰ با استفاده از خروجی دستگاه RealTime محاسبه شده است.

توموری۱۴ روزه نمونه تیمار با عصاره رازیانه پس از ۱۴ روز نمونه تو موری۲۱ روزه نمونه تیمار با عصاره پس از۲۱ روز نمونه توموری ۲۸ روزه ونمونه تیمار با عصاره پس از۲۸روز حداکثر افزایش بیان ژن در T28 وحداقل کاهش بیان ژندر T14 دیده شده است

هدف مهم دیگر این تحقیق بررسی میزان تغییرات بیان ژن TC1، به عنوان یکی از چندین ژن تغییر دهنده مسیرسیگنالینگ سلول های سرطانی بوده بنابراین با توجه به شکل ۳، درمیان نمونه های توموریروزهای ۱۴، ۲۱ و ۲۸ بیشترین بیان ژن مربوط به روز ۲۸است. افزایش معنیدار بیان ژن TC1، ۲۸ روز پس از القاء تومور نشان دهنده ارتباط ژن TC1 با مراحل سرطانی شدن تیروئید است. همچنین در میان نمونه های تیمار شده با عصاره رازیانه،کاهش بیان ژن در روز ۲۸ نشان دهنده عملکرد مطلوب عصاره درجلوگیری از بیان ژن TC1 است. الزام به ذکر است معنی داری درسطح p>۰۵/۰ با استفاده از خروجی دستگاه RealTime محاسبه شده است.

۴- بحث

تحقیق انجام شده توسط مژگان شیخ نیایی و همکاران در سال ۱۴۰۱[۱۳]:

آپوپتوز یک فرایند سلولی منظم و مرتب است که در شرایط فیزیولوژیک اتفاق می افتد شناخت مکانیزم پایه آپوپتوز مهم است زیرا نقش مهمی در پاتوژنز در بسیاری از بیماریها دارد سرطان در میان زنان ایرانی است طبق آمار جدید در ایران سالانه سرطان پستان تشخیص داده می شود و ۱۰۶۳ مورد مرگ و میر ناشی از آن است [۵و۲۴] سانس رزماری خواص انتی اکسیدانی دارد که این خاصیت به علت وجود ترکیباتی همچون ترکیبات فنولی، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید کارنوسول و فلانووئیدها است که در درمان سرطان مورد استفاده قرار میگیرد [۲۵] در مطالعه حاظر جهت ارزیابی سمیت اسانس رزماری از ازمون MTT که یک ازمون استاندارد برای ارزیابی میزان بقای سلول می باشد استفاده شد. مطالعه حاضر جهت ارزیابی سمیت اسانس رزماری از ازمون MTT که یک ازمون استاندارد برای ارزیابی میزان بقای سلول می باشد استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش به طور کلی اثرات مهاری اسانس رزماری را بر رده سلولی سرطان پستان نشان داد یافته های تحقیقاتی گذشته حاکی از این است که اسانس رزماری گسترش برخی سلولهای توموری را مهار میکند خواص ضد سرطانی رزماری از طریق تغییرات ملکولی در فرایند چند مرحله ای توسعه سرطان که وابسته به دوز است نه بافت یا گونه خاص کشف شده است که رزماری قادر به سرکوب کردن تومور در چندین اندام از جمله کولون، کبد، پستان، معده و... است. نتایج این مطالعات نشان داده است که ترکیبات گیاه رزماری اهداف مختلف مولکولی را تحت تاثیر قرار داده و اجزای فعال ان شاخصهای مفید موفقیت در آزمایشات پیشگیری شیمیایی سرطان می باشد[۲۶].

با توجه تحقیق انجام شده توسط مهتاب رضایی و همکاران در سال ۱۳۹۹[۱۴] توجه به هزینه های زیاد مواد شیمیایی برا درمان سرطان که نتیجه قابل قبولی حاصل نشد از محصولات طبیعی مورد توجه قرار گرفته است [۶] که تقریبا ۹۰ مورد از ۱۲۱ دارو درمان سرطان منشا گیاهی دارند که این عصاره گیاهی دارویی خاصیت انتی اکسیدانی دارد که باعث تحریک اپوپتوز رده های مختلف سلولهای سرطانی می شود[۲۷]. غربالگری فتوشیمیایی گیاه اسطوخودوس حاکی از وجود مولکولهای زیستی فعال بوده است؛ الکل پریلیل و فلاوونوئید موجود در اسطوخودوس از جمله ترکیبات مهم در شیمی درمانی به شمار می روند [۲۹-۲۷] در میان ترکیبات موثر اسطوخودوس اسانس هایلینالول و لینالیا استات همچنین پرلیل الکلهای آن بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. نتایج حاصل از اثر سمیت عصاره موجب مهار چرخه سلولی سلول های سرطانی بافت کبد در فاز G1 در گروه تیمار ۴۸ ساعت می شود نتایج فلوسایتومتری بیانگر افزایش تولید گونه های آزاد اکسیژنی در گروه تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت سلولهای سرطانی لاین کبدی HepG2 در مواجهه با عصاره بود و شدت تولید ROS در تیمار ۴۸ ساعت نسبت به تیمار ۲۴ ساعت روند صعودی تولید گونه های ازا اکسیژنی را گزارش کرد. بررسی میزان پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی در این مطالعه بیانگر افزایش پراکسیداسیون لیپیدی در تیمار ۲۴ و ۴۸

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

ساعت سلولهای سرطانی HepG2 در مقایسه با گروه شاهد و افزایش میزان مالون دیآلدهید بود. در حقیقت می توان گفت افزایش محتوای MDA به عنوان بیومارکری برای تعیین میزان آسیب غشایی است [۳۰].

باتوجه به تحقیق انجام شده توسط اسماعیل پناهی کوخدان وهمکاران در سال ۱۳۹۸[۱۵] سرطان کلورکتال سومین سرطان بدخیم در دنیا بوده و شیوع آن در اکثر کشورهای دنیا از جمله ایران رو به افزایش می باشد. عوامل محیطی اثرگذار می توان به آلودگی هوا، استرس، الگوی زندگی و رژیم غذایی افراد اشاره کرد. یکی از راه های پیشگیری و کاهش ابتلا به سرطان استفاده از مواد غذایی حاوی آنتی اکسیدان می باشد.[۳۱] از طرفی با وجود راه های درمانی مانند جراحی، شیمی درمانی، رادیوتراپی همچنان مرگ و میر در زمینه سرطانی طی سال های اخیر افزایش داشته. از جمله این مکمل های غذایی می توان به عصاره گیاه سنبله ای کرکدار اشاره داشت که در این تحقیق کارآیی آن را بر روی سرطان کولورکتال HT-29 بررسی کرده و می کنیم [۳۲]. داروهای گیاهی در کنار ارزان بودن و قابلیت دسترسی آسان عوارض جانبی بسیار کمی دارند. بسیاری از داروها از جمله آسپرین، دیگوسین و مورفین در گذشته منشاء گیاهی داشتند [۳۳].

باتوجه به تحقیق انجام شده توسط سیده مهیا مدرسی وهمکاران در سال ۱۴۰۲[۱۹] بررسی آن ها نشان می دهد که Withania Somniferaیکی از پرمصرف ترین گیاهان در میان بیماران سرطانی می باشد. روش های مولکولی که برای عصاره های گیاهی و ترکیبات جدا شده از شرق بررسی شده است شامل توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس با مشارکت عاملان اصلی در این فرآیندها مانند پروتئین P53 و غیره است.P53 یکی از ژن های بسیار مهم درتنظیم فرایند آپوپتوزیس است. از آن جا که میزان و فعالیت P53 یک عامل تعیین کننده در حساسیت به داروهایی نظیر سیس پلاتین در سلول های سرطانی از جمله سرطان تخمدان است، کاهش فعالیت و مقدار P53 می تواند در مقاومت به شیمی درمانی نقش داشته باشد. W. Somnifera پتانسیل چند مدلی را برای الف(ارتقا مرگ سلولی، بداخلدر سیگنالینگ سلول سرطانی) و ج (مهار پیشرفت متاستاتیک فراهم می کند). عصاره W. Somnifer باعث بهبود فعالیت دارویی پاکلیتاکسل در شیمی درمانی در مدل حیوانی شده است. طی یک مطالعه Halder و همکاران[۳۴] برای اولین بار اثر سایتوتوکسیک عصاره ریشه گیاه آشواگاندا را بر سلول های ملانومای بدخیم انسانی رده سلولی (A375) بررسی کردند. در این تحقیق برای بررسی تاثیر و تعیین سمیت عصاره الکلی آشواگاندا برسلول های سرطانی تخمدان در محیط کشت از آزمون MTT که یک ازمون استاندارد برای ارزیابی میزان بقاء سلول به شمار می رود؛ استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش به طور کلی، اثرات مهاری عصاره آشواگاندا رابر رده سلولی سرطان تخمدان از نظر وابسته به دوز و زمان نشان داد.

با توجه به تحقیق انجام شده توسط خدیجه شاهرخ آبادی و همکاران درسال ۱۳۹۸[۲۰]یکی از مهمترین علل سرطان تیروئید جهش و تغییر میزان بیان در ژنهاست. ژن TC1 ژنی در مهره داران است که در کارسینوم های مختلف و بدخیم های هماتولوژی دخالت دارد. این ژن منجربه بدخیمی در تیروئید نیز می شود [۳۵] تحقیقات علمی موجود در مورد رازیانه نشان می دهد که رازیانه خواص دارویی مهمی دارد. به ویژه اینکه در درمان تشنج ، التهاب، سرطان، یبوست، مشکلات کبدی، زخم دهان ومعده استفاده می شود [۳۶]. همانطور که گفته شد در روز چهاردهم بعد از القاء و تیمار، افزایش بیان مشاهده شد که این امراحتمالاً نشان دهنده آن است که عصارهٔ رازیانه تا روز چهاردهم اثر تحریک کنندگی بر بیان ژن داشته است. اما نتایج روز ۲۱ و۲۸ تاثیر عصاره رازیانه نشان دهنده اثر مطلوب عصاره برکاهش بیان ژن TC1 است. این نتایج می تواند به این دلیل باشد که مطابق با مطالعات انجام شد آنتی اکسیدان های قوی موجود در خم رازیانه نه تنها برای پیشگیری از ابتلا به سرطان مؤثراست بلکه برای حفظ سلامت تمام اعضای بدن نیز مفیدند [۳۶]. همچنین از گذشته های دور تاکنون دانش استفاده از گیاهان دارویی، بدلیل متابولیتهای ثانویه و مواد زیستی، آن را به سمت استفاده از طب گیاهی سوق داده است [۳۷]. در این تحقیق به نظر می رسد رشد ردهٔ سلولی L929 به دلیل خاصیت ضد میکروبی و حفاظت سلولی رازیانه باشد. همچنین نتایجی که از تیمار ردهٔ سلولی BCPAP با عصارهٔ رازیانه بدست آمد خاصیت ضد سرطانی رازیانه را تائید می کند. از نتایج مطالعات گذشته و نتایجاین تحقیق می توان برداشت نمود که احتمالاً ژن TC1 در مراحل اولیهٔ سرطان توسط ژنهای مسیر wnt/B- catenin سرکوب می شود ولی در مراحل پیشرفته تر سرطان که می تواند مرحلهٔ متاستاز و تهاجمی شدن تومور باشد، افزایش می یابد. بنابراین شاید بتوان از ژن TC1 به تنهایی یا به صورت ترکیب با سایرژنها، به

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

عنوان مارکری برای تمایز بین نمونه های بدخیم وخوش خیم استفاده کرد و یا حتی شاید بتوان بیان بسیاربالای این ژن را نشانهٔ تهاجمی شدن سرطان در نظر گرفت. بنابراین پیشنهاد می گردد که از این تغییرات به عنوان مارکر بدخیمی همراه با سایر ژنها، که جهش آنها درسرطان تیروئید اثبات شده است استفاده گردد.

۵- نتیجه‌گیری

پس طبق تحقیقات انجام شده پی بردیم نتایج نشان می دهند که اسانس رزماری باعث افزایش بیان ژنBimشده است نتایج تحقیقات صورت گرفته بر تاثیر اسانس های گیاهان مختلف بربیان ژنهای اپو پتوتیک درانواع از سرطان ها را نشان می دهد که ترکیبات گیاهی که قادر به القای تغییر در میزان بیان این ژن ها می باشند. از سوی دیگر در سلولهای سرطانی بافت کبد نمونه موش صحرایی در تیمار با عصاره اسطوخودوس میزان مالون دی آلدهیدافزایش یافت [۳۸]. تیمار سلولهای HT2 با عصاره متانولی و فرکشنهای آلکالوئیدی و ترپنوئیدی مهار رشد این سلولها شده و اثراث سایتوتوکسیک القا شده این عصاره ها با غلظت ارتباط مستقیم دارد به طوری که قابلیت زیست پذیری سلولها با افزایش غلظت کاهش می یابد. تیمار با عصاره آشواگاندا باتوجه به ویژگی آنتی اکسیدانیش خاصیت کشندگی بر روی سلولهای رده A2780 و اثر بر کاهش بقای اینسلولهای سرطانی را تایید کرد. عصارهٔ تام رازیانه بر روی رده سلولی نرمال اثر مثبت داشته است که هم سو با مطالعات گذشته بوده و تأئیدی بر خاصیت محافظت سلولی و ایمن بودن رازیانه و اینکه فاقد عوارض جانبی است، می باشد.

۶- مراجع

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. StemCells, Cancer, and Cancer Stem Cells. Nature 2001;414(6859): 105-11.

2. Wu Q, Wang C, Lu Z, Guo L, Ge Q. Analysis of Serum Genome-Wide Micrornas for Breast Cancer Detection. Clinica Chimica Acta 2012; 413(13-14): 1058-65.

3. Anderson WF, Chu KC, Chatterjee N, Brawley O, Brinton LA. Tumor Variants by Hormone Receptor Expression in White Patients With Node-Negative Breast Cancer from the Surveillance, Epidemiology, and End Results Database. J Clinical Oncology 2001; 19(1): 18-27.

4. Nooshinfar E, Bashash D, Mohamadi G, Taghavi A, Shahani M, Hoseini L, Akbari ME. Melatonin and Its Importance in Breast Cancer Prevention and Treatment (A Purposed Review Article). The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility 2014; 17(118): 10-21.

5. Ernst E. Heavy Metals in Traditional Indian Remedies. Eur J Clin Pharmacol 2002; 57(12): 891-6.

6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in

Cancer. J Int 2008. GLOBOCAN 2008:2010;127(12):2893-917

7. Dalilan S, Rezaei-Tavirani M, Nabiuni M, Heidari- Keshel S, Azodi MZ, Zali H. Aqueous extract of Lavender angustifolia inhibits lymphocytes proliferation of Hodgkin's lymphoma patients. Iran J Cancer Prev. 2013;6(4):201-8.

8. Hamzeh S, Safari-Faramani R, Khatony A. Effects of aromatherapy with lavender and peppermint

essential oils on the sleep quality of cancer patients: A randomized controlled trial. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;2020:7480204

9. Chhetri D, Parajuli P, Subba G. Antidiabetic plants used by sikkim and darjeeling himalayan tribes, india. Journal of Ethnopharmacology 2005; 99(2): 199-202.

10. Zargari A. Medicinal plants. Tehran: Tehran University Press; 1992; 45

11. Dutta R, Khalil R, Green R, Mohapatra SS, et al. Withania Somnifera (Ashwagandha) and Withaferin A: Potential in Integrative Oncology. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(21):5310.

12. ChuaEL, Mackay ,M, McGrath KC, Young L, Matthews JM Sunde JP, et al. TC-1 is a novel tumorigenic and natively disordered protein associated with thyroid

۱۳. مژگان شخص نیائی ،نرگس نیکونهاد لطف ابادی ،فاطمه حقیرالسادات ۱۴۰۱، تاثیر اسانس گیاه رزماری بر بیان ژن اپوپتوتیکBIM در رده سلولی MCF_7سرطان پستان ،مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد،شماره ۱ ، صفحات ۴۴۵۲-۶۱

۱۴. مهتاب رضایی،الهام رجب بیگی ۱۳۹۹،تاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه اسطوخودوس بر آپوپتوز سلول های سرطانی کبد(HepG2)،پژوهش های اسیب شناسی زیستی،شماره۴،صفحات۱-۷.

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

۱۵. اسماعیل پناهی کوخدان، حسین غفوری، هیبت الله صادقی، نازنین دانایی، شیروان سلامی نیا و محمود رضا آقا معالی ،۱۳۹۸، تاثیر آپوپتوتیک عصاره گیاه سنبله ای کرکدار روی سلول سرطانی کلورکتال رده(HT-29)، مجله ارمغان دانش، شماره ۱ ،دوره ۲۴ صفحات ۱-۱۳.

16. Mianabadi M, Panahi E, Sadeghi H, Jafari A. K562 cell cycle arrest In G0/G1 phase by two species of Daphne family. ISMJ 2015; 18(1): 125-34.

17. Kokhdan EP, Mianabadi M, Sadeghi H, Khalaf M. The effects of two species of daphne, betulin and betulinic acid on alkaline phosphatase activity in two human cancer cell lines, k562 and mcf-7. Armaghane Danesh Bimonthly Journal 2014;18(11): 900-9.

18. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA: a Cancer Journal for Clinicians 2011; 61(2): 69-90.

۱۹. سیده محیا مدرسی ،نرگس نیکو نهاد لطف آبادی ، فاطمه حقیرالسادات ۱۴۰۲،تاثیر عصاره آشواگاندا بر میزان بقا و بیان ژن P53 در سرطان تخمدان ،سلول و بافت ،دوره۱۴،شماره۴،صفحهات ۲۹۳تا ۳۰۸

۲۰. توسط زکیه واحد و خدیجه شاهرخ آبادی ۱۳۹۸، مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان ،تغییر بیان ژنTCI تحت ثاثیر عصاره هیدروالکلی گیاه رازیانه درسرطان تیروئید القا شده در موش سوری ،دوره ۱۸ ، صفحات ۹۳۵-۹۵۰

21. Meerloo JV, Kaspers Gertjan JL, Cloos J. Cancer Cell Culture: Methods and Protocols, 2th Edition. Springer Science 2011; Chapter 2o: 237_4۶

22. Baharara J; Nikdel N; Shahrokhabadi Kh; Amini E.The synergistic influence of Holothuria arenicola extract and imidazole carboxamide on Cellosaurus cell line B16-F10. IR J of Fis Sci 2019; 18(1): 173-87.

23. Mousaee Z, Shahrokhabadi Kh, EntezaryM. Evaluation of the effect of Fennel extract on TERT gene expression changes in mouse liver tumors induced with cancer. Feyz, J Uni of Med Sci 2018; 21(6): 543-52.

24. Hao D, Xiao Jie G, Pei Gen X. Medicinal Plants, Chemistry, Biology and Omics. 1th Ed. London; Woodhead Publishing-Elsevier; 2015.

25. Ngo SN, Williams DB, Head RJ. Rosemary and Cancer Prevention: Preclinical Perspectives. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011; 51(10): 946-54.

26. Al-otaibi,Waad.Rosemary Oil Nano-Emulsion Potentiates the Apoptotic Effect of Mitomycin C on Cancer Cells in Vitro. Pharmacia 2021; 68: 201-9.

27. Nair SG, Hettihewa M, Rupasinghe H. Apoptotic and inhibitory effects on cell proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cell by methanol leaf extract of costus speciosus. Biomed Res Int. 2014;2014:637098.

28. Cardia GF, Silva-Filho SE, Silva EL, Uchida NS, Cavalcante HA, Cassarotti LL, et al. Effect of Lavander (Lavandula angustifolia) essential oil on acute infhammatory response. Evid Based Complement Alternat Med. 2018;2018:1413940.

29. Shadkhast M, Bigham-Sadegh A, Nourani H, Eslami F. Histopathological and macroscopical evaluation of Lavandulla officinalis effects on wound healing in rabbit model. Iran J Vet Surg. 2015;8(2):91-6.

30. Chen A, Huang X, Xue Z, Cao D, Huang K, Chen J, et al. The role of p21 in apoptosis, proliferation, cell cycle arrest, and antioxidant activity in UVB-irradiated human HaCaT keratinocytes. Med Sci Monit Basic Res. 2015;21:86-95.

31. Merrill RM, Harris JD, Merrill JG. Differences in incidence rates and early detection of cancer among non-hispanic and hispanic whites in the united states. Ethnicity & Disease 2016; 23(3): 34955.

32. Lieberthal W ,Triaca V, Levine J. Mechanisms of death induced by cisplatin in proximal tubular epithelial cells: apoptosis vs. necrosis. American Journal of Physiology-Renal Physiology 1996; 270(4): F700-F8.

33. Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2003; 4(4): 281-8

34. Halder B, Singh S, Thakur SS. Withania somnifera Root Extract Has Potent Cytotoxic Effect against Human Malignant Melanoma Cells. PLoS One. 2015;10(9):e0137498

35. Sunde M, McGrath KC, Young L, Matthews JM, ChuaEL, Mackay JP, et al. TC-1 is a novel tumorigenic and natively disordered protein associated with thyroid cancer. Cancer Res 2004; 64(8): 276673.

36. Badgujar SB, Patel VV, Bandivdekar AH. Foeniculumvulgare Mill: A review of its botany, phytochemistry, pharmacology, contemporary application, and toxicology. Biomed Res Int 2014; ID 842674.

37. Al-Snafi AE. The chemical constituents and pharmacological effects of Foeniculum vulgare (A review). ISOR J Pharma 2018; 8(5): 81-96

Archive of SID.ir

Archive of SID.ir

38- Sebai H, Selmi S, Rtibi K, Souli A, Gharbi N, Sakly M. Lavender (Lavandula stoechas L.) essential oils attenuate hyperglycemia and protect against oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats. Lipids Health Dis. 2013;12(1):189

Archive of SID.ir