Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

تاثیر عصاره گیاه *Fumaria viallantii* بر روی سلول های سرطان پستان BT-474 و MDA-MB_231

پریچهر حناچی[1*]، مرجان حسین پور[2]، زهرا بطایی[3]، روشنک زرین قلمی[2]

1- دانشیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
2- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
3- استاد گروه بیوشیمی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: 98/09/25 تاریخ پذیرش: 98/12/11)

چکیده

رادیکال های آزاد باعث بیماری های بسیاری در انسان می شوند. آنتی اکسیدان ها، خطر بیماری قلبی عروقی و سکته را با خنثی سازی رادیکال های آزاد کاهش می دهند و از سوی دیگر قابلیت جلوگیری از پیشرفت سرطان را دارند. آنتی اکسیدان طبیعی میزان آنتی اکسیدانی پلاسما را افزایش می دهند.گیاهان منبع غنی از ترکیبات ثانویه هستند که مهم ترین آنتی اکسیدان های طبیعی به شمار میروند. در این مطالعه از اندامهای هوایی گیاه شاهتره استفاده گردید و میزان خاصیت ضد سرطانی عصاره های متانولی،آبی،اتانولی آن ارزیابی شد. پس از تهیه عصاره گیاه اثر آن را بر روی رشد سلول های سرطانی پستان BT-474 و MDA-MB_231 در زمان های 24 ،48و 72 ساعت با روش فلوسایتومتری و MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) سنجیده شد. بالاترین درصد کشندگی سلولی با توجه به تکنیک MTT مربوط به عصاره آبی شاهتره بر روی سلول MDA-MB-231 بعد از 72 ساعت به مقدار2 میکروگرم/میلی لیتر گزارش شده است. نتایج این مطالعه به خوبی نشان می دهند که گیاه شاه تره تاثیر آنتی اکسیدانی و کشندگی سلول های سرطانی بسزایی دارد و پتانسیل کامل این عصاره گیاهی میتواند با مطالعات بیشتر در مورد مدل های حیوانی و آزمایش های بالیتی مشخص شود.

کلید واژگان: فعالیت ضد سرطانی، شاه تره، تست MTT، سرطان پستان، تکنیک فلوسایتومتری

*مسئول مکاتبات: p.hanachi@alzahra.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

1- مقدمه

آنتی اکسیدان ها، خطر بیماری قلبی عروقی و سکته را با خنثی سازی رادیکال های آزاد کاهش می دهند و از سوی دیگر قابلیت جلوگیری از پیشرفت سرطان را دارند. آنتی اکسیدان طبیعی میزان آنتی اکسیدانی پلاسما را افزایش می دهند تا از بیماری هایی مانند بیماری قلبی، سرطان و سکته مغزی جلوگیری کنند [1و2].

متابولیت های ثانویه مشتق شده از گیاهان دارای قدرت بالایی برای فعالیت آنتی اکسیدانی هستند. بسیاری از مطالعات نشان داده اند که گیاهان دارویی اثرات آنتی اکسیدانی و سیتوتوکسیک قابل توجهی بر روی سلول های سرطانی دارند [3].

سرطان پستان یک بیماری بسیار ناهمگن است که در اثر تاثیرات متقابل عامل های وراثتی و محیطی ایجاد می شود. عواملی همچون (سن،چاقی،مصرف الکل،برخورد استروژن در طول زندگی) از جمله عوامل اپدمیولوژیک است که در بروز سرطان دخالت دارند.،اما قوی ترین عامل ایجاد کننده سرطان وجود سابقه خانوادگی می باشد.و تقریبا حدود 20 درصد همه ی سرطان پستان را انواع خانوادگی تشکیل می دهند[4].

بسیاری از گیاهان دارویی به وسیله افزایش عملکرد و دفع مسمومیت، بدن را از ابتلا به سرطان محافظت می کنند. پاسخ های بیولوژی مشخص از گیاهان به دست آمده که از رشد سرطان بوسیله نوسان فعالیت هورمون ها و آنزیم های ویژه ای ممانعت می کنند. بسیاری از گیاهان اثرات جانبی، سمی و خطرناک ناشی از مصرف داروهای شیمیایی و پرتو درمانی را بسیار کاهش می دهند. دانشمندان در سراسر دنیا بر روی نقش داروهای گیاهی جهت افزایش ایمن بودن سلول های بدن بر علیه سرطان هم نظر هستند.[5-8]

شاه تره حاوی حدود یک درصد آلکالوئید است که بیش از 3 مورد آنها تعیین فرمول شده اند و در نتیجه مشخص شده است که اکثراً از مشتقات بنزیل ایزوکوینولین هستند. مهم ترین این آلکالوئیدها شامل فومارین (پروتوپین) فوماری لین وسیناکسین هستند. از دیگر ترکیبات مهم آن می توان فلاونوئیدها و اسیدهای گیاهی به ویژه اسید فوماریک و مویسلاژ را نام برد [9-13].

امروزه روش های متنوعی برای درمان سرطان وجود دارد ولی به دلیل اینکه در این روش های درمان از داروهایی استفاده می شود که غیر انتخابی عمل می کنند، درصد بالایی از سلول های سالم بدن به همراه سلول های سرطانی از بین می روند. بنابراین در دسترس بودن دارو ها و مواد طبیعی مؤثر در درمان با کمترین اثرات جانبی و بیشترین اثر بخشی از اهمیت فراوانی برخوردار است. ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در گیاه شاه تره دارای اثرات ضد التهابی و آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی و ضد سرطانی هستند.ترکیبات طبیعی مانند آلکالوئیدها، ترپنها، لیگنانها و فلاونوئیدها در گیاهان مختلف دارای بیشترین سمیت سلولی در طبیعت بوده اند. یکی از مکانیسمهای عملکردی داروهای ضد سرطانی القاء آپوپتوز است که موجب مرگ سلولهای سرطانی می شوند[14-16]. در تجزیه و تحلیل بذرهای گیاه انواع گونه های شاه تره، ترکیبات اسید پالمیتیک، اسید لینولئیک، اسید لیگنوسریک، اسید آراشیدیدونیک، اسید میریستیک، اسید لوریک، اسید دکانوئیک و اسید اولئیک یافت شد[17].

هدف از این پژوهش بررسی اثر سایتوتوکسیک عصارههای مختلف گیاه شاه تره بـر روی رده سلولـی سرطان سینه انسانـی BT-474 و MDA-MB-231 با استفاده از روش MTT بود. و برای بررسی آپوپتوز سلولی به منظور تعیین درصد سلول های آپوپتوز شده در یک جمعیت سلولی تیمار شده با دارو و قیاس آن با جمعیت سلولی در کنترل منفی از روش فلوسایتومتری استفاده شد.

2- مواد و روش ها

2-1- تهیه نمونه گیاهی

اندام هوایی گیاهان از باغ گیاهان دارویی خریداری شد . نمونه های مورد آزمایش ابتدا در سایه خشک و سپس توسط آسیاب خرد شدند. نمونه های مورد استفاده برای آزمایش های مرحله استخراج دارای اندازه ذرات بین صفر تا 2 نانومتر شدند. نمونه های الک شده تا زمان انجام آزمایش در یخچال با دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک و سیگما تهیه شدند.

2-2-مواد و روش ها تهیه عصاره گیاهی به روش خیساندن (Maceration)

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

مقدار 0/1 گرم از نمونه را در 10 میلی لیتر حلال آب مقطر، اتانول 80 % و متانول 80 % مخلوط شد و درون دستگاه بن ماری در دمای 70 درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت قرار گرفت پس از یک ساعت ، درون دستگاه سانتریفیوژ به مدت 15 دقیقه و در دور 2000 rpm گذاشته شد و در آخر مخلوط حاصل صاف شد[2].

2-3- کشت سلولی

رده های سلولی MDA-MB-431 و BT-474 از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. پس دفریز کردن سلول ها ، آنها درون فلاسک کشت داده شدند. زمانی که بیشتر سطح فلاسک توسط سلول پرد شد برای شمارش آنها ابتدا 1 میلی لیتر آنزیم تریپسین به فلاسک اضافه شد. سپس به مدت یک دقیقه درون انکوباتور با دمای 37 درجه قرار گرفت . بعد از یک دقیقه 2 میلی لیتر محیط کشت کامل DMEM 10 % جهت کند کردن فعالیت آنزیم تریپسین به فلاسک اضافه شد. در نهایت پس از سانتریفیوژ سلول ها از محلول رویی جهت شمارش استفاده شد . پس از شمارش سلول ها ، تعداد 20000 سلول به هر چاهک پلیت 96 خانه ای اضافه شد و به مدت 24 ساعت درون انکوباتور 37 درجه قرار گرفت [18].

2-4- تست MTT جهت ارزیابی بقاء سلولی

جهت بررسی اثر سمیت اجزاء شاهتره بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و فیبروبلاستی و تعیین IC50 این ترکیبات، از روش رنگ‌سنجی MTT استفاده شد. نمک MTT یک نمک تترازولیوم محلول در آب است و هنگامیکه این ترکیب در محیط کشت فاقد فنول‌رد یا بافر PBS حل میشود، ترکیب زرد رنگی را به ما نشان می دهد. اساس این سنجش شکستن نمک TTM توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده است. نتیجه این فعالیت ایجاد بلورهای نامحلول فورمازان ارغوانی رنگ است که توسط دی متیل سولفوکساید (DMSO) به صورت محلول در آمده است. هرچه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر خواهد بود.

جذب نوری با استفاده از دستگاه Multi-Mode Microplate Reader (Cytation™Biotek, USA) خوانده شده است. رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج 540 نانومتر با استفاده از دستگاه خواننده الیزا اندازه‌گیری می شود. در تست MTT، 200 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی با غلظت 8 × 106 cell/ml به هر چاهک از پلیت 96 خانه‌ای افزوده شد به طوری که در هر چاهک تعداد 20000 cell/ml موجود باشد. پس از گذشت 24 ساعت، غلظت‌های مختلف ترکیبات داروئی به هر چاهک افزوده و در دوره‌های زمانی متفاوت 24، 48 و 72 انکوبه شده است. سپس مقدار 20 میکرولیتر MTT آماده شده (غلظت 5 mg/ml) افزوده و به مدت 4 ساعت دیگر در انکوباتور نگه‌داری می شود (در این مدت برای جلوگیری از نور، پلیت‌ها با فویل پوشانده شد). سپس محلول روئی از هر چاهک حذف و مقدار 200 میکرولیتر DMSO به هر چاهک افزوده خواهد شد و بلورهای فورمازان توسط سوسپانسیون به طور کامل حل شده و سرانجام جذب نوری در طول موج 540 نانومتر توسط دستگاه خواننده الیزا اندازه‌گیری شد. درصد سلول‌های زنده با استفاده از کنترل از روش فرمول زیر محاسبه گردید[18].

درصد سلول‌های زنده =

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری تیمار سلولهای تزریق شده با دارو}}{\text{میانگین جذب نوری سلولهای کنترل}} \times 100$$

IC50 پس از رسم منحنی با بکارگیری غلظت های مختلف عصاره و درصد سلول های زنده محاسبه گردید.

2-5- بررسی آپوپتوز سلولی توسط تکنیک فلوسیتومتری

به منظور تعیین نوع مرگ سلولی القاء شده (آپوپتوز و نکروز) در سلول‌های آدنوکارسینومای پستان ، توسط تکنیک فلوسیتومتری از روش رنگ‌آمیزی با 20 میکرولیتر از هر دو رنگ Annexin V-FLUOS و PI طبق دستور کار کیت eBioscience استفاده شده و از دستگاه BD FACSCantoTM II flow cytometer USA استفاده شده است. در طراحی مراحل اولیه آپوپتوز، فسفولیپید فسفاتیدیل سرین غشاء پلاسمایی که از سطح

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

داخلی غشاء به سطح خارجی غشاء حرکت می‌کند با تمایل بسیار بالایی به پروتئین انکسین متصل می‌شود که با یک ترکیب فلورسنت کنژوگه شده است. PI نیز به DNA متصل می‌شود. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار دستگاه و تقسیم نقاط ثبت شده در منحنی دو بعدی به چهار ناحیه‌ی Q1 تا Q4 صورت گرفت است به نحوی که ناحیه‌ی Q1 نمایانگر سلول‌های نکروزی با ویژگی PI^+ و $Annexin\ V\text{-}Fluos^-$; ناحیه‌ی Q2 نمایانگر سلول‌های آپوپتوزی ثانویه با ویژگی PI^+ و $Annexin\ V\text{-}Fluos^+$; ناحیه Q3 نمایانگر سلوهای سالم با ویژگی PI^- و $Annexin\ V\text{-}Fluos^-$ و ناحیه Q4 نمایانگر سلول‌های آپوپتوزی اولیه با ویژگی PI^- و Annexin V $Fluos^+$ می‌باشد. به منظور تعیین اثرات ترکیبات بکار رفته در جهت آلقاء آپوپتوزیس و یا نکروزیس درصد سلول‌های مستقر در هر ناحیه توسط نرم‌افزار FlowJo محاسبه و گزارش گردید.

6-2- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی اثر متغیرهای مستقل خود ، یعنی حلال (آب، متانول و اتانول) و زمان اثر دهی عصاره ها (24 ، 48 و 72 ساعت) از آزمون مقایسه میانگین یک متغیر در چندین گروه (One – Way ANOVA) در سطح احتمال ($p < 0/05$) استفاده گردید که برای این منظور برنامه SPSS ورژن 24 مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آزمایشات انجام شده با سه بار تکرار انجام شده است.

3- نتایج

1-3 یافته ها در مورد روش MTT

استفاده از روش کشت سلولی درک بسیار عمیق تری از تاثیر داروهای مختلف بر روی سلول های سرطانی و طبیعی پدید می آورد. یکی طی این مطالعه با استفاده از میزان جذب های خوانده شده در رده های سلولی (MDA-MB-231،BT-474) میزان درصد زنده ماندن سلول ها (*%viability*) پس از مواجهه با عصاره گیاه شاهتره و انجام تست MTT محاسبه گردید.

Table 1 IC50 values of *Fumaria viallantii* on BT-474 cancer cells at different solvents and times (** P <0.05 indicates significant difference and * P> 0.05 indicates no significant difference)

Methanol IC_{50} µg/ml	Ethanol IC_{50} µg/ml	Water IC_{50} µg/ml	Time
58 ± 0/01 µg/ml p>0/05*	271 ± 0/1 µg/ml p>0/05*	27 ± 0/01 µg/ml p>0/05*	**24h**
31 ± 0/02 µg/ml p>0/05*	8/6 ± 0/05 µg/ml p>0/05*	5 ± 0/01 µg/ml p>0/05**	**48h**
16 ±0/02 µg/ml p>0/05*	11/5 ±0/02 µg/ml p>0/05*	4 ± 0/02 µg/ml p>0/05**	**72h**

نتایج (جدول1) نشان داده است که عصاره آبی گیاه شاهتره با غلظت 0/12 میکروگرم/ میلی لیتردر مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش معنا داری در میزان درصد زنده ماندن و IC50 سلول های سرطانیBT-474 در بازه زمانی 48 تا 72 ساعت از خود نشان داده است. در بازده زمانی 24 ساعت تفاوت معنا داری برای کاهش درصد زنده ماندن سلول های سرطانی در حلال آبی در مقایسه با گروه شاهد مشاهده نشده است($p < 0/05$). غلظت های0/12 میکرو گرم / میلی لیتر و 0/24 میکروگرم / میلی لیتر در بازه زمانی 72 ساعت موجب کاهش معنا داری در درصد زنده ماندن سلول های سرطانی شده اند($p < 0/05$). همچنین کمترین میزان IC50 مربوط به عصاره آبی گیاه شاهتره در زمان 72 ساعت بوده است که برابر با 0/02±4 میکرو گرم / میلی لیتر بوده است.و نتیجه ای که مشاهده میشود و احتیاج به بررسی و تحقیق بیشتر دارد این است که غلظت های بالاتر تاثیر بر کشندگی سلول های سرطانی نداشته اند و تنها فاکتور زمان و حلال مورد استفاده هست که باعث میزان کشندگی سلول های سرطانی شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

Table 2 IC50 values of *Fumaria viallantii* on MDA-MB-231 cancer cells at different solvents and times (** P <0.05 indicates significant difference and * P> 0.05 indicates no significant difference)

Methanol IC_{50} µg/ml	Ethanol IC_{50} µg/ml	Water IC_{50} µg/ml	Time
6 ± 0/01 µg/ml p>0/05*	19 ± 0/01 µg/ml p>0/05**	41 ± 0/05 µg/ml p>0/05**	**24h**
13 ± 0/021 µg/ml p>0/05*	4 ± 0/02 µg/ml p>0/05**	2 ± 0/001 µg/ml p>0/05**	**48h**
86 ±0/01 µg/ml p>0/05*	17 ±0/05 µg/ml p>0/05**	4 ± 0/001 µg/ml p>0/05**	**72h**

نتایج (جدول 2) نشان می دهد که عصاره آبی گیاه شاهتره با غلظت 0/12 میکروگرم/ میلی لیتر در مقایسه با گروه شاهد موجب کاهش معنا داری ($p < 0/05$) در میزان درصد زنده ماندن و IC_{50} سلول های سرطانی MDA-MB-231 در بازه زمانی 48 تا 72 ساعت از خود نشان داده است.در بازه ی زمانی 24 ساعت تفاوت معنا داری برای کاهش درصد زنده ماندن سلول های سرطانی در حلال آبی در مقایسه با گروه شاهد که همان سلول سرطانی بدون حضور عصاره بوده است مشاهده نشده است ($p < 0/05$) . غلظت 0/12 میکروگرم/میلی لیتر در بازه زمانی 72 ساعت موجب کاهش معنا داری در درصد زنده ماندن سلول های سرطانی شده اند($p < 0/05$)، همچنین کمترین میزان IC_{50} مربوط به عصاره آبی گیاه شاهتره در زمان 72 ساعت بوده است که برابر 2 µg/ml بوده است.و نکته مورد توجه این است که هرچه غلظت بیشتر بشود تاثیری بر روی کشندگی سلول های سرطانی نداشته است و تنها با افزایش زمان میزان کشندگی سلول های سرطانی نیز افزایش یافت.که این موضوع خود احتیاج به تحقیق و بررسی بیشتر دارد. و نکته ی دیگیری که از این پژوهش به دست آمده است این است که عصاره آبی گیاه شاه تره بر روی سلول های سرطان سینه رده MDA-MB-231 تاثیر بهتری داشته است.

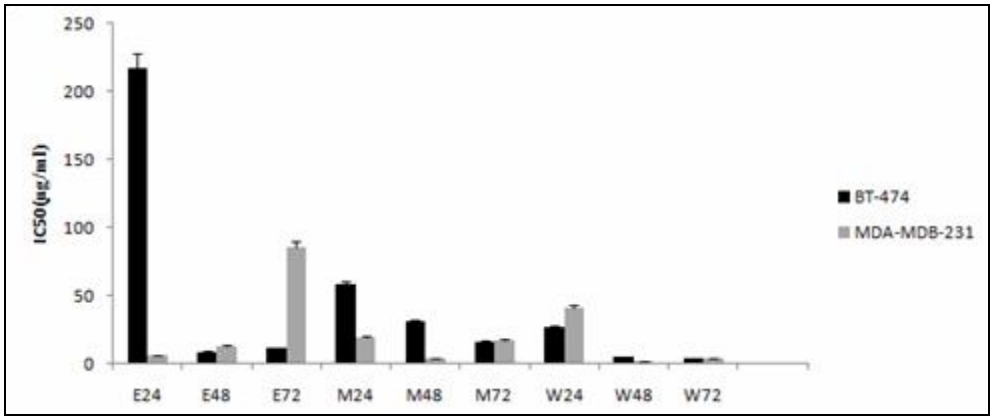

Fig1 Comparison of IC50 for two cancer cell lines BT-474, MDA-MB-231 (E24: Ethanol extracts at 24 h, E48: Ethanol extracts at 48 h, E72: Methanol extracts at 72 h M24: Extract Methanol extracts at 24 hours, M48: methanol extracts at 48 hours, M72: methanol extracts at 72 hours, W24: aqueous extracts at 24 hours, W48: aqueous extracts at 48 hours, W72: extracts Water within 72h)

2-3-نتایج مربوط به تکنیک فلوسایتومتری

جهت مشخص کردن تاثیر آپاپتوزی و یا نکروزی عصاره آبی گیاه شاهتره بر ررری سلول های سرطان سینه رده BT-474 و MDA-MB-231 از تکنیک فلوسایتومتری استفاده شد و نتایج با کنترل مقایسه گردید و در جدول 3 آورده شده است:

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

Table 3 Effect of apoptosis or necrosis of aqueous extract of *Fumaria vaillanti* on BT-474, MDA-MB-231 breast cancer cells by flow cytometry

Compounds	Vital cell An-/PI-(%)	Early apoptosis (%) An-/PI+	Late apoptosis (%) An+/PI+	Necrosis cell (%) An-/PI+
Control BT-474	94/9±/02	3/55±0/02	0/47±0/01	1/10±0/02
BT-474	60±0/03	30/9±0/02	8.26±0/02	0/25±0/02
Control. MDA-MB-231	91/1±0/02	3/46±0/03	1/70±0/02	3/70±0/02
MDA-MB-231	37/5±0/02	12/9±0/02	42/6±0/02	6/95±0/03

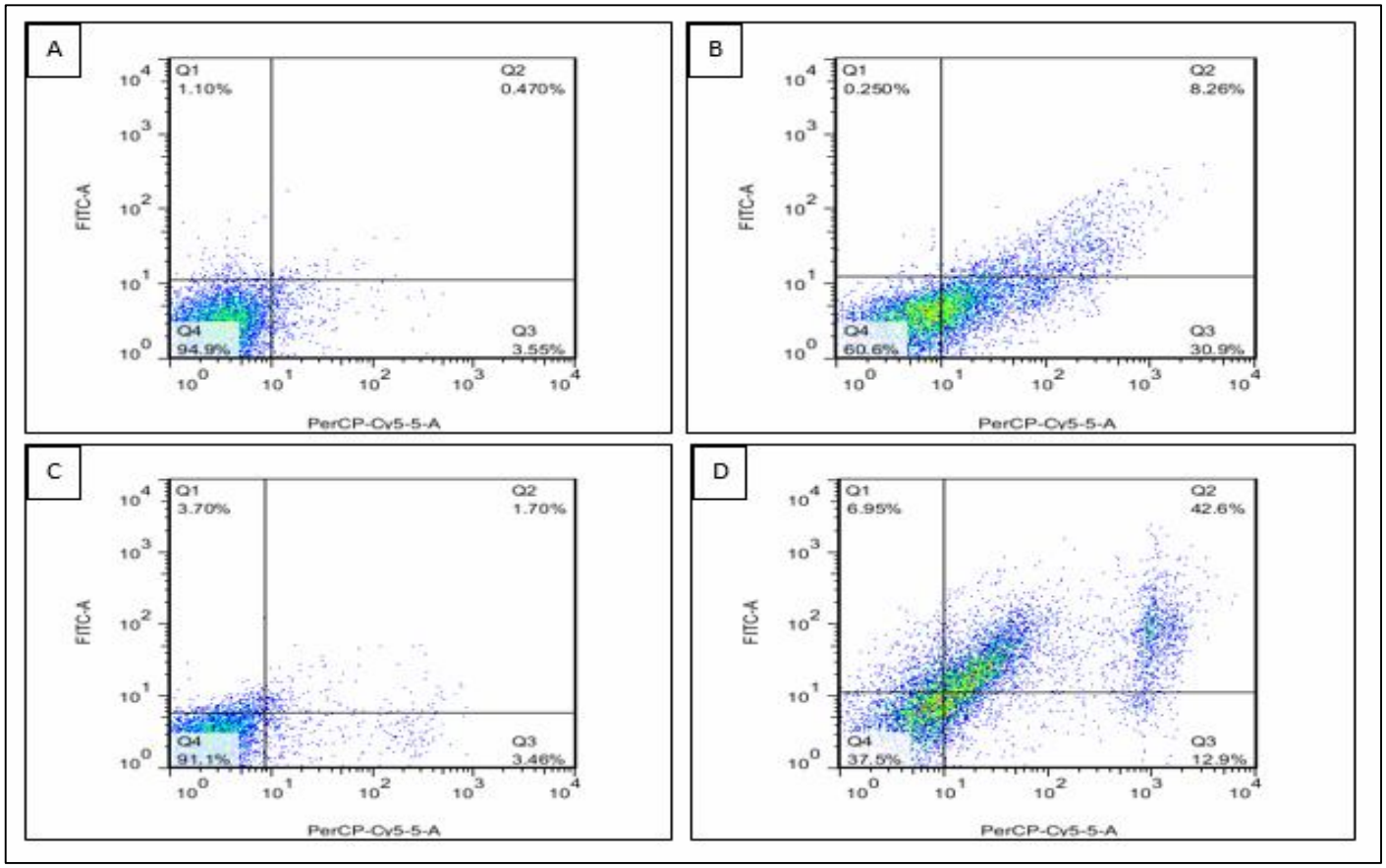

Fig 2 A: Flow cytometry result of BT-474 cancer cell as control without presence of plant extract. B: Flow cytometric results of the effect of aqueous extract of *Fumaria vaillanti* on BT-474 at a concentration of 0.12 µg / ml after 72 h. C: Flow cytometry result of MDA-MB-231 cancer cell as control without the presence of a plant extract. D: **:** Flow cytometric results of aqueous extract of *Fumaria vaillanti* on MDA-MB-231 breast cancer cell at a concentration of 0.12 µg / ml after 72 h.

در مطالعه انجام شده حاضر نشان داده شد که خاصیت سمیت سلولی گیاه شاهتره بر روی دو رده سلول سرطان پستان BT-474، MDA-MB-231 دارای اثرات موفقیت آمیزی بوده است.و در این پژوهش عصاره حاصل از سه حلال مختلف از جمله اتانول و متانول و آب بر روی سلول های سرطانی تاثیر داده شد و از تکنیک MTT جهت بررسی تاثیر کشندگی این عصاره ها استفاده شد و در این پژوهش از زمان ۲٤،٤٨،۷۲ ساعت برای بررسی تاثیر این گیاه استفاده شد و تفاوت معنا داری

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

($p < 0/05$) میان زمان های استفاده شده و نوع حلال های استفاده شده دیده شده است.در این مطالعه تاثیر عصاره آبی از تمام عصاره ها بهتر بوده است و همچنین تاثیر عصاره آبی این گیاه بر وری سلول سرطانی MDA-MB-231 در مقایسه با سلول دیگر بهتر بوده است و طی زمان 72 ساعت کشندگی بهتری داشته است. ولی در رابطه با این مطالعه افزایش غلظت تاثیر معنا داری را بر روی افزایش خاصیت کشندگی سلول نداشته است.

نتیجه ی کلی که می توان گرفت این است که عصاره آبی گیاه شاهتره میتواند سلول های سرطانی BT-474،را بیش تر از طریق آپوپتوز اولیه و MDA-MB-231 را بیشتر از طریق آپوپتوز ثانویه از بین ببرد .

4- بحث

برای قرن ها، گیاهان منبع اصلی کشف داروهای مختلف بوده اند. اولین داروی سرطان گیاهی، آلکالوئیدهای ضدلوسمی وین کریستین و وین بلاستین از گیاه پروانش میباشند. از اوایل دهه ی 1950 تا کنون شناسایی ترکیبات جدید رهبر برای شیمی درمانی سرطان و مشتق های آن ها از برنامه های غربالگری وسیع گیاهان شده است.تحقیقات بسیاری در سراسر دنیا در جهت کشف ترکیبات طبیعی که می توانند باعث مهار پیشگیری روند سرطان گردد در حال انجام می باشد.[19].

Fatemeh Haji Abbas Tabrizi و همکارانش (2016) توانستند مطالعه ای بر روی گیاه شاهتره داشته باشند تا تاثیر این گیاه را بر روی سرطان های سینه و کبد بررسی کنند طی تحقیقات انجام شده عصاره متانولی حاصل از گیاه شاهتره از لحاظ ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی غنی تر بوده است و این در مقایسه با حلال هگزانی استفاده شده در این پژوهش نشان می دهد که حلال ها با قطبیت بالا توانایی بهتری را در استخراج ترکیبات فنولی از خود نشان میدهند در این مرحله از نتایج این محققان شباهت به نتیجه به دست آمده با روش ما داشت زیرا در رابطه با مطالعه ما هم عصاره متانولی به دست آمده از گیاها شاهتره نسبت به عصاره اتانولی و آبی خاصیت بهتری را از نظر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و ظرفیت آنتی اکسیدانی از خود نشان داده است[20].

اکثر روش های درمانی که امروزه استفاده دارای اثرات جانبی بسیاری هم بر روی سلول های سالم و هم سرطانی هستند از آنجا بهترین گزینه برای درمان روشی است که فقط سلول سرطانی را از بین ببرد و به سلول های سالم آسیبی نرساند طی مطالعاتی که انجام شده است به این نتیجه رسیده اند که داروهای گیاهی از این جهت درمان مناسب تری برای سلول های سرطانی هستند[21-23].

طی تحقیقی که Ivanov IG و همکارانش (2014) انجام دادند متوجه شدند که گیاه شاه تره دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدالتهابی و دارای خاصیت سمیت سلولی است.و مشخص گردید داشتن این خواص در گیاه شاه تره بعلت حضور ترکیبات فنولیک در این گیاه است[9].

در مطالعه انجام شده حاضر نشان داده شد که خاصیت سمیت سلولی گیاه شاهتره بر روی دو رده سلول سرطان پستان BT-474، MDA-MB-231 دارای اثرات موفقیت آمیزی بوده است.و در این پژوهش عصاره حاصل از سه حلال مختلف از جمله اتانول و متنول و آب بر روی سلول های سرطانی تاثیر داده شد و از تکنیک MTT جهت بررسی تاثیر کشندگی این عصاره ها استفاده شد و در این پژوهش از زمان ۲٤،٤٨،۷۲ ساعت برای بررسی تاثیر این گیاه استفاده شده است.و تفاوت معنا داری میان زمان های استفاده شده و نوع حلال های استفاده شده دیده شده است. در این مطالعه تاثیر عصاره آبی از تمام عصاره ها بهتر بوده است و همچنین تاثیر عصاره آبی این گیاه بر وری سلول سرطانی MDA-MB-231 در مقایسه با سلول دیگر بهتر بوده است و طی زمان 72 ساعت کشندگی بهتری داشته است. ولی در رابطه با این مطالعه افزایش غلظت تاثیر معنا داری را بر روی افزایش خاصیت کشندگی سلول نداشته است که این مورد احتیاج به تحقیق و بررسی بیشتر داردکه این نتایج مشابه نتیجه به دست آمده از Fatemeh Haji Abbas Tabrizi و همکارانش (2016) بوده است زیرا در رابطه با مطالعه انجام شده توسط آنها هم زمان های متفاوت و حلال های به کار برده شده داری تفاوت های معنا دار میباشند و عصاره کلروفرمی استفاده شده دارای خاصیت کشندگی بهتری بعد از 72 ساعت بوده است[20].

در یک مطالعه، فعالیت کشندگی عصاره های *F. viallantii* بر

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

روی سلول های MCF7، SKMEL3- و K 562 مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این کار، تاثیر کل عصاره ها در سه سلول با استفاده از آزمون MTT در 24، 48 و 72 ساعت آزمایش شدند.MCF7 نسبت به بقیه سلول ها بهتر جواب داده است در مقابل عصاره های استفاده شده و تاثیر عصاره کلروفرم بعد از 72 ساعت نسبت به بقیه عصاره ها خاصیت کشندگی بهتری داشته است [20].

برای ارزیابی فلوسایتومتری فراکسیون هایی که در تست MTT بیشترین اثر سمیت سلولی را در رده های ختلف سرطانی داشتند از دو معرف Annexin V که نشان دهنده آپوپتوز بوده و پروپیدیوم یدید (PI) که نمایانگر نکروز بوده است استفاده شد. و نتایج به دست آمده نشان داده است که در رابطه با هر دو رده ی سلولی عاملی که باعث مرگ سلول ها شده است آپوپتوز بوده است. آپوپتوز یکی از شکل‌های مرگ سلول می‌باشد که از نظر بیولوژی اهمیت زیادی دارد و به همین دلیل ردیابی و اندازه‌گیری آپوپتوز در تحقیقات و موارد بالینی اهمیت پیدا می‌کند. سلول‌های در حال آپوپتوز نشانه‌های زیادی دارند که قابل اندازه‌گیری با فلوسایتومتری می‌باشند این نشانه‌ها عبارتند از تغییرات در غشاء پلاسمائی سلول، تغییرات در نفوذپذیری غشاء پلاسمائی، تغییرات در نفوذپذیری غشاء میتوکندری، فعال‌سازی کاسپازها و شکستگی‌های DNA سلولی. شناسایی هر یک از این تغییرات به تنهایی یا ترکیبی از آنها به وسیلهٔ فلوسایتومتری، امکان شناسایی و اندازه‌گیری سلول‌های آپوپتوتیک را از میان مخلوطی از سلول‌های دیگر فراهم می‌کند همچنین اطلاعات با ارزشی در بارهٔ مسیر مولکولی مرگ سلول‌ها به دست می‌آید. که در این رابطه عصاره آبی از همه بهتر توانسته سلول های سرطانی را بکشد و نتایج MTT مربوط به عصاره آبی مورد ارزیابی جهت تکنیک فلوسایتومتری قرار گرفته است.

5- نتیجه گیری

نتیجه کلی که میتوان گرفت این است که این گیاه شاهتره در غلظت های پایین تر دارای خاصیت سمی بیشتری بوده است که این خود از لحاظ اقتصادی مقرون به صرفه تر است و همچنین عصاره آبی این بهتر از بقیه فراکسیون ها تاثیر گذار بوده است که مزیت آن میتواند این باشد که بهتر میتوان تشخیص داد که کشندگی بیشتر مربوط به خود عصاره بوده است نه حلال مورد آزمایش زیرا مشاهده شده است که در مواردی ممکن است که عصاره متانولی استفاده شده درصدی از کشندگی ان مربوط به خود متانول بوده است زیرا متانول در غلظت های بالا ممکن است که حتی سلول های سالم را هم از بین ببرد.

6- منابع

[1] Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, Bausi L, Mini E, Capaccioli S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. Pharmacological research. 2009 Jun 1;59[6]:365-78.

[2] Hanachi P, Zarringhalami R, Tamijani RR. Investigation of Antioxidant Properties of Polygonatum orientale Desf and Tilia dasystyla Extracts by Different Methods and Solvents. Hormozgan Medical Journal. 2018 Dec 31;22(4).

[3] Kooti W, Servatyari K, Behzadifar M, Asadi-Samani M, Sadeghi F, Nouri B, Zare Marzouni H. Effective medicinal plant in cancer treatment, part 2: review study. Journal of evidence-based complementary & alternative medicine. 2017 Oct;22[4]:982-95.

[4] Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. Cell biochemistry and biophysics. 2015 Jun 1;72[2]:333-8.

[5] Motavalizadeh Ardakani A. Hashemi M. Safakish M, Alem-Bagheri A, Baradaran Shokoohi SH, Mosaddegh M. Medical treatment of cancer in traditional Iranian medicine. J Islamic Iran Traditional Med. 2012;1:3-18.

[6] Zargari A. Treatment with plants, Pharmacogenosis. Tehran University Publications, Tehran. 1990;2:7-67.

[7] Cragg GM, Kingston DG, Newman DJ. Anticancer agents from natural products. CRC press; 2011 Oct 10.

[8] Chirag PJ, Tyagi S, Halligudi N, Yadav J, Pathak S, Singh SP, Pandey A, Kamboj DS, Shankar P. Antioxidant activity of herbal plants: A recent review. J Drug Deliv Ther. 2013;1:1-8.

www.SID.ir

Archive of SID

(Papaveraceae). World Acad Sci Eng Technol. 2011 Jan;50:233-6.

[18] Hanachi P, Kua SH, Asmah R, Motalleb G, Fauziah O. Cytotoxic effect of Berberis vulgaris fruit extract on the proliferation of human liver cancer cell line [HepG2] and its antioxidant properties. Int J cancer res. 2006 Jan 1;2[1]:1-9.

[19] Fearon KC, Voss AC, Hustead DS. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. The American journal of clinical nutrition. 2006 Jun 1;83[6]:1345-50.

[20] Tabrizi FH, Irian S, Amanzadeh A, Heidarnejad F, Gudarzi H, Salimi M. Anti-proliferative activity of Fumaria viallantiiii extracts on different cancer cell lines. Research in pharmaceutical sciences. 2016 Mar;11[2]:152.

[21] Dai J, Mumper RJ. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. Molecules. 2010 Oct;15[10]:7313-52.

[22] Tavakoli, Javad, et al. "Evaluation of effectiveness of herbal medication in cancer care: a review study." Iranian journal of cancer prevention 5.3 [2012]: 144.

[23] Plackal Adimuriyil George B, Abrahamse H. A review on novel breast cancer therapies: Photodynamic therapy and plant derived agent induced cell death mechanisms. Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry [Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents]. 2016 Jul 1;16[7]:793-801.

[9] Ivanov I, Vrancheva R, Marchev A, Petkova N, Aneva I, Denev P, Georgiev VG, Pavlov A. Antioxidant activities and phenolic compounds in Bulgarian Fumaria species. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 2014 Feb;3[2]:296-306.

[10] Humayun S, Ibrar M, Barkatullah AI. Comparison of three extracts of Fumeria indica for the evaluation of cytotoxic and phytotoxic activities. Int. J. Biosci. 2012;2[12]:112-9.

[11] Şener B, Gözler B, Minard RD, Shamma M. Alkaloids of Fumaria vaillantii. Phytochemistry. 1983 Jan 1;22[9]:2073-5.

[12] Cragg GM, Katz F, Newman DJ, Rosenthal J. The impact of the United Nations Convention on Biological Diversity on natural products research. Natural product reports. 2012;29[12]:1407-23.

[13] Rao SR, Ravishankar GA. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnology advances. 2002 May 1;20[2]:101-53.

[14] Sakarkar DM, Deshmukh VN. Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity. Int J Pharm Tech Res. 2011 Jan;3[1]:298-308.

[15] Wang CZ, Calway T, Yuan CS. Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. The American journal of Chinese medicine. 2012;40[04]:657-69.

[16] Wang S, Wu X, Tan M, Gong J, Tan W, Bian B, Chen M, Wang Y. Fighting fire with fire: poisonous Chinese herbal medicine for cancer therapy. Journal of ethnopharmacology. 2012 Mar 6;140[1]:33-45.

[17] Tirtash FH, Keshavarzi M, Fazeli F. Antioxidant components of Fumaria species

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

www.SID.ir

Archive of SID

Anticancer Effect of *Fumaria vaillanti* extracts on BT-474 and MDA-MB_123 breast cancer cells

Hanachi, P. [1*], Hosseinpour, M. [2], Batayi, Z. [3], Zarringhalami, R. [2]

1. Associate Professor, Biotechnology Dep, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran Iran
2. MSc, Biotechnology Dep, Faculty of Biological Science, Alzahra University, Tehran Iran
3. Professor Biochemistry Department, Modares University Tehran, Iran

(Received: 2019/12/16 Accepted:2020/03/01)

Free radicals cause many diseases in human. Antioxidants reduce the risk of cardiovascular disease and stroke by neutralizing free radicals and on the other hand, prevent progression of cancer. The natural antioxidant enhances antioxidant properties of plasma to prevent diseases such as heart disease, cancer, and stroke. Plants are a rich source of secondary compounds, which are the most important natural antioxidants.

In this study, *Fumaria vaillanti* aqueous, methanol and ethanol extracts were used to determine the anticancer effect of extracts on Breast Cancer Cells Lines BT-474, MDA-MB_231 after 24, 48 and 72h.

The highest percentage of cell death, according to the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) technique, has been reported in the aqueous extract on MDA-MB-231 cells after 72 hours at with IC_{50} of 2 µg / ml.

The results of this study indicate that *Fumaria vaillanti* shows a significant antioxidant and cell toxicity effect and full potential of extracts can be realized by further studies on animal models and subsequent trials.

Key words: Anticancer activities, *Fumaria vaillanti*, MTT Test, Breast Cancer, Flow Cytometry Technique

[*] Corresponding Author E-Mail Address: p.hanachi@alzahra.ac.ir

Downloaded from fsct.modares.ac.ir at 14:46 IRDT on Tuesday June 23rd 2020

www.SID.ir