Archive of SID

فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال یازدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۷

بررسی اثر سیتوتوکسیسیته غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی گیاه سداب (*Ruta graveolens L.*) بر تکثیرسلول‌های سرطان دهانه رحم انسان (*HeLa*)

سید میلاد موسوی جزائری[۱]، الهه ابراهیمی[۲]، مسعود پارسانیا[۳]*

[۱] گروه میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات گیلان، ایران

[۲] گروه میکروب شناسی، دانشکده علوم و فناوریهای نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۳] گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* Email: mparsania@iautmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۸/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۶

چکیده

یکی از سرطان‌های شایع در زنان سرطان دهانه رحم است. عدم پاسخ مناسب به درمان با داروهای شیمیایی در بعضی از موارد و هم چنین عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای سنتتیک لزوم دستیابی به ترکیبات دارویی طبیعی که دارای حداقل تأثیرات جانبی داشته باشند را نشان می‌دهد. در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی سداب بر رده سلولی *HeLa* مورد بررسی قرار گرفت. رده سلولی HeLa در محیط DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو کشت داده شد. تهیه عصاره با روش ماسیراسیون انجام گرفت. در این مطالعه انجام اثر غلظت‌های مختلف (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ug/ml) از عصاره هیدروالکلی گیاه سداب بر تکثیر سلول‌های HeLa در زمان‌های ۲۴، و ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مجاورت سلول‌ها با عصاره به همراه محیط DMEM و سرم ۱٪ با استفاده از روش MTT و تریپان بلو ارزیابی شد. غلظت سیتوتوکسیک ۵۰ ٪ (CC50) عصاره بر سلول HeLa، ۱۵۰۰ µ g/ml تعیین گردید. نتایج نشان داد غلظت ۱۰۰۰ µg/ml عصاره گیاه سداب پس از ۷۲ ساعت، کاهش معنی‌داری در تکثیر سلول‌های HeLa در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره سداب بر تکثیر سلول‌هایHeLa اثر مهاری دارد.

کلیدواژه‌ها: اثر سمیت سلولی، سلول HeLa ، عصاره سداب.

مقدمه

سرطان دهانه رحم یک مشکل بزرگ بهداشت باروری در زنان کشورهای در حال توسعه است. علیرغم اینکه یک بیماری قابل پیشگیری می‌باشد، به دلیل عدم دسترسی افراد به برنامه غربالگری و واکسیناسیون موثر، اغلب در مرحله پیشرفته سرطان تشخیص داده می‌شوند. درمان این سرطان ها اغلب با استفاده از جراحی یا شیمی درمانی است که در برخی

www.SID.ir

Archive of SID

موارد روش‌های موثری نیستند و همچنین گاهی عوارض جانبی مانند عود مجدد منطقه یا متاستاز را ایجاد می‌کنند. سرطان دهانه رحم سالانه علت مرگ حدود ۲۶۰۰۰۰ از زنان مبتلا می‌باشد و تقریبا ۸۵٪ از این مرگ‌ها در کشورهای در حال توسعه رخ می‌دهد که علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در زنان است [۱۱]. تحقیقات وسیعی در بکارگیری گیاهان دارویی برای مقابله با انواع بیماری‌ها ازجمله سرطان‌ها صورت گرفته است. امروزه استفاده از گیاهان دارویی به‌علت سازگاری بهتر با شرایط فیزیولوژیک بدن و عوارض جانبی کمتر در درمان بیماری‌های مختلف رو به افزایش است، هم‌چنین بسیاری از مواد مؤثره موجود در آن‌ها به لحاظ پیچیدگی ساختار فرمول شیمیایی مربوطه، به‌طور مصنوعی قابل سنتز نمی‌باشند [۵،۲۰]. نتایج تحقیقات، نشان می‌دهد که وجود ترکیبات آنتراکینونی (Anthraquinone) و فلاوونوییدی (flavonoid) در مواد مؤثره گیاهان دارویی می‌تواند عامل خواص ضد ویروسی، ضد باکتریایی، در عصاره آنها باشد، همچنین فرآورده های طبیعی کشف شده از گیاهان دارویی، می تواند نقش مهمی در درمان سرطان داشته باشند [۷]. گیاه سداب (*Ruta graveolens L. Sp*) از خانواده *Rutaceae* می‌باشد، که از جمله قدیمی‌ترین گیاهان مورد استفاده در طب سنتی ایران و ملل دیگر بوده است. تاکنون بیش از ۸۵ ماده از قسمت‌های مختلف این گیاه با استفاده از کروماتوگرافی گازی، شناسایی شده است، این مواد شامل انواع گلیکوزید (Glycosid)، آلکالوییدهای کینولینی (Quinoline)، کومارین‌ها (Coumarin)، لیگنین‌ها (Lignin) و فلاونوئیدها می‌باشند. فعالیت‌های ضد التهابی، ضد قارچی، ضد باکتریایی گیاه سداب به‌طور علمی به اثبات رسید، هم چنین برای درمان بیماری‌های، مفصلی، اعصاب، ریوی، گوارشی، مورد استفاده قرار گرفته است [۱۷،۸،۱۳،۱۲،۶].

Rethy و همکارانش در سال۲۰۰۸ اثر سمیت ۲ ماده موثر گیاه سداب تحت عنوان آربورینین و فورانواکریدون ها بر روی سلول های سرطانی بررسی کردند، نتایج این مطالعه نشان داد غلظت ۴۰*uM* و ۴۰۰*uM* به ترتیب از آربورینین و فورانوآکرایدین خاصیت القای آپوپتوز دارند که عامل مرگ سلول ها می شود، که از این ویژگی می‌توان برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده کرد [۱۸]. روتا ۶ (Ruta6)، یک داروی هومئوپاتی است که از رقیق نمودن عصاره متانولی سداب بدست می‌آید. این دارو همراه با فسفات کلسیم قادر به مهار سلول‌های سرطانی مغز انسان بخصوص گلیوما می‌باشد و این کار را از طریق القای مسیرهای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی انجام می‌دهد [۱۴]. فورانواکریدون‌های (*Furanoacridons*) موجود در این گیاه که از دسته آلکالوییدها می‌باشند و از طریق القای آپوپتوز، رشد رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسان را در *invitro* مهار کرده و از این رو بعنوان یک داروی ضد سرطان طبیعی پیشنهاد می‌شود[۲۰]. اخیراً نیز از کومارین‌هایی نظیر آمبلیفرون که در گیاه سداب به مقدار زیادی وجود دارد، اثرات مهاری در رشد سلول‌های سرطان مثانه انسان مشاهده شده است [۲۲].

با توجه به خواص ضد سرطانی بعضی از ترکیبات موجود در گیاه سداب، در این مطالعه به جهت بررسی اثر ضد سرطانی این گیاه دارویی بر سرطان دهانه رحم انسان، اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گیاه سداب، بر سلول‌های بدست آمده از سرطان دهانه رحم انسان (رده سلولی HeLa) در شرایط Invitro مورد ارزیابی قرار گرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

کشت سلول

رده سلولی HeLa از انستیتوپاستور ایران تهیه شد. برای کشت سلول از محیط‌کشت Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM,Gibco) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاو و پنی‌سیلین ۱۰۰µg/ml، استرپتومایسین، ۱۰۰µg/ml استفاده شد. کشت سلول‌ها در حضور ۵٪ CO_2 در دمای ۳۷ °C انجام شد [۱،۲،۲۱].

عصاره‌گیری

گیاه سداب استفاده شده در این پژوهش از منطقه لاهیجان در شمال ایران در اسفند ماه سال ۱۳۹۰ توسط کارشناسان موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور جمع‌آوری و تعیین گونه گردید و سند نمونه در باغ گیاه‌شناسی ایران IBG (Iranian Botanical Garden) تحت شماره E-901209-8 ذخیره گردید. عصاره گیری به روش ماسیراسیون انجام گرفت. به این ترتیب که ابتدا برگ‌های خشک شده گیاه آسیاب گردید. پودر عصاره الک شد، سپس عصاره‌گیری به‌روش خوابانیدن و با استفاده از حلال هیدروالکلی (مخلوط ۲۰٪ آب و ۸۰٪ متانول) صورت گرفت، بدین ترتیب که به ۳۰ گرم از پودر آسیاب شده مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال هیدروالکلی اضافه شد و پس از گذشت ٤٨ ساعت توسط کاغذ صافی فیلتر شد و با همان حلال به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. مقدار۲۰ میلی‌لیتر از ترکیب فوق در حرارت ٤٠ درجه سانتی‌گراد خشک شد [١٦]. مقدار ۲۰ میلی‌گرم از پودر حاصل از تبخیر در مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محیط‌کشت DMEM حل گردید. بعد از حل شدن مواد موجود در عصاره فوق در محیط‌کشت، این محلول از فیلتر ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و بدین ترتیب غلظت ۲۰۰۰ug/ml از عصاره فوق بدست آمد و برای مراحل بعدی کار، از غلظت‌های مختلف این ترکیب استفاده شد.

بررسی میزان سمیت عصاره سداب بر روی سلول‌های Hela به روش تریپان بلو

سلول HeLa همراه محیط‌کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو در چاهک‌های میکروپلیت ٢٤ خانه‌ای کشت داده شده و در انکوباتور۳۷ درجه سانتی‌گراد همراه با CO_2 ۵٪ نگهداری شدند. مونولایر کامل سلول‌ها پس از ۷۲ ساعت در کف چاهک‌ها تشکیل شد. محیط‌کشت هر چاهک خارج شد و سلول‌های ته چاهک با PBS شستشو داده شد سپس رقت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ug/ml از عصاره گیاه سداب همراه با محیط‌کشت DMEM حاوی ۱٪ سرم جنین گاو تهیه و از هر غلظت به ٤ چاهک حاوی تک لایه سلولی از میکروپلیت ٢٤ خانه‌ای اضافه شد[۱۵].۳ چاهک به عنوان کنترل در نظر گرفته شد، و محیط‌کشت DMEM حاوی ۱٪سرم، فاقد عصاره دریافت کردند. سلول‌های مجاور شده با عصاره در زمان‌های ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفت، بدین ترتیب که محیط رویی سلول‌های هر چاهک به میکروتیوب جداگانه منتقل شد، سپس سلول‌های هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر PBS استریل شسته شد و PBS هر چاهک نیز به میکروتیوب مخصوص به خود منتقل گردید. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول تریپسین اضافه گردید و سپس به مدت ۲ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. تریپسین هر چاهک به میکروتیوب مربوطه منتقل شد و به هر چاهک ۲۰۰ میلی‌لیتر PBS اضافه

www.SID.ir

Archive of SID

گردید. سلول‌ها به طریق پیپت کردن از کف چاهک جدا شدند و سوسپانسیون سلولی نیز به میکروتیوب مخصوص به هر چاهک منتقل شد. میکروتیوب‌های فوق مدت ۵ دقیقه در g ۱۰۰ سانتریفوژ شدند تا سلول‌ها در ته میکروتیوب رسوب نمایند. محیط رویی میکروتیوب ها خارج شد و به رسوب سلولی باقی مانده ۱۰۰ میکرولیتر PBS و ۱۰۰ میکرولیتر رنگ حیاتی تریپان بلو اضافه گردید و به آرامی با سمپلر مخلوط شد تا سوسپانسیون یکنواختی بدست آید، سلول‌ها به وسیله لام نئوبار شمارش شدند [۳]. سلول‌های آبی رنگ به‌عنوان سلول‌های مرده و سلول‌های بی‌رنگ به عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته شد و درصد سلول‌های زنده با فرمول زیر بدست آمد:

درصد سلول‌های زنده = (تعداد سلول های زنده / تعداد سلول های زنده و مرده) × ۱۰۰

بررسی میزان سمیت عصاره سداب بر سلول‌های HeLa روش MTT

در روش MTT ۲۰۰۰۰ سلول در چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت داده شد. و بعد از ۲۴ ساعت رشد سلول‌های فوق، به هر ۳ چاهک حاوی سلول غلظت‌های مختلف عصاره (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ ug/ml) در محیط‌کشت حاوی ۱٪ سرم اضافه شد و از ۳ چاهک که محتوی محیط بدون عصاره و ۱٪ سرم بود، به‌عنوان کنترل استفاده شد. سلول‌های فوق به مدت ۷۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی CO_2 ۵٪ انکوبه گردیدند. پس از ۷۲ ساعت محیط رویی چاهک‌ها خارج شد، مقدار۲۰ میکرولیتر محلول MTT با غلظت ۰/۰۰۵ گرم بر میلی‌لیتر PBS و ۸۰ میکرولیتر DMEM به هر چاهک اضافه گردید و پس از ٤ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد محیط رویی چاهک‌ها خارج و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد تا کریستال‌های فورمازان تشکیل شده را حل کند و به ترکیب بنفش رنگ تبدیل نماید. جذب نوری هر چاهک در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Stat Fax3200-Microplat Reader, USA) اندازه‌گیری و ثبت شد. برای محاسبه درصد سلول‌های زنده به روش MTT از فرمول زیر استفاده شد:

$$\text{Cytotoxicity } (\%) = \frac{(a-b)}{(c-b)} \times 100$$

در فرمول فوق a میانگین OD ۵۷۰ نانومتر ۳ چاهک حاوی محیط کشت با غلظت‌های مختلف، b میانگین OD ۵۷۰ نانومتر بدست آمده از چاهک‌های بلانک (چاهک‌های فاقد سلول که فقط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به آنها وارد شده بود. c میانگین OD ۵۷۰ نانومتر حاصل از چاهک‌های کنترل می‌باشد [۱،۲۱]. درصد سلول‌های زنده برای هر غلظت از فرمول زیر تعیین گردید:

درصد سیتوتوکسیسیته − ۱۰۰ = درصد سلول‌های زنده

تحلیل آماری

غلظتی از عصاره گیاهی که منجر به زنده ماندن ۵۰ ٪ سلول‌ها شده بود به عنوان غلظت سیتوتوکسیک ۵۰ ٪ (CC50) با استفاده از منحنی پاسخ به دوز (نرم‌افزار Prism, Graph Pad) مشخص گردید. کلیه آزمایشات فوق سه با تکرار گردید و نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS مورد آنالیز آماری قرار گرفتند و سطح معنی‌دار ($P <$ ۰/۰۵) در نظر گرفته شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

میزان سیتوتوکسیسیته عصاره به روش تریپان بلو

بعد از ۷۲ ساعت انکوباسیون سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره، میزان سیتوتوکسیسیته عصاره بر سلول‌ها با روش‌های تریپان بلو و MTT مورد بررسی قرار گرفتند. مقدار CC50 عصارهµ g/ml ۱۵۰۰ بر رده سلولی HeLa با استفاده از منحنی پاسخ به دوز تعیین گردید (جدول ۱).

همانطوری که در نمودار ۱ مشخص می‌باشد غلظت‌های ug/ml ۲۵۰ ،۵۰۰، و ۷۵۰ از عصاره سداب در مقایسه با کنترل، اثر مهاری بر تکثیر سلول‌های HeLa نداشتند (P = ۰/۰۹).

غلظت‌هایug/ml ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ از عصاره سداب، اثر مهار معنی‌داری بر کاهش تکثیر سلول‌های HeLa نشان دادند (P<۰/۰۰۲).

شکل ۱ نمایی از سلول‌های HeLa بدون مجاور سازی با عصاره و نیز اثرات سیتوتوکسیک ناشی از مجاورت سلول‌ها با غلظت‌های µg/ml ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ از عصاره سداب بعد۷۲ ساعت را در مقایسه با کنترل نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص می‌باشد اثر سمیت سلولی ناشی از عصاره با افزایش مقدار غلظت عصاره در مقایسه با کنترل بیشتر شده است.

بحث

سرطان مهاجم دهانه رحم بعد از سرطان پستان شایع‌ترین سرطان زنان در اکثر مناطق دنیاست از عوامل ایجاد کننده ضایعات پیش سرطانی دهانه رحم می توان به ویروس پاپیلومای انسانی، مصرف سیگار، نژاد، وضعیت اقتصادی اجتماعی پایین، عفونت‌های مقاربتی ، و عوامل کاهنده ایمنی بدن مثل بیماری ایدز اشاره کرد [٤]. در درمان سرطان‌ها با بعضی از داروهای شیمیایی مشکلات بسیار زیادی وجود دارد، و گاهی اوقات یا به درمان قطعی منتهی نمی‌شود و یا با پیدایش مقاومت دارویی روبرو می‌شود. استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماری‌ها قرن‌ها سابقه دارد. در حال حاضر بخش عمده داروها، شیمیایی هستند ولی تقریبا ۳۰ درصد

جدول شماره ۱. : میزان سمیت عصاره سداب بر روی سلول HeLa به روش تریپان بلو و MTT

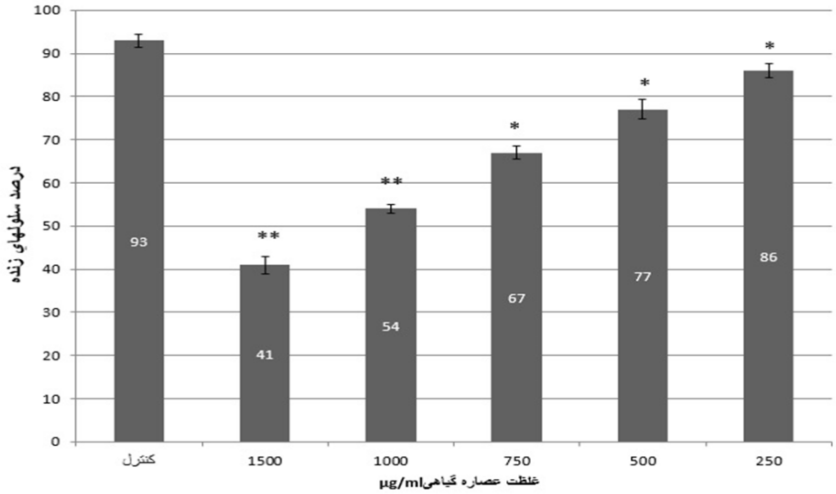
غلظت‌های عصاره سداب برحسب $\mu g/mL$	درصد سلول‌های زنده بعد از ٢٤ ساعت (به روش تریپان بلو)	درصد سلول‌های زنده بعد از ٤٨ ساعت (به روش تریپان بلو)	درصد سلول‌های زنده بعد از ۷۲ ساعت (به روش تریپان بلو)	درصد سلول های زنده بعد از ۷۲ ساعت (به روش MTT)
کنترل	۹٦±۰/۵	۹۳±۱/۵	۹۳±۳/۵	-
۱۵۰۰	۷۲±۲	٦۲±۳	٤۱±۳	٤۳±۳
۱۰۰۰	۷۹±۰/۵	۷۱±۲	٥٤±٤	٥٦±۱
۷۵۰	۸٤±۳/۵	۸۳±۲	٦۷±٥/٥	۷۱±۲
۵۰۰	۹۳±۳	۸۳±۳/۵	۷۷±۲/۵	۸۰±۳
۲۵۰	۹۵±۳	۹۳±۳	۸٦±۱/۵	۸۸±۲

غلظت‌های مختلف عصاره هیدوالکلی سداب به سلول HeLa اضافه شد و درصد سلول‌های زنده بعد از ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت به روش تریپان بلو و ۷۲ ساعت به روش MTT بررسی شد. نتایج بر اساس ۳ بار تکرار مستقل برای هر تست و به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

نمودار ۱ – اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو الکلی سداب بر سلول **HeLa**



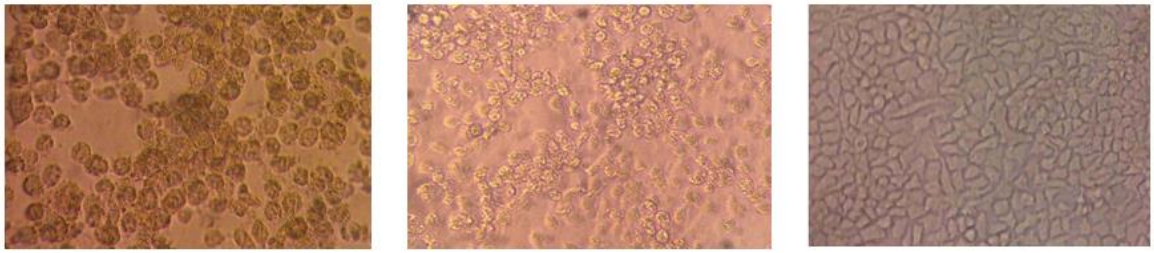
میانگین درصد سلول‌های زنده بر اساس سه بار تکرار مستقل برای هر تست نشان داده شده است. Error bars نشاندهنده انحراف معیار می‌باشد. غلظت‌های µ g/ml ۱۰۰۰ و µ g/ml ۱۵۰۰ به‌طور معنی‌دار (** P = ۰/۰۰۲) از تکثیر سلول جلوگیری بعمل آوردند، اما غلظت‌های µ g/ml ۲۵۰، µ g/ml ۵۰۰ و µ g/ml ۷۵۰ (* P = ۰/۰۹) تاثیر معنی‌داری نسبت به مهار بر تکثیر سلول نداشتند.

فرآورده‌های دارویی منشا گیاهی دارند. بر مبنای گزارش‌هایی تقریبا ۶۰٪ داروهای ضد سرطان و ضد بیماری‌های عفونی منشا طبیعی دارند [۲،۲۰]. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاهان دارویی سنتی می‌توانند به عنوان کاندید مناسب جهت کشف و تولید داروهای ضد ویروسی در آینده باشند. در سال ۲۰۱۵ اثر عصاره سداب بر رده سلول‌های سرطانی گلیوبلاستوما (U87MG, C6 and U138) توسط Gentile و همکارانش بررسی شد نتایج این مطالعه نشان داد غلظت mg/ml ۱ از عصاره سداب باعث القای آپوپتوز در این سلول‌ها می‌گردد [۷]. در این مطالعه اثر سمیت سلولی عصاره هیدرو الکلی سداب بر رده سلولی HeLa در غلظت‌های مختلف به روش تریپان بلو و MTT بررسی و نتایج بدست آمده نشان داد عصاره سداب تکثیر سلول‌های HeLa را بصورت معنی‌داری کاهش می‌دهد. ترکیبات موجود در عصاره سداب از ایجاد سرطان در کبد موش جلوگیری کرده است همچنین ترکیبات موجود در عصاره سداب اثرات سیتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی لنفوما و فیبروبلاستومای انسانی داشته و بعلاوه باعث افزایش طول عمر حیوانات مبتلا به سرطان می‌شود [۱۵]. نتایج یک مطالعه نشان داده است که فلاونوئید موجود در این گیاه از طریق القای آپوپتوز، رشد رده‌های مختلف سلول‌های سرطانی انسان را در invitro مهار کرده است [۱۷]. اثر غلظت‌های مختلف عصاره سداب بر ۳ رده سلولی Mouse fibroblast cell line (L929)، Dalton's Lymphoma Ascites (DLA) و Ehrlich Ascites Carcinoma (EAC) توسط Preethi و همکارانش بررسی شد نتایج این مطالعه نشان داد غلظت mg/ml ۱۶ از عصاره سداب باعث مهاری ۱۰۰ ٪ تکثیر سلول‌های مورد بررسی شد [۱۵]. در مطالعه ای که توسط Kushnareva و همکارانش انجام گردید، مشخص شد پروکسیتین موجود در عصاره سداب با افزایش نفوذ پذیری میتوکندری عامل القای آپوپتوز می‌گردد [۹].

سمیت سلولی عصاره برگ گیاه *Zanthoxylum rhoifolium* که از تیره سدابیان است، بر سلول‌های HeLa توسط Silva و همکارانش بررسی شد، نتایج این

www.SID.ir

Archive of SID



(ج) (ب) (الف)

شکل ۱: نمای میکروسکوپی از تاثیر سمیت سلولی ناشی از عصاره هیدروالکلی سداب بر سلول HeLa در غلظت‌های مختلف در مقایسه با کنترل

(الف): سلول‌های Hela در محیط فاقد عصاره هیدروالکلی سداب بعد از گذشت ۷۲ ساعت (کنترل)

(ب): سلول‌های HeLa تیمار شده با غلظت ۱۰۰۰ug/ml از عصاره هیدروالکلی سداب بعد از ۷۲ ساعت

(ج): سلول‌های HeLa تیمار شده با غلظت ۱۵۰۰ug/ml از عصاره هیدروالکلی سداب بعد از ۷۲ ساعت

مطالعه نشان داد غلظت ۹۰ug/ml از عصاره اثر مهاری قابل توجهی بر رشد سلول‌های HeLa دارد [۱۹]. در مطالعه ما نیز مشخص شد غلظت‌های ۱۵۰۰ug/ml و۱۰۰۰ (به ترتیب معادل ۱/۵ mg/ml و ۱) از عصاره سداب اثر مهاری معنی‌داری بر تکثیر سلول‌های Hela دارد. نتایج مطالعه دیگری که توسط singh و همکارانش انجام شد نشان داد غلظت ۱۵ug/ml از *Zanthoxylu armatum* که عضو دیگری از تیره سدابیان است بر رشد و تکثیر سلول‌های HeLa اثر مهاری بالای دارد [۲۰]. تفاوت غلظت موثر این عصاره با غلظت موثر عصاره مورد مطالعه ما را می‌توان به تفاوت ترکیبات موثر عصاره‌های گیاهی، نوع عصاره، روش عصاره‌گیری و میزان پودر حاصل از برگ خشک شده گیاه، که برای عصاره‌گیری استفاده شده، مرتبط دانست. خاصیت مهار تکثیر سلول‌های نوروبلاستوما توسط عضو دیگری از خانواده سدابیان به نام *Citrus bergamia* با غلظت ۰/۰۳ ٪ نیز توسط Navarra به اثبات رسیده است[۱۰]. نتایج مطالعات فوق تایید کننده نتایج به دست آمده در مطالعه ما می‌باشد.

با توجه نتایج مطالعه ما، موارد ذکر شده و پیشینه مصرف موفقیت آمیز عصاره سداب در مهار تکثیر سلول‌های سرطانی و هم چنین حضور ترکیبات متنوع که خواص درمانی متعدد دارند، لازم است تحقیقات بیشتری بر روی خواص ضدسرطانی این خانواده گیاهی انجام شده و با خالص‌سازی و استخراج ترکیبات تشکیل دهنده عصاره، موثرترین ترکیب گیاه، شناسایی و مکانیسم اثر آن بر مرگ سلول ها بررسی شود.

تقدیر و تشکر

مطالعه فوق با همکاری مرکز تحقیقات ژنومیک پزشکی دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی واحد تهران و موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور امکان‌پذیر شد که بدین وسیله از خدمات ارائه شده از سوی کارکنان مراکز فوق قدردانی می‌گردد.

منابع:

[۱] فروزنده، ف.، سلیمی س.، نقش، ن.، زمانی ن.، جهانی، س. ۱۳۹.بررسی اثر ضد سرطانی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسپند بر روی سلول‌های کارسینومای اپی تلیال گردن رحم انسان، مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، جلد ۱۶ ، شماره ٤، صفحات۱-۸.

[۲] منوری، ح.، نوروزبابایی، ز.، ادیبی، ل.، نوروزی م.، ضیایی، ع. ۱۳۸٦. بررسی اثرات ضد ویروسی بیست و پنج گونه از تیره‌های مختلف گیاهان دارویی ایران،

www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران، جلد ۱، شماره ۲، صفحات ٤٩-٥٩.

[۳] معتمدی فر، م.، غفاری، ن.، طالع‌زاده شیرازی، پ. ۱۳۸۹. اثر عصاره‌های زیره سبز در برابر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱ در کشت سلولی Vero. مجله علوم پزشکی ایران، جلد ۳۵، شماره ٤، صفحات ۳۰٤-۳۰۹.

[٤] جعفری، م.، حلیمی، م.، دسترنج تبریزی، ا.، شهامفر، ج. ۱۳۸٦. شیوع ضایعات پیش سرطانی و سرطان مهاجم دهانه رحم،جلد ۱۰ شماره ۲، صفحات ٦۳-۷۸.

[5] Atanasov, A., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.,Linder, T.,Wawrosch, Ch., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwaiger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppne,r H., 2015, Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol Advances, 33(8): 1582–1614.

[6] Chiu, K., Fung, A., 1997, The cardiovascular effects of green beans (*Phaseolus aureus*), common rue (*Ruta graveolens*), and kelp (*Laminaria japonica*) in rats. General Pharmacology.The Vascular System, 29(5): 859-62.

[7] Gentile, M.T., Ciniglia, C., Reccia, M.G., Volpicelli, F., Gatti, M., Thellung, S., ColucciD' Amato, L., 2015, *Ruta graveolens L* induces death of glioblastoma cells and neural progenitors, but not of neurons, via ERK 1/2 and AKT activation. *PLoS One*, 10(3): 1-17.

[8] Kamiński, M., Kartanowicz, R., Kamiński, M.M., Królicka, A., Sidwa-Gorycka, M., Łojkowska., E, Gorzeń, W., 2003, HPLC-DAD in identification and quantification of selected coumarins in crude extracts from plant cultures of *Ammi majus* and *Ruta graveolens*. Journal of separation science, 26(14): 1287-1291.

[9] Kushnareva, Y.E., Sokolove, P.M., 2000, Prooxidants open both the mitochondrial permeability transition pore and a low-conductance channel in the inner mitochondrial membrane. Archives of biochemistry and biophysics ,376(2): 377-388.

[10] Navarra, M., Mannucci, C., Delbò, M., Calapai, G., 2015, *Citrus bergamia* essential oil: from basic research to clinical application. Frontiers in pharmacology, 2(6): 36.

[11] Nour, N.M., 2009. Cervical cancer: a preventable death Reviews in Obstetrics and Gynecology, 2(4): 240-4.

[12] Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K., Vuorela, P., 2000, Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. Journal of Ethnopharmacology, 73(1-2): 299-305.

[13] Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E., Harries, D., Hale, A.L., Aliotta, G., Duke, S.O., 2003, Natural fungicides from *Ruta graveolens L*. leaves, including a new quinolone alkaloid. Journal of agricultural and food chemistry, 51(4): 890-896.

[14] Pathak, S., Multani, A.S., Banerji, P., Banerji, P., 2003, Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes: A novel treatment for human brain cancer. International journal of oncology, 23(4): 975-982.

[15] Preethi, K., Kuttan, G., Kuttan, R., 2006, Anti-tumour activity of *Ruta graveolens L* extract. Asian pacific journal of cancer prevention, 7(3): 439-443.

[16] Pushpa, H., RamyaShree, N., Shibani, P., Ramesh, D.H., 2015, Screening of Antimicrobial, Antioxidant and Anticancer Activity of *Ruta graveolens*. Advances in Biological Research, 9 (4): 257-264.

[17] Raghav, S., Gupta, B., Agrawal, C., Goswami, K., Das, H., 2006,Anti-inflammatory effect of *Ruta graveolens L*. in murine macrophage cells. Journal of Ethnopharmacology, 104(1-2): 234-239.

[18] Rethy, B., Zupkó, I., Minorics, R., Hohmann, J., Ocsovszk,i I., Falkay, G., 2007, Investigation of cytotoxic activity on human cancer cell lines of arborinine and furanoacridones isolated from *Ruta graveolens*. Planta medica, 73(01): 41-48.

[19] Silva, S.L.d., Figueiredo, P.M., Yano, T., 2007, Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. leaves. Acta Amazonica, 37(2): 281-286.

[20] Singh, T.D., Meitei, H.T., Sharma, A.L., Robinson, A., Singh, L.S., Singh, T.R., 2015, Anticancer properties and enhancement of therapeutic potential of cisplatin by leaf extract of *Zanthoxylum armatum* DC. Biological research, 48(1): 46.

[21] Thavaman, i S., Mathew, M., Dhanabal, S., 2013, In vitro cytotoxic activity of menispermaceae plants against HeLa cell line. Ancient science of life, 33(2): 81–84.

[22] Yang, X., Xu, B., Ran, F., Wang, R., Wu, J., Cui, J., 2007, Inhibitory effects of 11 coumarin compounds against growth of human bladder carcinoma cell line EJ in vitro. Zhong xi Yi jie He xue bao Journal of Chinese integrative medicine, 5(1): 56-60.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of different concentrations effects of *Ruta graveolens L.* Hydro alcoholic extract in human cervical cancer cells (HeLa)

Mousavi-Jazayeri S.M[1]., Ebrahimi E[2]., Parsania M.[3*]

[1] Department of microbiology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Gilan, Iran.
[2] Department of microbiology, Faculty of Advanced Sciences and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[*] Email: mparsania@iautmu.ac.ir

Received: 2 November 2018 Accepted: 17 March 2019

Abstract

Cervical cancer is one of the most common cancers in women. In some cases, the lack of appropriate response to treatment with chemical drugs and the side effects of using synthetic drugs show necessary to achieve a natural drug that has minimal side effects. This study was evaluated effects of Hydroalcoholic extracts *Ruta graveolens L.* against of HeLa cell. HeLa cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum. Preparation of extract were done by maceration technique. This study were assessed the effects of different concentrations (250, 500, 750, 1000 and 1500 µg/ml) of *Ruta graveolens L.* on the proliferation of HeLa cells at 24, 48 and 72 hours after treatment of cells with extract and medium containing 1% serum by Trypan blue and MTT methods.The cytotoxic concentration 50% (CC50) of the extract was determined on HeLa cell 1500 ug/ml. The results showed that concentrations of 1000 ug/ml of *Ruta graveolens L.* extract, after 72 hours showed a significant decrease in the proliferation of HeLa cells compared with control.The results of this study showed *Ruta graveolens L.* extract can inhibit the proliferation of HeLa cells.

Keywords: Cytotoxic effect, *Ruta graveolens L.* extract, HeLa cells.

www.SID.ir