

Investigation of Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Effects of the Hydroalcoholic Extract of Seeds of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. on the Cell Line of Anaplastic Thyroid Cancer

Shahab Ojani¹, Naser Montazeri^{1*}, Masoud Mohammadi Zeydi¹, Masoud Ghane²

1. Department of Chemistry and Medicinal Chemistry, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
2. Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

Abstract

Aim and Background: Anaplastic thyroid cancer is one of the most malignant and lethal tumors known among humans. The purpose of this project was to investigate the antioxidant, antibacterial, and cytotoxic effect of the hydroalcoholic extract of seeds of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. on the cancer cell line of anaplastic thyroid cancer.

Material and methods: To this end, the seeds of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. Were collected from the heights of Javaherdeh, Ramsar and extracted using a microwave-assisted extraction (MAE). Then phytochemical tests (identification of secondary metabolites, for example, terpenoids, coumarins, tannins, saponins etc., measurement of the total amount of phenolic and flavonoid compounds (TPC & TFC), respectively, by Folin-Ciocalteu reagent (FCR) and aluminum chloride colorimetry methods, also determination of antibacterial activity by disk diffusion method (DDM), and finally, evaluation of the effect cytotoxicity was investigated on 8305C cancer cell line using MTT assay.

Results: Phytochemical screening of hydroalcoholic extract of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. seeds confirmed the presence of flavonoids, terpenoids, coumarins, cardiac glycosides, tannins, phenols, quinones, and saponins. The total amount of phenolic compounds and flavonoid compounds were, respectively, 12.93 ± 2 and 7.58 ± 7 mg/mL. The percentage of free radical inhibition was 57.70 ± 0.5 and the IC_{50} value was $0.66 \mu\text{g/mL}$. The diameter of zone of inhibition (ZOI) in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* was observed as 25, 10, and 10 mm, respectively. Moreover, cytotoxicity was observed at a concentration of $30 \mu\text{g/mL}$ in 24 hours, and its IC_{50} value was equal to $50.12 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$.

Conclusion: Considering the secondary metabolites such as phenolic compounds and flavonoids present in the hydroalcoholic extract of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. seeds and its significant biological properties, it can be concluded that this plant has the potential to be used as a suitable drug candidate against cancer in the future.

Keywords: Cytotoxicity, 8305C Cell Line, Anaplastic thyroid cancer (ATC), Antioxidant activity, Antibacterial activity, *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss., Secondary metabolites.

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی دانه گیاه

گاوزیره بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک

شهاب اوجانی^۱، ناصر منتظری^{۱*}، مسعود محمدی زیدی^۱، مسعود قانع^۲

۱. گروه شیمی و شیمی دارویی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

چکیده

سابقه و هدف: سرطان تیروئید آناپلاستیک یکی از بدخیم‌ترین و کشنده‌ترین تومورهای شناخته‌شده در انسان است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی و سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بدین منظور، دانه‌های گیاه گاوزیره *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. از ارتفاعات جواهرده رامسر جمع‌آوری و با استفاده از دستگاه مایکروویو عصاره‌گیری انجام شد. سپس با استفاده از آزمون‌های فیتوشیمیایی، غربالگری متابولیت‌های ثانویه مانند ترپنوئیدها، کومارین‌ها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و غیره، سنجش مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب به روش فولین - سیوکالتیو و رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید، همچنین تعیین فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار دیسک و در نهایت، ارزیابی اثر سمیت سلولی بر روی رده سلولی 8305C با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره حضور فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کومارین‌ها، کاردیاک گلیکوزیدها، تانن‌ها، فنول‌ها، کینون‌ها و ساپونین‌ها را تأیید کرد. مقدار کل ترکیبات فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب $12/93 \pm 2$ ، $7/7 \pm 58$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. درصد مهار رادیکال آزاد $57/70 \pm 0/5$ و مقدار IC_{50} ، $0/66$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. قطر هاله عدم‌رشد، در باکتری /شیریشیاکلی و باکتری‌های /استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس به ترتیب ۲۵، ۱۰ و ۱۰ میلی‌متر مشاهده گردید. همچنین سمیت سلولی، در غلظت ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت مشاهده شد که میزان IC_{50} آن برابر با $50/12 \pm 0/02$ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره نظیر ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی و خواص بیولوژیک قابل توجه آن می‌توان نتیجه گرفت که این گیاه می‌تواند در آینده به‌عنوان یک کاندید دارویی مناسب برای درمان سرطان مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، رده سلولی 8305C، سرطان تیروئید آناپلاستیک، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدباکتریایی، گیاه گاوزیره، متابولیت‌های ثانویه.

مقدمه

دغدغه‌های مهم جوامع دارویی جهان و حوزه درمان است. در این زمینه، استفاده از گیاهان دارویی می‌تواند یکی از پایه‌های اصلی کنترل، پیشگیری و درمان سرطان باشد. به نظر می‌رسد معرفی داروهای مورد استفاده در طب سنتی به‌ویژه گیاهان دارویی بومی، می‌تواند نقطه شروع قابل توجهی برای توسعه طرح‌های تحقیقاتی و دستیابی به داروهای جدید باشد (۱).
 ۲. سرطان تیروئید آناپلاستیک یکی از بدخیم‌ترین و کشنده‌ترین تومورهای شناخته‌شده در انسان است که حدود ۱ تا ۲ درصد از سرطان تیروئید را تشکیل می‌دهد و متوسط زنده ماندنی و بقای بیمار حدود ۱ ماه پس از تشخیص می‌باشد. تومورهای آناپلاستیک رشد سریعی دارند و به سرعت بافت

دومین عامل مرگ‌ومیر در سراسر جهان سرطان است. از این رو، دسترسی به دارویی، ارزان، با سمیت کم و اثربخشی بالا که به‌طور خاص سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد، یکی از

نویسنده مسئول:

گروه شیمی و شیمی دارویی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

پست الکترونیکی: montazer1350@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۸

دانه‌های گیاه گاوزیره از ارتفاعات منطقه جواهرده یکی از روستاهای توابع شهرستان رامسر واقع در شمال غرب مازندران با مشخصات جغرافیایی (۵۰ درجه و ۲۸ دقیقه طول شرقی، ۳۶ درجه و ۵۲ دقیقه عرض شمالی) جمع‌آوری شدند و پس از شناسایی توسط مسئول هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی تنکابن (سرکار خانم دکتر فریبا سرپوشان) با کد ۷۵۴ ثبت گردید.

ب: تهیه ماده خام گیاهی

پس از شناسایی و تعیین نام علمی گیاه، نسبت به جدا کردن دانه‌های آن اقدام و خشک کردن دانه‌ها در شرایط سایه و دمای محیط به انجام رسید. سپس دانه‌های خشک‌شده به وسیله آسیاب برقی (شرکت سازنده: MOULINEX، مدل دستگاه: AR1066Q) پودر شد تا سطح تماس بیشتری با حلال مربوطه داشته باشد.

پ: تهیه عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره با استفاده از دستگاه مایکروویو

مقدار ۳۰ گرم از پودر آسیاب شده دانه گیاه گاوزیره به همراه ۳۰۰ میلی لیتر حلال (اتانول - آب مقطر) داخل ایرلن اضافه و سپس دهانه آن پوشانده شد. بدین منظور، ظرف حاوی پودر گیاه و حلال، به مدت ۱۰ دقیقه و به فاصله ۳ دقیقه یکبار، در درون دستگاه مایکروویو (شرکت سازنده: Samsung، مدل دستگاه: GE280S) با توان ۱۰۰ قرار گرفت و این مرحله سه بار تکرار شد. پس از صاف کردن عصاره به دست آمده به کمک کاغذ واتمن شماره یک، با استفاده از دستگاه روتاری (شرکت سازنده: Efficient، مدل دستگاه: LABOROTA - 4001) تغلیظ گردید و در نهایت عصاره خشک توزین و تا زمان انجام آزمایش‌ها در دمای ۴+ درجه سلسیوس در یخچال (شرکت سازنده: Samsung، مدل دستگاه: RT790) نگهداری شد. (BAEW)

ت: غربالگری فیتوشیمیایی مقدماتی (روش کیفی)

به منظور شناسایی متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره بر اساس فارماکوپه از روش‌های موجود نظیر Trease and Evans با کمی تغییر استفاده شد (۱۲). در این راستا، هریک از متابولیت‌های ثانویه طبق دستورالعمل ارائه شده، شناسایی شدند.

اطراف گلو را درگیر کرده و پاسخ ضعیفی به درمان دارند. با این حال، عود بیماری و تهاجم گسترده به بافت‌های اطراف، شایع‌ترین مشکلات سرطان تیروئید آناپلاستیک است. در واقع، این نوع از سرطان خیلی سریع در بدن پیشرفت می‌کند و درمان آن باید در سریع‌ترین حالت ممکن آغاز گردد (۳، ۴). شایان ذکر است که سرطان تیروئید زودرس منجر به بروز علائم نمی‌شود، اما همچنان که سرطان رشد می‌کند علائمی مانند مشکل قابل توجه در بلعیدن، تغییر صدا و درد گردن مشاهده می‌شود. پیش‌آگهی در این نوع از سرطان ۴ تا ۱۲ ماه از زمان تشخیص است. درمان این نوع سرطان عموماً به صورت موقتی، به ندرت قابل درمان و کم‌وبیش همیشه کشنده است. یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ در سرطان اشاره شده، انسداد راه هوایی فوقانی است (۵). لازم به ذکر است که جراحی به تنهایی درمان مناسبی برای این بیماری نیست و باید همراه با سایر روش‌های درمانی مانند شیمی‌درمانی، پرتودرمانی و غیره همراه باشد (۶-۹). در این راستا، با توجه به بومی بودن گیاه گاوزیره^۱ و همچنین تکمیل مطالعات انجام شده در گذشته، شناسایی هرچه بیشتر و بهتر خصوصیات بیولوژیک عصاره دانه گیاه گاوزیره امری ضروری به نظر می‌رسد. این گیاه به عنوان ادویه در غذا، ترش‌جات و همچنین جهت محافظت از گوشت کاربرد دارد. شایان ذکر است که اسانس این گیاه به خوبی لاروهای آنوفل و کولکس را از بین می‌برد به طوری که می‌توان از آن به عنوان یک روش مبارزه با ناقلین بیماری مالاریا استفاده نمود (۱۰). همچنین عصاره آبی گیاه گاوزیره تهیه شده به روش خیساندن نیز شامل متابولیت‌های ثانویه از قبیل فلاونوئیدها، کومارین‌ها، کینون‌ها، کاردیاک گلیکوزیدها، فنول‌ها، ترپنوئیدها و فلویاتان‌ها است که هریک از آن‌ها خواص بیولوژیک فوق‌العاده‌ای دارند (۱۱). از این رو، با توجه به انحصاری و غنی بودن این گیاه از متابولیت‌های ثانویه، در پژوهش حاضر برای اولین بار خواص آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدباکتریایی و همچنین اثر سیتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره بر روی رده سلولی 8305C سرطان تیروئید آناپلاستیک (ATC) ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

الف: مشخصات منطقه مورد پژوهش

¹ *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss.

² Anaplastic thyroid cancer

شناسایی کیفی کینون‌ها: به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، ۱ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ در یک لوله آزمایش افزوده شد. مشاهده رنگ قرمز، مشخصه وجود کینون‌ها است.

شناسایی کیفی دی‌ترپنوئیدها: به ۲ میلی‌لیتر از عصاره، چند قطره محلول مس استات (سیگما آلدریچ، آلمان) در یک لوله آزمایش اضافه شد. مشاهده رنگ سبز، مشخصه وجود دی‌ترپنوئیدها است.

شناسایی کیفی فلوباتان‌ها: به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، چند قطره اسید کلریدریک در یک لوله آزمایش افزوده شد. رنگ قرمز نشان‌دهنده وجود فلوباتان‌ها است.

ت: سنجش مقدار فنول کل به روش رنگ‌سنجی فولین - سیوکالتیو

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره از طریق رنگ‌سنجی به روش فولین - سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت (۱۳). بدین منظور، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تهیه شد. سپس ۰/۲۵ میلی‌لیتر از عصاره با ۲/۵ میلی‌لیتر واکنش‌گر ۰/۲ نرمال فولین - سیوکالتیو (سیگما آلدریچ، آلمان) ترکیب شده و پس از گذشت ۵ دقیقه ۲ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات (سیگما آلدریچ، آلمان) به آن اضافه شد. در نهایت نیز جذب نمونه حاصل پس از ۱۵ دقیقه در طول موج ۷۶۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (شرکت سازنده: Rayleigh، مدل دستگاه: 1601) در مقابل بلانک خوانده شد. سپس گالیک اسید (سیگما آلدریچ، آلمان) به‌عنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون به کار رفت و مقدار فنول کل بر اساس میزان معادل میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره گزارش گردید.

ج: سنجش مقدار فلاونوئید کل به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید

مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره با استفاده از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۴). بدین منظور، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره تهیه شد. سپس به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره ۱/۵ میلی‌لیتر متانول (سیگما آلدریچ، آلمان) و در ادامه ۰/۱ میلی‌لیتر آلومینیوم کلراید (سیگما آلدریچ، آلمان) ۱۰ درصد به آن اضافه شد. در مرحله بعد، ۰/۱ میلی‌لیتر پتاسیم استات (سیگما آلدریچ، آلمان) ۱ مولار و همچنین ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری

شناسایی کیفی ترپنوئیدها: در یک لوله آزمایش، به ۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۲ میلی‌لیتر کلروفرم (سیگما آلدریچ، آلمان) اضافه شد. سپس به مقدار ۳ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ (سیگما آلدریچ، آلمان) به دقت به محلول فوق به صورت یک لایه افزوده شد. وجود رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز، در سطح مشترک محلول، مشخصه وجود ترپنوئیدها است.

شناسایی کیفی فلاونوئیدها: در یک لوله آزمایش، به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، چند قطره محلول آمونیاک ۱ درصد (سیگما آلدریچ، آلمان) اضافه گردید. مشاهده رنگ زرد، نشان‌دهنده وجود فلاونوئیدها است.

شناسایی کیفی کومارین‌ها: به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، ۱ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکسید (سیگما آلدریچ، آلمان) در یک لوله آزمایش افزوده شد. مشاهده رنگ زرد، مشخصه وجود کومارین‌ها است.

شناسایی کیفی فنول‌ها: به ۱ میلی‌لیتر از عصاره، ۳ قطره محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد (سیگما آلدریچ، آلمان) در یک لوله آزمایش افزوده شد. مشاهده رنگ آبی - مشکی، نشان‌دهنده وجود فنول‌ها است.

شناسایی کیفی کاردیاک گلیکوزیدها: به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۲ میلی‌لیتر استیک اسید گلاسیال (سیگما آلدریچ، آلمان) و یک قطره محلول فریک کلرید اضافه و سپس ۱ میلی‌لیتر سولفوریک اسید غلیظ به آن افزوده شد. مشاهده حلقه قهوه‌ای رنگ در سطح مشترک محلول، مشخصه وجود کاردیاک گلیکوزیدها است.

شناسایی کیفی ساپونین‌ها: به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش افزوده شد. سپس محلول به شدت تکان داده شد. مشاهده کف پایدار و مداوم، نشان‌دهنده وجود ساپونین‌ها است.

شناسایی کیفی تانن‌ها: به ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره، ۱ میلی‌لیتر آب مقطر در یک لوله آزمایش اضافه و همچنین چند قطره محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد نیز به آن افزوده شد. مشاهده رنگ سبز مایل به قهوه‌ای و یا آبی - مشکی، مشخصه وجود تانن‌ها است.

فارلند (CFU/ml) $10^3 \times 1/5$ از تمامی سویه‌های باکتری تهیه گردید. در مرحله بعد، با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه‌شده، کشت باکتری‌ها به صورت یکنواخت در سطح محیط مولر هینتون آگار انجام شد. سپس دیسک‌های استریل در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از نمونه غوطه‌ور شدند. در نهایت، دیسک‌های آماده‌شده با فاصله مشخصی از یکدیگر در داخل پلیت‌ها قرار گرفتند. پس از این مرحله، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس، قطر هاله عدم‌رشد براساس میلی‌متر ارزیابی و ثبت شد. شایان ذکر است که در این سنجش از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (سیگما آلدریج، آلمان) به‌عنوان کنترل استفاده گردید.

خ: رده سلولی و نحوه کشت سلولی

رده سلولی استفاده‌شده در این پژوهش، سلول سرطانی تیروئید آناپلاستیک مدل 8305C می‌باشد که از بانک سلولی انستیتو پاستور با کد C597 تهیه شد. بدین منظور، سلول‌ها در فلاسک حاوی محیط‌کشت DMEM (سیگما آلدریج، آلمان) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر استرپتومایسین (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم‌منفی) و ۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر پنی‌سیلین (برای جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم‌مثبت) کشت و پاساژ داده شد. سپس، جهت جدا نمودن سلول‌ها از کف فلاسک از محلول تریپسین (سیگما آلدریج، آلمان) استفاده گردید.

د: ارزیابی سمیت سلولی به روش آزمون رنگ‌سنجی

MTT

یکی از پرکاربردترین آزمون‌های سلولی MTT است که به‌عنوان یک مشخصه برای زنده بودن سلول، میزان بقای آن را مشخص می‌کند. به‌طور معمول از این آزمون برای بررسی سمیت سلولی استفاده می‌کنند. اساس این روش تبدیل نمک تترازولیوم زرد رنگ یا همان معرف MTT (سیگما آلدریج، آلمان)، به کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ در سلول‌های فعال است. بدین ترتیب مقدار جذب نوری برحسب شدت رنگ فورمازان در طول موج ۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش گر ایژا (مدل دستگاه: BioTec ELx 800) اندازه‌گیری شد. در نهایت نیز به‌منظور تبدیل چگالی نوری^۵ به درصد سلول‌های زنده از فرمول زیر استفاده شد (۱۸، ۱۹):

شد. در ادامه، جذب نمونه حاصل در طول موج ۴۱۵ نانومتر به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. در نهایت، مقادیر کل ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از منحنی استاندارد بر اساس میلی‌گرم روتین^۱ (سیگما آلدریج، آلمان) بر گرم عصاره گزارش شد.

چ: تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH^{۰۲}

فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق اندازه‌گیری ظرفیت مهار رادیکالی ۲ و ۲ دی فنیل - ۱ - پیکریل هیدرازیل (DPPH^۰) مورد بررسی قرار گرفت (۱۵، ۱۶). بدین منظور، ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار (DPPH^۰) (سیگما آلدریج، آلمان) به ۱ میلی‌لیتر از نمونه اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد. سپس جذب مخلوط با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با بلانک متانول خوانده شد. در این سنجش، آسکوربیک اسید (سیگما آلدریج، آلمان) به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. در نهایت، مقدار به دام‌اندازی رادیکال DPPH^۰ با فرمول زیر محاسبه گردید:

$$RSA^3 = \frac{(A_B - A_S)}{A_B} \times 100$$

A_B = میزان جذب نوری کنترل منفی

A_S = میزان جذب نوری نمونه‌های مورد آزمایش

RSA = درصد مهار رادیکال ۲ و ۲ دی فنیل - ۱ - پیکریل هیدرازیل

فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت مقدار IC_{50} بیان می‌گردد. در واقع IC_{50} نشان‌دهنده غلظتی از نمونه است که باعث ۵۰ درصد بازدارندگی در ظرفیت رادیکال آزاد می‌گردد.

ح: بررسی فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار دیسک

ابتدا باکتری‌های مورد نظر از مرکز کلکسیون‌های میکروبی صنعتی ایران خریداری شدند. سپس، آزمون فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره، بر روی دو باکتری گرم‌مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس^۴ با کد ۲۹۲۱۳) و (باسیلوس سرئوس^۵ با کد ۱۴۵۷۹) و همچنین یک باکتری گرم‌منفی (شریشیاکلی^۶ با کد ۲۵۹۲۲) با استفاده از روش انتشار دیسک و براساس استاندارد NCCLS 2006 انجام شد (۱۷). برای این منظور، در ابتدا سوسپانسیونی معادل نیم مک

^۵ Bacillus cereus

^۶ Escherichia coli

^۷ Optical Density

^۱ Rutin

^۲ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH^۰)

^۳ Radical scavenging activity (RSA)

^۴ Staphylococcus aureus

اطلاعات به‌دست آمده به‌صورت (انحراف معیار ± میانگین) برای سه بار تکرار محاسبه و از نرم‌افزار^۱ SPSS نسخه ۲۶ به‌منظور تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

OD شاهد / OD نمونه = درصد توانایی زیستی
در این آزمون غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نیم کاهش می‌دهد، به‌عنوان IC₅₀ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

جدول (۱) نتایج حاصل از بررسی آزمایش‌های فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره را به‌صورت کیفی نشان می‌دهد.

ذ: محاسبات آماری

جدول ۱- غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه

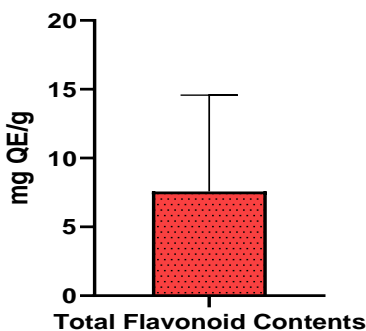
ردیف	متابولیت‌های ثانویه	نتایج
۱	ترپنوئیدها	+
۲	فلاونوئیدها	+
۳	کومارین‌ها	+
۴	فنول‌ها	+
۵	کاردیاک گلیکوزیدها	+
۶	ساپونین‌ها	+
۷	تانن‌ها	+
۸	کینون‌ها	+
۹	دی ترپنوئیدها	-
۱۰	فلوباتانن‌ها	-

گاوزیره

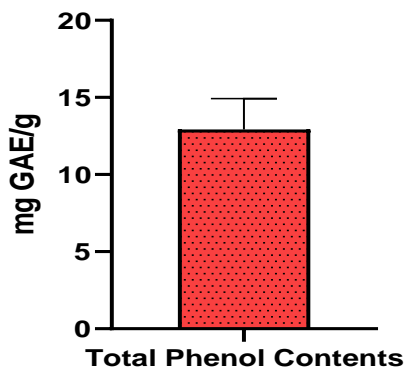
+ : وجود ترکیب مورد نظر / - : عدم وجود ترکیب مورد نظر

مطابق با جدول ۱ غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره حضور فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کومارین‌ها، کاردیاک گلیکوزیدها، تانن‌ها، فنول‌ها، کینون‌ها و ساپونین‌ها را تأیید کرد. از طرفی نیز، مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره با استفاده از روش فولین - سیوکالتیو به‌صورت اکی‌والان گالیک اسید در یک گرم عصاره براساس معادله خط منحنی استاندارد (Y = ۰/۹۷۹۵ X^۲، R^۲ = ۰/۹۷۹۵) تعیین و مقدار ±۷/۵۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.

مطابق با جدول ۱ غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره حضور فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کومارین‌ها، کاردیاک گلیکوزیدها، تانن‌ها، فنول‌ها، کینون‌ها و ساپونین‌ها را تأیید کرد. از طرفی نیز، مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره با استفاده از روش فولین - سیوکالتیو به‌صورت اکی‌والان گالیک اسید در یک گرم عصاره براساس معادله خط منحنی استاندارد (Y = ۰/۹۷۹۵ X^۲، R^۲ = ۰/۹۷۹۵) تعیین و مقدار ±۷/۵۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید.



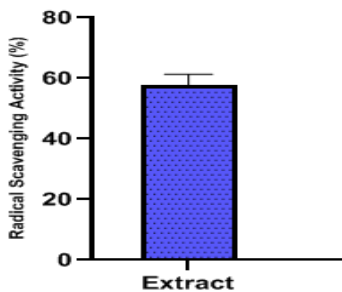
نمودار ۱- مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره



نمودار ۲- مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره

کنترل مثبت استفاده گردید که مقدار IC_{50} آن $0/0116$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. از این رو، براساس نمودار ۳، نتایج درصد مهار رادیکال آزاد مربوط به عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره $57/70 \pm 0/5$ و همچنین مقدار IC_{50} نیز $0/66$ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

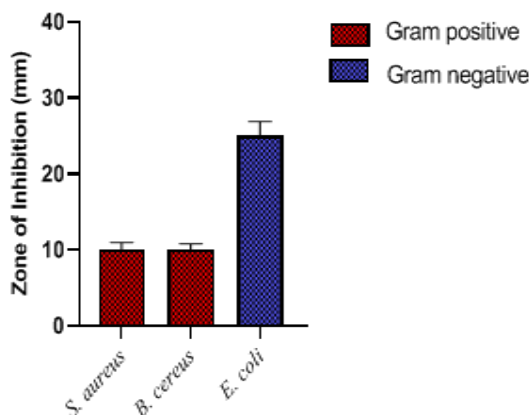
مطابق با نمودارهای ۱ و ۲، نتایج حاکی از آن است که مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره بیشتر از مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد. همچنین نتایج خواص آنتی‌اکسیدانی به روش $DPPH^0$ براساس معادله خط منحنی استاندارد ($Y = 44/42X, R^2 = 0/998$) محاسبه شد. در این سنجش از آسکوربیک اسید به عنوان



نمودار ۳- درصد مهار رادیکال آزاد عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره

است (مقدار قطر هاله عدم‌رشد آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۶ میلی‌متر گزارش شد).

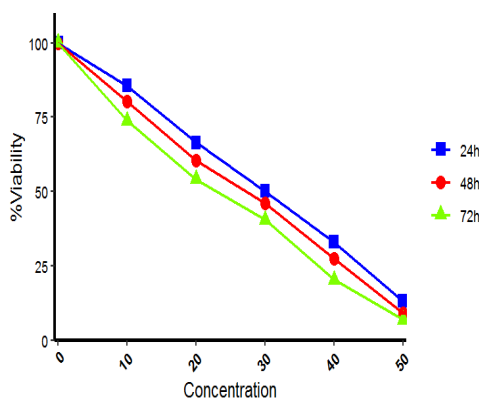
نمودار ۴، مقدار قطر هاله عدم‌رشد در عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره را نمایش می‌دهد که مقدار قطر هاله عدم‌رشد، در باکتری گرم‌منفی نسبت به باکتری‌های گرم‌مثبت بیشتر



نمودار ۴- مقایسه میانگین قطر هاله عدم‌رشد عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره بر روی باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی

هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره، وابسته به دوز می‌باشد که در دوز ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت، بیشترین اثر توان زیستی (زنده‌مانی) مشاهده گردید که میزان IC_{50} آن برابر با $50/12 \pm 0/02$ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد:

در ادامه، اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره بر روی رده سلولی سرطانی 8305C با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد زنده‌مانی سلول‌ها پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری گردید. مطابق با نمودار ۵، نتایج نشان دادند که سمیت سلولی عصاره



نمودار ۵- درصد توان زیستی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره بر روی رده سلولی 8305C سرطان تیروئید آناپلاستیک

رادیکال‌های آزاد در به‌وجود آمدن بیماری‌های زیادی نقش عمده ایفا می‌کنند و بدن برای مقابله با آسیب اکسیداتیو ناشی از این رادیکال‌ها از سیستم‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی استفاده می‌کند. امروزه با توجه به زندگی صنعتی، منابع تولید رادیکال‌های آزاد بسیار متنوع هستند و انسان‌ها هر روز در معرض این عوامل مخرب قرار دارند. نقش این رادیکال‌های

بحث

در سال‌های اخیر، استفاده از منابع گیاهی در عرصه دارودرمانی مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته و توانسته است در کنار داروهای شیمیایی، توجه پژوهشگران علوم دارویی و پزشکی را به خود معطوف کند. مواد آنتی‌اکسیدان در بین ترکیبات موجود در گیاهان جایگاه خاصی دارند زیرا

طبیعی مانند (سیلی‌بینین^۱؛ کورکومین^۲) و همچنین گیاه اسطوخودوس^۳ با نام علمی مقایسه شده‌است. اثر توان زیستی (زنده‌مانی) عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک به روش MTT، در دوز ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان ۲۴ ساعت مشاهده و میزان IC₅₀ آن برابر با ۰/۰۲±۰/۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در این راستا، مطالعات وحدتی‌راد و همکارانش در سال ۱۳۹۲ نشان می‌دهند که سیلی‌بینین بر روی رده سلولی 8305C اثر سمی داشته و با افزایش دوز سیلی‌بینین اثر سمی آن نیز بیشتر می‌شود. چنانچه اشاره شده اثر سمی سیلی‌بینین بر روی رده سلولی 8305C با افزایش دوز سیلی‌بینین نیز افزایش می‌یابد (۲۰). در طی پژوهشی که مهدی‌نژاد دوغیکلائی و محمدی در سال ۱۳۹۷ بر روی اثر آنتی-اکسیدانی و سیتوتوکسیک عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس بر روی رده سلولی 8305C انجام دادند، مشخص شد که عصاره گیاه اسطوخودوس در دوز ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در مدت‌زمان ۴۸ ساعت باعث مرگ ۵۰ درصد از سلول‌های سرطانی رده سلولی 8305C می‌گردد. در واقع، نتایج حاکی از آن بود که عصاره اتانولی گیاه اسطوخودوس به‌صورت وابسته به دوز قادر به از بین بردن سلول‌های سرطانی بوده و خواص سیتوتوکسیکی قابل توجهی را از خود نشان می‌دهد (۲۱). همچنین توکلی و همکاران در سال ۱۴۰۰، تأثیر سیتوتوکسیک کورکومین بر توان زیستی و میزان بیان ژن‌های *BCL-2* و *P21* در رده سلولی کارسینومای آناپلاستیک تیروئید انسان را بررسی کردند. بر طبق یافته‌های حاصل از پژوهش آن‌ها، توان زیستی سلول‌های آناپلاستیک تیروئید در هر دو زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ ساعت، در تیمار با دوز ۷/۵ میکرومولار از کورکومین به‌طور چشمگیرتری نسبت به گروه کنترل و در مقایسه با گروه‌های آزمایشی دیگر کاهش یافته و همچنین تیمار سلول‌ها با غلظت‌های (۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میکرومولار) کورکومین به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سبب تغییر معنی‌داری در میزان بیان ژن *BCL-2* و *P21* نسبت به گروه کنترل گردیده است و در نتیجه کورکومین اثر مهار بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی آناپلاستیک تیروئیدی انسان

آزاد در بسیاری از بیماری‌های انسان مانند سرطان، دیابت، بیماری‌های قلب و عروق و آلزایمر مشخص شده‌است. در پژوهش حاضر، غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره حضور فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کومارین‌ها، کاردیاک گلیکوزیدها، تانن‌ها، فنول‌ها، کینون‌ها و ساپونین‌ها را تأیید کرد. مقدار کل ترکیبات فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب ۱۲/۹۳±۲ و ۷/۵۸±۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه گردید. از طرفی نیز درصد مهار رادیکال آزاد ۵۷/۷۰±۰/۵ و مقدار IC₅₀، ۰/۶۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. در همین راستا، گزارش برخی از محققان بیانگر آن است که ارتباط بسیار بالایی بین آزمایش فنول کل به روش فولین - سیوکالتو با آزمایش‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH^۰ وجود دارد و به‌نظر می‌رسد که رابطه مستقیمی بین مقدار فنول و فلاونوئید کل با فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH^۰ وجود دارد که نتایج پژوهش حاضر بیانگر این موضوع است (نمودارهای ۱ تا ۳). همچنین قطر هاله عدم‌رشد، در باکتری گرم‌منفی /شریشیالکی و باکتری‌های گرم‌مثبت (- استافیلوکوکوس /اورئوس، باسیلوس سرئوس) به ترتیب ۱۰، ۲۵ و ۱۰ میلی‌متر مشاهده شد که در همین راستا مطالعات انجام‌شده نشان داده است که بسیاری از گیاهان خانواده چتریان دارای اثرهای ضدباکتریایی چشمگیری می‌باشند. معمولاً خواص ضدباکتریایی گیاهان به یک نوع خاص از متابولیت‌های ثانویه نسبت داده نمی‌شود، بلکه به همکاری ترکیبات موجود در گیاه نسبت داده می‌شود. ترکیبات فیتوشیمیایی با خاصیت ضدباکتریایی به چند گروه تقسیم می‌شوند که شامل آکالوئیدها، ترکیبات فنولیک، ترپنوئیدها و غیره می‌باشند. از این‌رو، به‌نظر می‌رسد فعالیت ضدباکتریایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره به دلیل وجود ترکیبات فیتوشیمیایی آن می‌باشد (جدول ۱). شایان ذکر است که تاکنون پژوهشی در مورد بررسی سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزبیره بر روی رده سلولی سرطان تیروئید آناپلاستیک 8305C صورت نگرفته است، لذا پژوهش حاضر اولین مطالعه در این زمینه می‌باشد و نتایج به‌دست آمده از آن با سایر مطالعات انجام‌شده بر روی ترکیبات مؤثره

³ *Lavandula angustifolia* Mill.¹ Silibinin² Curcumin

8305C نشان داده شد که این نتایج بیانگر آن است که این گیاه می‌تواند به‌عنوان یک انتخاب دارویی طبیعی مناسب، از پیشرفت رشد سلول‌های سرطانی در محیط درون‌تنی مورد توجه قرار گیرد. البته تحقیقات بیشتری جهت شناختن مکانیسم سلولی و مولکولی عصاره خالص و همچنین نانوذرات سنتز شده با استفاده از آن بر القاء مسیر آپوپتوز لازم می‌باشد. در نهایت نیز یادآوری می‌شود که نتایج پژوهش حاضر حاصل کار تحقیقاتی در محیط آزمایشگاهی (برون‌تن) است و لزوم انجام تحقیقات بیشتر مورد تأکید می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که تعارض منافی وجود ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تنکابن کمال تشکر و قدردانی را دارند.

دارد (۲۲). در حقیقت، نقطه نظر مشابه پژوهش ما با سایر مطالعات انجام شده، اثر معنادار سمیت سلولی عصاره و ترکیبات مؤثره می‌باشد که با افزایش دوز، سمیت سلولی نیز افزایش می‌یابد و در واقع وابسته به دوز است. در نهایت براساس نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر، این طور به نظر می‌رسد که پس از تیمار سلول‌ها با عصاره گیاه، متابولیت‌های ثانویه وارد سلول سرطانی شده و احتمالاً به طور مستقیم بر مسیرهای پیام‌رسانی و یا DNA سلول اثر می‌گذارند و همان طور که قبل تر نیز اشاره شد، تحقیقات اخیر نشان داده است که اکثر پژوهشگران به دنبال یافتن ترکیبات ضد سرطانی که اثرهای خود را از طریق آپوپتوز نشان می‌دهند، می‌باشند (۲۳-۲۵). در نهایت، شایان ذکر است که تفاوت در نتایج حاصل از پژوهش‌ها در زمینه بررسی فعالیت اثرهای سمیت سلولی، حاکی از آن است که عوامل متعددی از قبیل منطقه جغرافیایی گیاه، زمان برداشت و سن آن، اندام گیاهی مورد استفاده، روش عصاره‌گیری و نوع حلال مورد استفاده، غلظت عصاره، نوع رده سلول سرطانی، نوع محیط کشت، نوع آزمون سلولی، زمان، دما، pH و غیره می‌تواند بر فعالیت سمیت سلولی تأثیر بگذارند.

نتیجه‌گیری

در مجموع این موضوع حائز اهمیت است که برای اولین بار اثرهای بیولوژیک عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره برداشت شده از ارتفاعات رامسر بر روی رده سلول سرطانی

منابع

1. Metzcar J, Wang Y, Heiland R, Macklin P. A Review of Cell-Based Computational Modeling in Cancer Biology. *JCO Clin Cancer Inform*, 2019; 2:1-13.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global Cancer Statistics 2018: Globocan Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA A Cancer J Clin*, 2018; 68(6): 394-424.
3. Lowe NM, Loughran S, Slevin NJ, Yap BK. Anaplastic thyroid cancer: the addition of systemic chemotherapy to radiotherapy led to an observed improvement in survival—a single centre experience and review of the literature. *The Scientific World Journal*. 2014;2014(1):674583.
4. Lloyd RV, Osamura RY, Kloppel G, Rosai J. Tumours of the Thyroid Gland. In: WHO Classification of Tumours of Endocrine Organs. 4th ed. Lyon, France: IARC, 2017; P. 65-144.
5. Ragazzi M, Ciarrocchi A, Sancisi V, Gandolfi G, Bisagni A, Piana S. Update on anaplastic thyroid carcinoma: morphological, molecular, and genetic features of the most aggressive thyroid cancer. *International journal of endocrinology*. 2014;2014(1):790834.
6. Nagaiah G, Hossain A, Mooney CJ, Parmentier J, Remick SC. Anaplastic thyroid cancer: a review of epidemiology, pathogenesis, and treatment. *Journal of oncology*. 2011;2011(1):542358.
7. Xu T, Fuchs S, Dogan I, Landa N, Katabi JA, Fagin RM, Tuttle E, Sherman AJ, Gill R, Ghossein, Dissecting Anaplastic Thyroid Carcinoma: A Comprehensive Clinical, Histologic, Immunophenotypic, and Molecular Study of 360 Cases. *Thyroid*, 2020; 30(10):1505-1517.
8. Chung JK, Cheon GJ. Radioiodine Therapy in Differentiated Thyroid Cancer: The First Targeted Therapy in Oncology. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014; 29(3): 233-239.
9. Singh A, Ham J, Po JW, Niles N, Roberts T, Lee CS. The Genomic Landscape of Thyroid Cancer Tumorigenesis and Implications for Immunotherapy. *Cells*, 2021; 10(5):1082.
10. Reza VR, Abbas H. Chemical constituents and larvicidal activity of the essential oil of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss (Apiaceae).
11. Pourshamsian KH, Ojani SH. Phytochemical Screening of the Aqueous Extract of Seeds of *Polylophium involucreatum* (Pall.) Boiss. from Ramsar-Iran. *Planta Med*, 2016; 82(5): PC 62.
12. Trease EC, Evans WC. *Pharmacognosy*. 16th Edition, W.B. Saunders, Philadelphia, 2009; 365-650.
13. Tian W, Chen G, Zhang G, Wang D, Tilley M, Li Y. Rapid determination of total phenolic content of whole wheat flour using near-infrared spectroscopy and chemometrics. *Food Chemistry*. 2021 May 15;344:128633.
14. Shraim AM, Ahmed TA, Rahman MM, Hijji YM. Determination of total flavonoid content by aluminum chloride assay: A critical evaluation. *Lwt*. 2021 Oct 1;150:111932.
15. Karle PP, Dhawale SC, Navghare VV, Shivpuje SS. Optimization of extraction conditions and evaluation of Manilkara zapota (L.) P. Royen fruit peel extract for in vitro α -glucosidase enzyme inhibition and free radical scavenging potential. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021 Dec;7:1-0.
16. Lebanov L, Chung Lam S, Tedone L, Sostaric T, Smith JA, Ghiasvand A, et al. Radical Scavenging Activity and Metabolomics Profiling Study of Ylang-Ylang Essential Oils Based on High Performance Thin Layer Chromatography and Multivariate Statistical analysis. *J Chromatogr B*, 2021; 1179, Article 122861.
17. Hassan MM. Scenario of antibiotic resistance in developing countries. *Antimicrobial Resistance—A One Health Perspective*. 2020 Dec 28.
18. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunol Methods*, 1983; 65(1-2):55-63.
19. Momeny M, Malehmir M, Zakidizaji M, Ghasemi R, Ghadimi H, Shokrgozar MA, Emami AH, Nafissi S, Ghavamzadeh A, Ghaffari SH. Silibinin Inhibits Invasive Properties of Human Glioblastoma U87MG Cells Through Suppression of Cathepsin B and Nuclear Factor Kappa B - Mediated Induction of Matrix Metalloproteinase 9. *Anticancer Drugs*, 2010; 21(3):252-260.
20. Vahdatirad V, Ghaffari S H, Momeny M, Shahbani Zahiri H. Effect of Silibinin on the Metabolic Activity of the 8305C Cell Line in Thyroid Cancer. *NCMBJ*, 2014; 3(12): 25-30.

21. Mehdinezhad Doghikolayi S, Mohammadi M. The antioxidant and cytotoxic effects of *lavandula angustifouliya* on the 8305C cell line. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*. 2018 Oct 10;8(32):91-8.
22. KH K. Cytotoxic effect of curcumin on viability and P21 and Bcl-2 genes expression of the human anaplastic thyroid Carcinoma cells line (SW-1736). *Journal of Torbat Heydariyeh University of Medical Sciences*. 2021 Jul 10;9(1):1-0.
23. Avendaño C, Menéndez JC. *Medicinal chemistry of anticancer drugs*. Elsevier; 2015.
24. Kumar M, Kaur V, Kumar S, Kaur S. Phytoconstituents as Apoptosis Inducing Agents: Strategy to Combat Cancer. *Cytotechnology*, 2016; 68(4):531–563.
25. Zaidieh T, Smith JR, Ball KE, An Q. ROS as a Novel Indicator to Predict Anticancer Drug Efficacy. *BMC Cancer*, 2019; 19(1224):1–14.