



Scan online to view this article

## Cytotoxicity of methanol extracts of *Ziziphora tenuior.L* on Hela cell line by MTT assay

Elahe Nasiri Tarzejani, Sima Nasri\*

Department of biology, Payame noor University, Tehran, Iran

### Abstract

**Aim and Background:** Cancer in recent centuries is one of the main causes of mortality in human societies. So far, many studies have been conducted to treat this fatal disease, but innovative methods have not yet succeeded in achieving the desired outcome for the treatment of this disease. Herbal remedies, due to their greater compatibility with their natural constituents, have fewer side effects with the body, while in many cases they also have more curative power. *Ziziphora tenuior* is a well-known compound with important therapeutic effects, such as Pulegone, limonene, thymol, and alpha-pinene. The present study was conducted to investigate the therapeutic effects of methanolic extract of *Ziziphora tenuior* leaves on cancer.

**Materials and Methods:** The method of experimentation was to determine the effect of methanolic extract of this plant on the hela cell line as a representative of cancer cells and cell line hek as a representative of normal and healthy cells using the MTT test. The doses used were 0.1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 1000  $\mu\text{g}$  / ml and at 24, 48 and 72 hours of cell culture were performed with MTT assay. For the positive control group, Colchicine (0.5  $\mu\text{g}$  / ml) was used.

**Results:** Dose of 100  $\mu\text{g}$  / ml in 48 hours didn't have significant effect on hek cells but had meaningful effect on hela cells ( $P < 0.001$ ).

**Conclusion:** According to the results of previous studies and the present research, it is believed that the *Ziziphora tenuior* has beneficial effects in the treatment of cancer.

**Key words:** *Ziziphora tenuior*, Hela cell, Hek cell, MTT, Cancer

Corresponding author:

Department of biology, Payame noor University, Tehran, Iran

Email: nasri1@pnu.ac.ir



برای مشاهده این مقاله به صورت  
آنلاین اسکن کنید

## بررسی اثر عصاره متانولی برگ گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora tenuior*) بر سلول های هلا با استفاده از

### تست MTT

الهه نصیری طرزجانی، سیما نصری\*

گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران.

#### چکیده

**سابقه و هدف:** بیماری سرطان در قرون اخیر از جمله علل اصلی مرگ و میر در جوامع بشری است. تاکنون تحقیقات و پژوهش های زیادی برای درمان این بیماری مهلک صورت گرفته است اما روش های ابداعی هنوز نتوانسته اند به نتیجه مطلوب برای درمان ای بیماری برسند. داروهای گیاهی با توجه به سازگاری بیش تر ترکیب های طبیعی آن ها با بدن موجودات زنده دارای عوارض جانبی کم هستند. پژوهش حاضر برای بررسی اثرهای درمانی عصاره متانولی برگ های گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora tenuior*) بر بیمار سرطان صورت گرفت.

**مواد و روش ها:** در این پژوهش، اثرسنجی عصاره متانولی برگ های این گیاه بر رده سلولی هلا به عنوان نماینده سلول ها؛ سرطانی و رده سلولی هک به عنوان نماینده سلول های نرمال و سالم با استفاده از تست MTT انجام شد. دوزهای به کار گرفته شده نپ  $0/1, 1, 10, 50, 100, 150, 200, 1000$  بودند و در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته از کشت سلول تست MTT انجام شد برای گروه کنترل مثبت نیز داروی کلشی سین با دوز  $0/5 \mu\text{g/ml}$  مورد استفاده قرار گرفت.

**یافته ها:** دوز  $100 \mu\text{g/ml}$  از عصاره در زمان ۴۸ ساعت در سطح معنی داری  $P < 0/001$  دارای کم ترین میزان تأثیر منفی بر زندگی سلول های هک و بیش ترین اثر بر درصد مرگ و میر سلول های هلا به عنوان بهترین و مؤثرترین دوز بود.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج پژوهش هایی که در گذشته صورت گرفته و تحقیق حاضر، گمان می رود که گیاه کاکوتی دارا؛ اثرهای درمانی مثبتی در درمان بیماری سرطان باشد.

**واژه های کلیدی:** کاکوتی کوهی، سلول هلا، سلول هک، MTT، سرطان.

#### مقدمه

بیماری سرطان از جمله کشنده ترین عوامل مرگ و میر در

انسان است. متأسفانه علی رغم پیشرفت بشر در زمینه های گوناگون رشد و آسیب این بیماری روز بروز در حال افزایش است که بخش عمده ای از آن به جهت تغییر سبک زندگی انسان است (۱). در روش های درمانی به کار رفته برای این بیماری مانند شیمی درمانی از عمده ترین مشکلات، عوارض جانبی زیاد و ناکارآمدی این درمان ها است. در دهه های اخیر بشر با رویکرد دوباره به طبیعت و استفاده از داروهای گیاهی سعی در درمان بسیاری از بیماری ها من جمله سرطان

#### نویسنده مسئول:

گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران

پست الکترونیکی: nasrili@pnu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۶

مؤثره مهمی هم چون پولگون در عصاره کاکوتی اثر آن بر سلول های سرطانی مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش ها

برای عصاره گیری از گیاه کاکوتی کوهی برگ های این گیاه که از مناطق واقع در استان خراسان رضوی کشور گردآوری شده بود استفاده گشت. پس از خشک کردن آن در شرایط استاندارد، دور از نور خورشید و رطوبت و آلودگی با کد هرباریومی kakuti1315 در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن شناسایی شد. برای عصاره گیری پس از آسیاب آن، از روش ماسراسیون استفاده شد. در این روش گیاه آسیاب شده در محلول متانولی ۷۰٪ به مدت ۴۸ ساعت خیسانده شد و در نهایت محلول به دست آمده به دستگاه تقطیر در خلاء منتقل شد، تغلیظ و به آرامی خشک شد (۱۲). سپس رطوبت نسبی عصاره اندازه گیری گردید. میزان رطوبت نسبی ۳۵/۱۷ بود. جهت آماده سازی عصاره موردنظر برای تیمار سلول ها در ۱ ml آب مقطر، ۱ mg عصاره گیاه کاکوتی- کوهی حل شد تا محلول اولیه تهیه شود. سپس برای تهیه غلظت های مختلف برای افزودن به محیط کشت، محلول ذکر شده با نسبت های مختلف رقیق گشت تا با افزودن حجم مناسب به هر چاهک میزان عصاره موردنظر انتقال یابد (۲، ۱۳). در این پژوهش از لاین سلول های سرطانی هلا (C115) و سالم هک (C10139) تهیه شده از انستیتو پاستور تهران مورد استفاده قرار گرفت. سپس پاساژ سلول- های فوق صورت گرفت. محیط کشت به کار رفته برای لاین- های سلولی فوق DMEM بود (۱۴). برای آماده سازی محیط کشت ابتدا آب مقطر دیونیزه را پیش تر استریل و سرد نموده به میزان سه چهارم حجم نهایی که مورد نیاز است در بطری ریخته، پودر محیط کشت که پیش تر وزن کشی شده به آرامی به بطری اضافه کرده و تا حل شدن کامل آن باید صبر کرد. پس از آن پودر بی کربنات  $\text{NaHCO}_3$  به آن شد. مقدار آن نیز متناسب با مقادیر دستورالعمل شرکت سازنده است. با توجه به آن که  $\text{pH} = 7$  برای محیط کشت سلول ایده آل است اما به جهت آن که FBS با خاصیت اسیدی به محیط افزوده خواهد شد  $\text{pH}$  محیط را کمی قلیایی و بین ۷/۲ و ۷/۴ تنظیم گردید. برای

با عوارض جانبی کم تر نموده است (۲). گیاه کاکوتی در سفره غذایی مردم ایران به عنوان چاشنی و طعم دهنده مورد استفاده قرار می گیرد اما با توجه به ترکیب های موجود در آن از دیرباز در طب سنتی کاربرد و اهمیت ویژه ای در تسکین و درمان دردهای مختلف بیماری ها داشته است (۱). گیاه کاکوتی کوهی در خانواده نعنائیان قرار داشته و اعضا این خانواده به عنوان آرام بخش، مسکن، درمان اختلال های قلبی و ترمیم زخم ها به کار می روند (۱). با توجه به وجود مواد آنتی اکسیدانی فراوان در این گیاه و ترکیب های شیمیایی آلی چون ترپن ها، سزکویی ترپن ها کاربرد این گیاه در صنایع غذایی و پزشکی مورد توجه خاص قرار گرفته است (۳). از دیگر ترکیب های فیتوشیمیایی مربوط به جنس کاکوتی ترکیبی ضد سرطانی به نام دیازل هپتانوئید است. در پژوهش- هایی که در سالیان اخیر صورت گرفته اثرهای ضد سرطانی این ترکیب مشاهده شده است که مکانیسم اثر آن از طریق تأثیر در مسیرهای پیام رسانی مختلفی از قبیل آپوپتوزیس، سیکل تکثیر سلولی، زنده مانی سلول ها و متاستازیس است (۴). کاکوتی دارای مواد مؤثره ای هم چون سینئول، پیپریتون، منتون، پولگون، ایزومنتول و کورکومین است. پولگون با فرمول شیمیایی  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{O}$  که کتونی مونوترپن است و از ترکیب های عمده در این گیاه است (۵). در طب سنتی دم کرده سرشاخه های گل دار این گیاه به عنوان مقوی معده و رفع نفخ به کار برده می شود. هم چنین در درمان و بهبود ناراحتی های قاعدگی به کار برده می شود (۶). تأثیر آن بر ناراحتی های تنفسی مشهود است و به عنوان خلط آور مصرف می شود (۷). در بلوچستان برای کاهش تب و قطع اسهال، ناراحتی های گوارشی مانند عفونت روده به کار می رود (۸). در پژوهش صورت گرفته توسط Mohammadi و همکاران اثر فراکشن های گوناگون این گیاه بر التهاب و درد بررسی و ثابت شد. در این تحقیق مشخص شد که قدرت مهاری عصاره کلروفرمی و متانولی آن دارای بالاترین اثر ضد دردی است (۹). هم چنین اثر ضد میکروبی بالای عصاره اتانولی آن بر باکتری هایی مانند *Escherichia coli* ثابت شده است (۱۰). به علاوه در سال ۲۰۱۳ اثر عصاره این گیاه بر سرطان معده و تأثیر منفی آن بر دودمان سلول های مربوطه مشاهده شد (۱۱). در این پژوهش با توجه به مواد

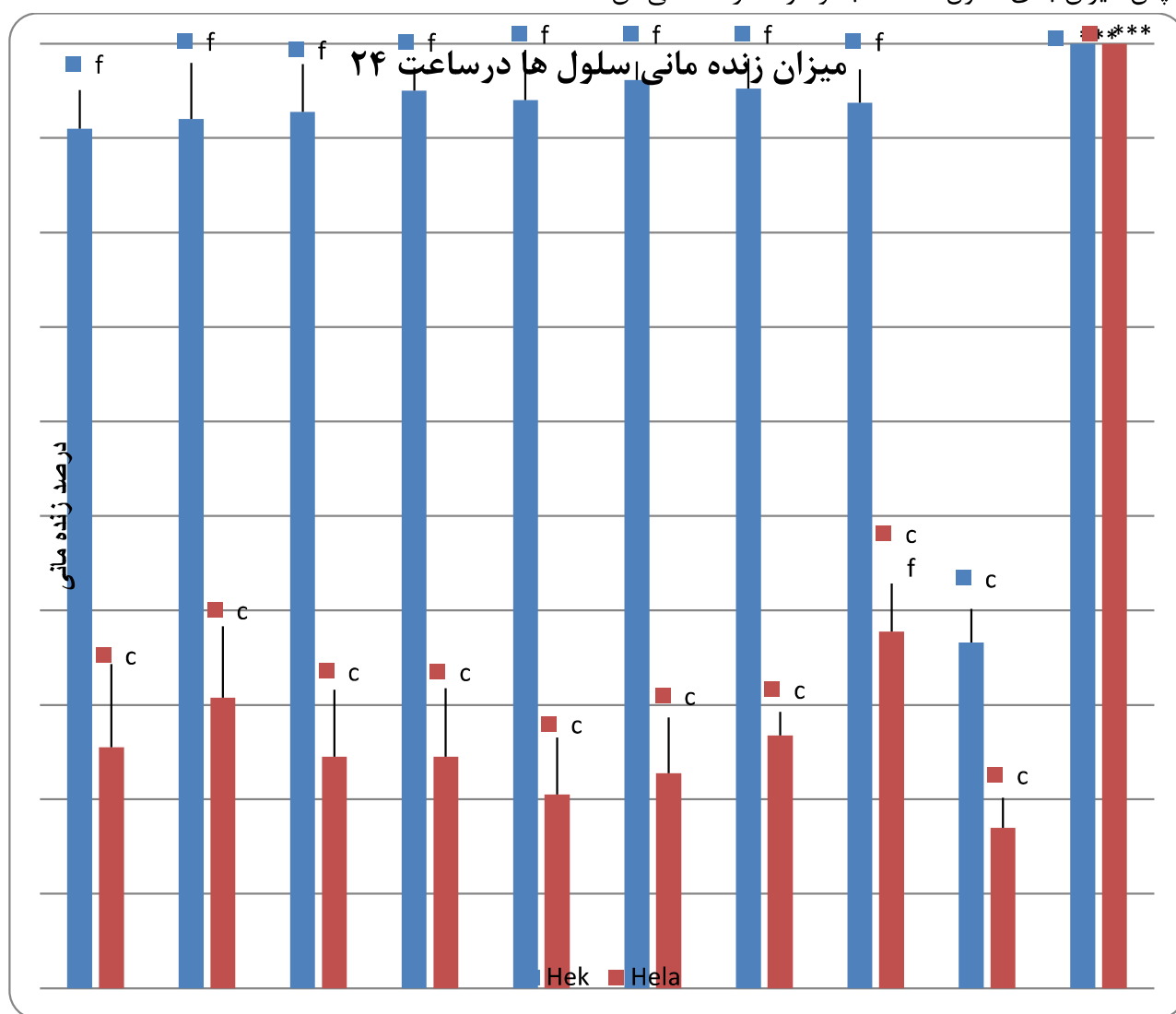
این کار از دستگاه pH متر و محلول یک مولار NaOH و HCL که پیش تر استریل شده اند بهره برده شد. در مرحله بعدی به محلول آنتی بیوتیک افزوده شد و حجم آن تا ۹۰٪ مقدار نهایی که مدنظر است رسانیده شد. چون در نهایت موادی مانند سرم به محلول فوق الذکر اضافه خواهند شد حجم محلول در این مرحله کم تر از میزان نهایی در نظر گرفته می شود. سرم جنین گاوی استریل، پس از فیلتراسیون به محیط کشت اضافه می شود. سپس محلول با کمک سرنگ و فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتراسیون شد. این عمل در زیر هود لامینار انجام شد. در پایان معادل حجم باقی مانده به آن سرم جنین گاوی اضافه می شود تا حجم پایانی مورد نظر به دست آید. برای نگهداری محیط کشت آن ها در ظروف شیشه ای با درب های پیچی که پیش تر استریل و اتوکلاو شده اند در یخچال ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد (۱۵). برای پاساژ سلولی پس از بررسی سلول های داخل فلاسک از لحاظ عدم آلودگی و تراکم تقریبی سه تا چهار میلیون سلول در هر ویال، محیط کشت داخل فلاسک به ظرف ضایعات زیر هود لامینار منتقل کرده، فلاسک با تریپسین شستشو شد تا در مرحله بعد تریپسین بهتر عمل نماید. برای آزادسازی سلول ها محلول ۰/۲۵٪ تریپسین/EDTA را که در بافر PBS حل شده است به ازای هر  $cm^2$  ۰/۲۵ یک ml به فلاسک اضافه شد. با تکان های منظم و افقی فلاسک امکان ترکیب محلول با تمام سلول ها فراهم گردید. پس از ۳-۵ دقیقه انکوبه کردن فلاسک در دمای  $37^{\circ}C$  و اثر آنزیم روی سلول ها عمل ضربه زدن به آهستگی انجام داده شد. در این مرحله سلول ها مجزا و گرد دیده می شوند. در مرحله بعد به سوسپانسیون داخل فلاسک در حدود ۲-۵ ml محیط کشت حاوی سرم افزوده تا آنزیم تریپسین به وسیله پروتئین های موجود در سرم غیرفعال شود. محلول سانتریفیوژ شده و محلول رویی دور ریخته کمی محیط کشت افزوده، با پیپتاز سوسپانسیون یکنواخت شود. با در نظر گرفتن غلظت تقریبی ۳ تا ۴ میلیون سلول برای هر ویال سوسپانسیون به سه بخش مساوی تقسیم و به سه فلاسک منتقل شد و با افزودن محیط کشت حاوی سرم حجم نهایی به ۵ ml رسانده شد. فلاسک ها به دمای  $37^{\circ}C$ ،  $CO_2$  ۵٪ و رطوبت ۹۵٪ منتقل شد تا پاساژ یک به سه

صورت پذیرد (۱۶). برای تمامی فعالیت های آزمایشگاهی مربوط به کشت سلول در آزمایشگاه از قبیل انجماد، پاساژ و تست MTT شمارش سلول ها ضروری است. در این پژوهش از روش لام های هموسیتمتر استفاده شد (۱۷). روش MTT شیوه ای مبتنی بر اسپکتروفتومتری است که برای تشخیص زنده بودن سلول ها به کار می رود. سنجش MTT بر پایه احیا و شکسته شدن کریستال های زرد رنگ تترازولیوم به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز است که منجر به کریستال های آبی نامحلول می شود (۱۸). جهت دریافت بهترین نتیجه نمونه برداری باید در مرحله لگاریتمی کشت سلولی انجام شود. در پایان این تست جذب نوری در طول موج ۴۰۰-۶۳۰ nm را با دستگاه الیزا ریدر قرائت کرده و میزان جذب نوری به صورت کمی اندازه گیری می شود. برای آزمایش های عوامل مؤثر بر درمان سرطان نیز با تیمار سلول های سرطانی با داروها و یا موادی که موجب تشدید یا کاهش رشد آن ها می شوند و سنجش میزان مرگ یا زنده ماندن و رشد و تکثیر آن ها با روش MTT می توان میزان اثرهای مثبت یا منفی عوامل ذکر شده را مورد بررسی قرار داد (۱۹). در این آزمایش پس از کشت سلول های هک و هلا، تیمار و مجاورت با عصاره متانولی کاکوتی کوهی در دوزهای  $1/0$ ،  $1$ ،  $10$ ،  $50$ ،  $100$ ،  $150$ ،  $200$ ،  $1000$   $\mu g/ml$  صورت پذیرفت و در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سنجش MTT انجام شد (۲۰، ۲۱). برای گروه کنترل مثبت نیز از داروی کلشی سین با دوز  $5/0$   $\mu g/ml$  استفاده شد (۲۱). نتایج حاصله از این پژوهش بر پایه میانگین تکرار سه باره آزمایش ها صورت گرفت. جهت تجزیه تحلیل داده ها از آزمون آماری t-test و نرم افزار SPSS 21 و برای رسم نمودارها از برنامه Excel استفاده شد. سطح معنی داری نتایج  $P < 0/05$  تعیین گردید (۲۲).

### یافته ها

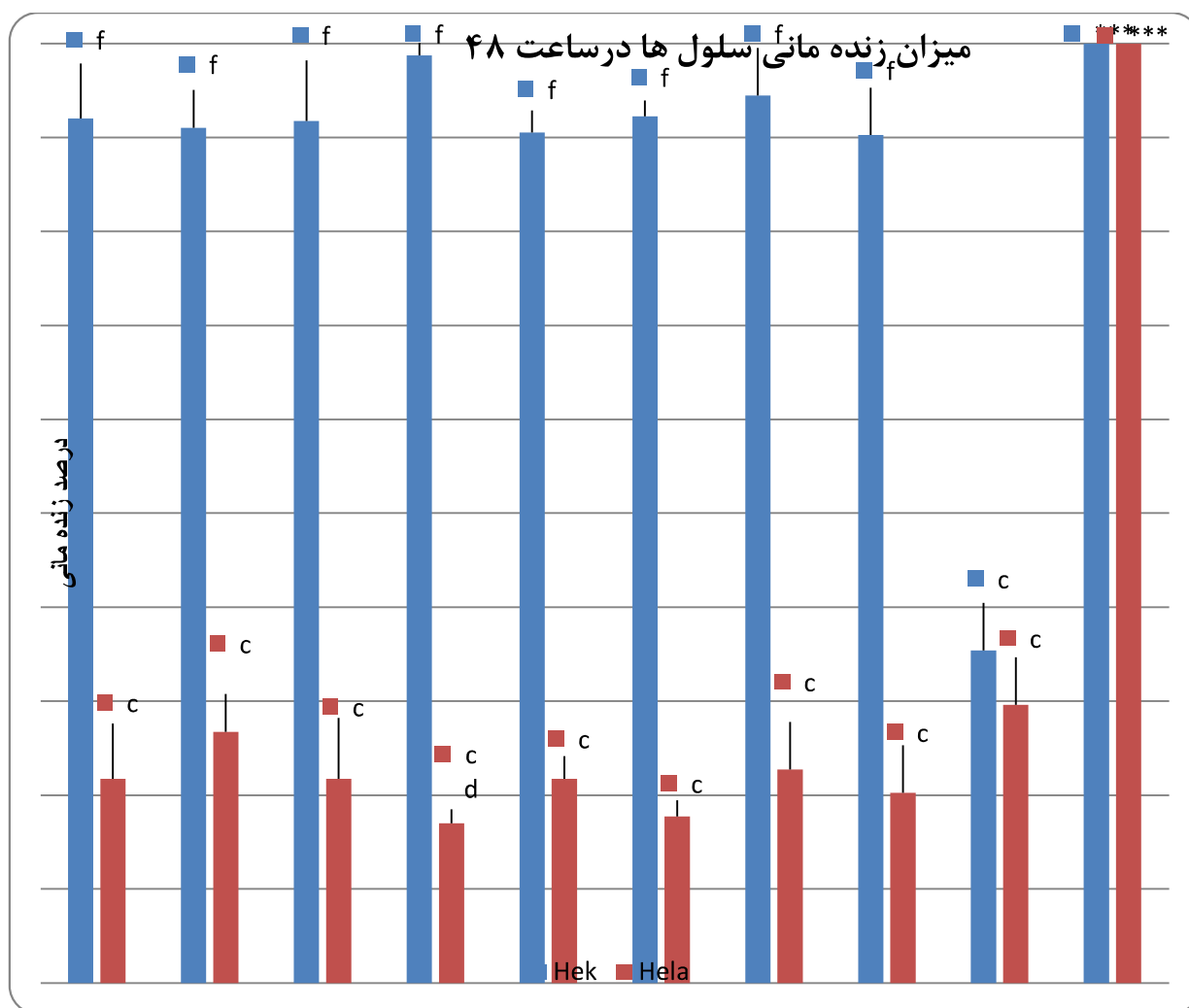
برای بررسی اثر عصاره متانولی برگ گیاه کاکوتی بر میزان زنده بودن سلول های سرطانی هلا و سالم هک از روش رنگ آمیزی آلی MTT استفاده شد. اثر دوزهای مختلف عصاره کاکوتی در ۳ زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی سلول های سرطانی و نرمال سنجیده شد. نتایج جذب نوری قرائت شده

توسط الایزا ریدر حاصل از آزمون MTT گردآوری شده  
اندازه گیری شد (۲۲).



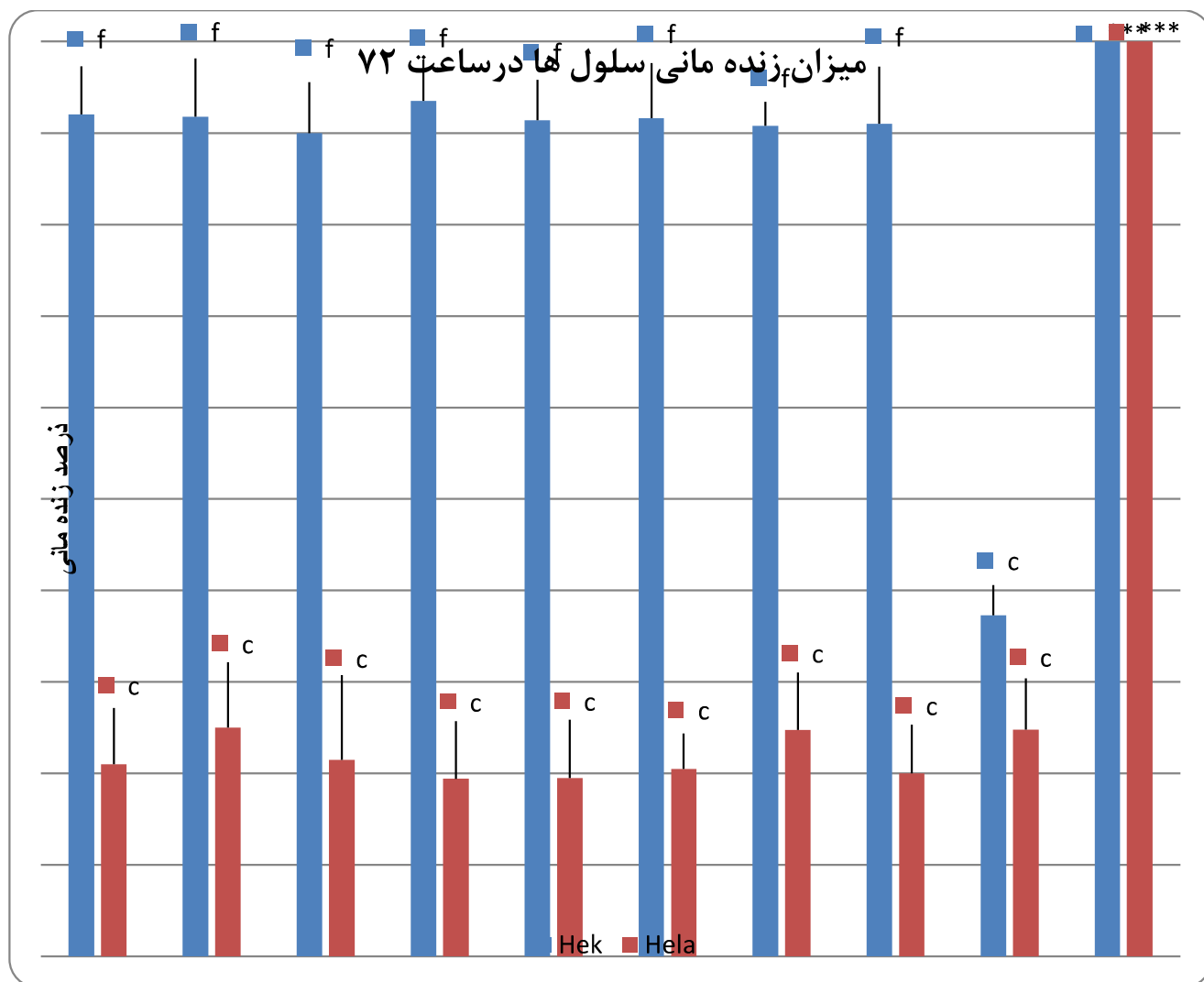
نمودار ۱: میزان مانده سلول های نرمال Hek و سلول های سرطانی Hela در زمان ۲۴ ساعت

c: اختلاف معنی دار با گروه کنترل ( $P < 0.001$ ), f: اختلاف معنی دار با گروه کلشی سین ( $P < 0.001$ )



نمودار ۲: میزان زنده مانی سلول های نرمال Hek و سلول های سرطانی Hela در زمان ۴۸ ساعت

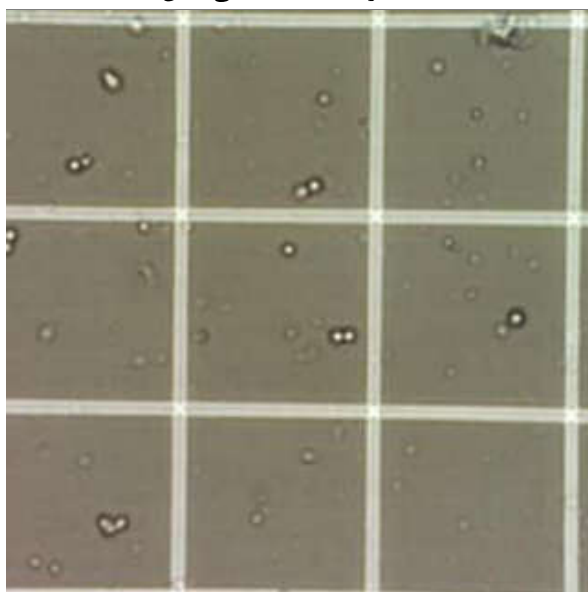
c: اختلاف معنی دار با گروه کنترل ( $P < 0.001$ ), d: اختلاف معنی دار با گروه کلشی سین ( $P < 0.05$ ), f: اختلاف معنی دار با گروه کلشی سین ( $P < 0.001$ )



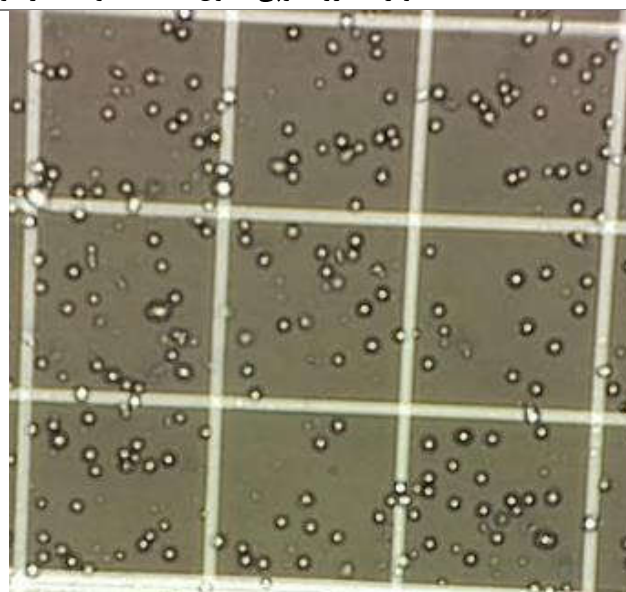
نمودار ۳: میزان زنده مانی سلول های نرمال Hek و سلول های سرطانی Hela در زمان ۷۲ ساعت

c: اختلاف معنی دار با گروه کنترل ( $P < 0.001$ ), f: اختلاف معنی دار با گروه کلشی سین ( $P < 0.001$ )

تصاویر میکروسکوپی سلول های هک و هلا در دوز مؤثر  $100 \mu\text{g/ml}$  ۱۰۰ ساعت ۴۸ در مقایسه با کلشی سین

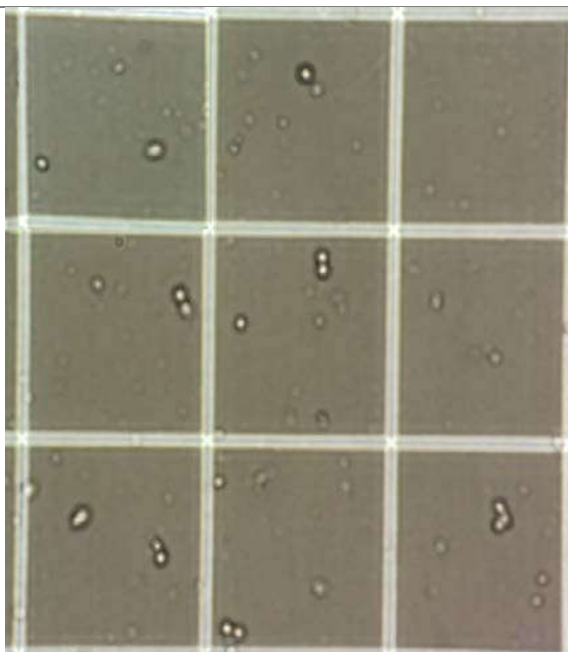


تصویر ۲: سلول هلا تحت تأثیر دوز  $100 \mu\text{g/ml}$  عصاره کاکوتی کوه از ۴۸ ساعت

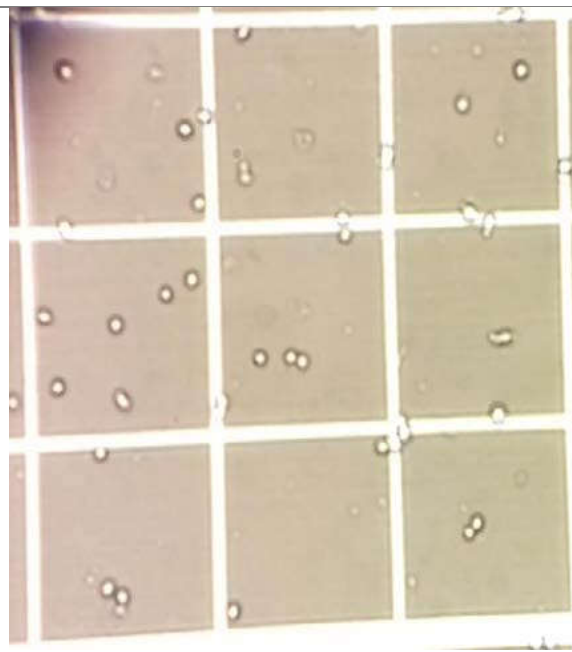


تصویر ۱: سلول هک تحت تأثیر دوز  $100 \mu\text{g/ml}$  عصاره کاکوتی کوهی پس از ۴۸ ساعت





تصویر ۴: سلول هلا تحت تأثیر کلشی سین پس از ۴۸ ساعت



تصویر ۳: سلول هک تحت تأثیر کلشی سین پس از ۴۸ ساعت

با گروه کلشی سین دیده شد که زنده ماننی کمتر از گروه کلشی سین بود. بر پایه داده های نمودار ۳ و مشاهده درصد زنده ماننی سلول های دودمان Hela پس از ۷۲ ساعت در تمامی دوزهای عصاره گیاهی کاهش زنده ماننی سلول های سرطانی دیده شد و میزان این تأثیر در برخی دوزها بیشتر از گروه کلشی سین بود ولی در هیچ کدام اختلاف معنی دار با گروه کلشی سین دیده نشد. با ارزیابی و نتیجه گیری از درصد زنده ماننی سلول دودمان Hela پس از ۳ زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین کاهش در ۴۸ ساعت دیده شد که این میزان در دوز  $100 \mu\text{g}$  بیش تر و دارای اختلاف معنی دار نسبت به گروه کلشی سین در سطح  $0.05$  بود.

بر طبق نمودار ۱ و مشاهده درصد زنده ماننی سلول های دودمان Hek پس از ۲۴ ساعت در تمامی دوزهای عصاره گیاهی کاهش زنده ماننی سلول های سرطانی در حد محدودی دیده شد و میزان کاهش در هیچ کدام از گروه ها به اندازه گروه کنترل مثبت یعنی کلشی سین نبود. ضمن آن که در این دوزها در سطح معنی داری  $P < 0.001$  با گروه کلشی سین اختلاف معنی دار دیده شد. با بررسی درصد زنده ماننی سلول های دودمان Hek پس از ۴۸ ساعت در تمامی دوزهای عصاره گیاهی کاهش زنده ماننی سلول های سرطانی به غیر از سه دوز  $10$ ،  $50$  و  $100$  با اختلاف معنی داری دیده شد البته میزان کاهش در هیچ کدام از گروه ها به اندازه گروه کنترل مثبت یعنی کلشی سین نبود و در این دوزها در سطح معنی داری

در تصاویر ۱ و ۲ شاهد اثر عصاره کاکوتی با دوز مؤثر  $\mu\text{g/ml}$  در ۱۰۰ ساعت ۴۸ بر سلول های نرمال هک و سرطانی هلا می باشیم. میزان سلول های زنده در مورد سلول های نرمال در مؤثرترین دوز عصاره به طرز مشهودی بالا است (تصویر ۱) اما میزان زنده ماننی سلول های سرطانی هلا بسیار پایین بود (تصویر ۲). میزان بالای مرگ و میر سلول ها در هر دو گروه سلول های هک و هلا تحت تأثیر کلشی سین دیده شد (تصاویر ۳ و ۴).

بر طبق نمودار ۱ و بررسی درصد زنده ماننی سلول های دودمان Hela پس از ۲۴ ساعت در تمامی دوزهای عصاره گیاهی کاهش زنده ماننی سلول های سرطانی دیده شد اما این میزان در هیچ کدام از گروه ها به اندازه گروه کنترل مثبت یعنی کلشی سین نبود. ضمن آن که در دوز  $0.1$  تفاوت معنی دار با گروه کلشی سین دیده شد. تمامی گروه هایی که عصاره گیاه را دریافت کرده بودند به غیر از دوز  $0.1 \mu\text{g}$  از لحاظ آماری تفاوتی با هم نداشتند. گروه کلشی سین در ۲۴ ساعت نسبت به همه گروه ها عملکرد بهتری داشت. دوز  $10$  و  $50$  نسبت به سایر دوزها به میزان بیشتری از زنده ماننی سلول های سرطانی جلوگیری کرده بود. بر طبق نمودار ۲ و با بررسی درصد زنده ماننی سلول های دودمان Hela پس از ۴۸ ساعت در تمامی دوزهای عصاره گیاهی کاهش زنده ماننی سلول های سرطانی دیده شد و میزان این تأثیر در همه دوزها بیشتر از گروه کلشی سین بود اگرچه تنها در دوز  $100 \mu\text{g}$  اختلاف معنی دار



۰/۰۰۱ < P با گروه کلشی سین هم اختلاف معنی دار دیده شد. دوز ۱۰۰ µg دارای بیشترین میزان زندهمانی در گروههای تیمار بود.

با بررسی درصد زندهمانی سلولهای دودمان Hek پس از ۷۲ ساعت در تمامی دوزهای عصاره گیاهی کاهش زندهمانی سلولهای نرمال به غیر از سه دوز ۰/۱، ۱۰ و ۱۰۰ با اختلاف معنی داری دیده شد البته میزان کاهش در هیچ کدام از گروهها به اندازه گروه کنترل مثبت یعنی کلشی سین نبود و در این دوزها در سطح معنی داری ۰/۰۰۱ < P با گروه کلشی سین هم اختلاف معنی دار دیده شد. با ارزیابی و نتیجه گیری از درصد زندهمانی سلولهای دودمان Hek پس از ۳ زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بیشترین کاهش در ساعت ۴۸ دیده شد. نکته قابل توجه عدم اختلاف معنی دار همه دوزها با گروه کنترل در هر سه زمان آزمایش MTT بود.

#### مقایسه دوز مؤثر عصاره متانولی برگ کاکوتی کوهی در

#### سلولهای سرطانی Hela و سلولهای سالم Hek

با مشاهده نتایج در هر سه نمودار مشاهده شد که تنها در ساعت ۴۸ و دوز ۱۰۰ شاهد بیشترین میزان مرگ و میر سلولهای سرطانی بودیم تا حدی که این دوز در این ساعت دارای اختلاف معنی دار با گروه کلشی سین شد. در حالی که میزان زندهمانی سلولهای نرمال در این دوز و این ساعت دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل نبودند ضمن آن که از لحاظ عددی هم در مجموع هر سه زمان دارای بالاترین درصد زندهمانی در دودمان سلولهای هک بود. با توجه به بالاترین میزان زندهمانی این دوز در دودمان سلولهای هک و پایینترین میزان زندهمانی سلولهای سرطانی در این دوز و ساعت، دوز ۱۰۰ µg/ml در ساعت ۴۸ در سطح معنی داری ۰/۰۰۱ < P به عنوان مؤثرترین دوز این عصاره تشخیص داده شد.

#### بحث و نتیجه گیری

در این پژوهش اثرهای درمانی گیاه کاکوتی کوهی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصله حاکی از آن بود که عصاره متانولی برگهای گیاه کاکوتی کوهی دارای تأثیر مثبت بر روند مرگ و میر سلولهای سرطانی هلا هستند. تاکنون اثرهای

ضدسرطانی مختلفی از گیاهان گزارش و اثبات شده است اما، در رابطه با *Ziziphora tenuior* مطالعه ای انجام نشده است. به همین دلیل به بررسی اثرهای ضدسرطانی گونه های دیگری از جنس *Ziziphora* اشاره می شود. بسیاری از آنها دارای مکانیسم تأثیرگذاری مشابه بوده و تفاوت آنها بر پایه مواد مؤثره متفاوت و میزان و چگونگی تأثیرگذاری آن بر روی رده های سلولی خاص است. در سال ۲۰۱۳ در پژوهشی اثر سمی چهار گیاه دارویی از جمله کاکوتی (*Ziziphora clinopodioides Lam*) بر روی سرطان روده با استفاده از لاین سلولی AGS و روش MTT مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاکی از اثر چشمگیر ضدسرطانی گیاه کاکوتی بود ضمن آن که نسبت به سایر گیاهان شرکت داده شده در آن تحقیق نیز بهترین اثر را داشت (۲۳). نتایج پژوهش ذکر شده همسو با نتایج دریافتی در تحقیق حاضر است. در پژوهشی دیگر در سال ۲۰۱۶ نیز ترکیبهای شیمیایی و اثرهای ضدسرطانی بخشهای هوایی گیاه کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides Lam*) مورد بررسی قرار گرفت. اثرهای سمی این گیاه بر روی لاینهای سلولی سرطان روده (HT-29)، سرطان سینه (T-47D)، لوکمی (K-562) و فیبروبلاست جنین موش با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده حاکی از اثر بازدارندگی و سمی فوق العاده ترکیبهای موجود در گیاه کاکوتی بر این لاینهای سلولی سرطانی بود که با نتایج به دست آمده از پژوهش ما همخوانی دارد. در این پژوهش عمده ترین ترکیبهای استخراج شده پولگون (۲۴٪)، منتول (۱۴٪) و منتون (۹٪) بود (۲۴). در تحقیقی اثر عصاره آویشن کرمانی (*Thymus carmanicus Jalas*) بر رده سلولهای سرطانی هلا و رده سلولهای نرمال MRC5 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاکی از اثرهای ضدسرطانی این گیاه بود (۲۵). اثر ضدسرطانی کورکومین که ماده اصلی و مؤثره گیاه زردچوبه است نیز در تحقیقات فراوان ثابت شده، به تازگی اثرهای آن بر بیان ژنهای مؤثر در سرطان نیز گزارش شده است (۲۶). در بررسی اثر عصاره اتانولی آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) بر روی سرطان پروستات در موشهای صحرایی اثرهای ضدسرطانی آن به ویژه بر گسترش توده های سلولهای مذکور نمایان شد. این اثرها با میزان دوز به کار رفته نیز مرتبط بود. حتی در

پژوهشی دیگر به صورت *in vivo* اثر منفی و باز دارنده آن بر کارسینومای اپیتلیومی ناحیه سر مشاهده شد (۲۷). با توجه به هم خانواده بودن این گیاه با کاکوتی کوهی چنین اثرهایی برای این گیاه نیز دور از انتظار نیست. حتی عصاره گیاه آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) اثر مهمی بر ضایع ها و بافت های پیش سرطانی دارد. این اثرها به تیمول و کارواکرول نسبت داده می شود (۲۸). همین ترکیب ها در کاکوتی نیز در حد قابل قبولی وجود دارند (۲۹). از دیگر ترکیب های مهم در این گروه از گیاهان، فلاوونوئیدها هستند. اثر ضدسرطانی این ترکیب ها بر کارسینومای ریه در موش دیده شده و این ترکیب ها نیز در کاکوتی کوهی به میزان بالایی وجود دارند (۳۰). اثرهای آنتی اکسیدانی عصاره این گیاهان نیز نقش مهمی در درمان و جلوگیری از گسترش سرطان و البته بسیاری بیماری های دیگر دارد (۱۱). در پژوهش های جداگانه اثرهای آنتی میکروتوبولی ترکیب هایی مهم مانند پولگون، لینالول و ترپنین به ویژه پولگون که مشترک با بسیاری از گیاهان است ثابت شده است. این ترکیب های مولکولی موجب افزایش سرعت تشکیل میکروتوبول از دایمرهای توبولین می- شوند که نتیجه آن جلوگیری از دپلی مریزاسیون میکروتوبول ها است. این اتفاق از تثبیت میکروتوبول ها در سلول جلوگیری کرده و در نهایت موجب از بین رفتن اسکلت سلولی انعطاف- پذیر در سلول شده که در چرخه های مهمی هم چون میتوز بسیار حیاتی است. چنین سلول هایی با وقفه در رشد و تقسیم خود پس از مدتی دچار نقصان و مرگ سلولی می- شوند (۳۱، ۳۳). در پژوهش های متعددی ثابت شده که آنزیم های سیکلواکسیژناز و استرس اکسیداتیو در جریان چرخه های مختلف سلولی مانند رشد و نمو و تکثیر موجب ظهور نارسایی در این فرآیندها، اختلال و سرطان زایی می شوند. برای نمونه آنزیم سیکلواکسیژناز با افزایش فعالیت خود اثر بازدارندگی بر آپوپتوز سلول های سرطانی دارد. بدیهی است گیاهانی که بتوانند این عوامل را مهار کنند نقش مهمی در جلوگیری از ابتلا و گسترش سرطان خواهند داشت. در پژوهش های متعدد در مورد گیاهان تیره نعناعیان که کاکوتی نیز در این زمره قرار دارد وجود عواملی که موجب بهبود ظرفیت اکسیداتیو می- شوند به اثبات رسیده است (۳۳). اثرهای آنتی اکسیدانی گیاه با مهار آنزیمی و هم چنین جلوگیری از تشکیل ROS القا می-

شود. فلاوونوئیدهای موجود در گیاه در این امر نقش فراوانی دارند. آن ها به وسیله آنزیم هایی هم چون گلوکاتیون، منواکسیژناز میکروزمی، NADH اکسیداز و سوکسین اکسیداز میتوکندریایی اثرهای ضدآنتی اکسیدانی خود را نشان می- دهند. در پژوهش هایی که در گذشته صورت گرفته با چندین روش این خاصیت گیاه مورد ارزیابی قرار گرفته است و مشخص شده عصاره متانولی گیاه بالاترین توانایی در فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان می دهد. در خصوص مواد مؤثره در این زمینه فلاوونوئیدها و پلی فنول بسیار مهم هستند (۳۴). از این دست ترکیب ها می توان به لیمونن و فنول اشاره کرد که اثرهای آنتی اکسیدانی بالای آن ها به اثبات رسیده و در گیاه کاکوتی نیز در حد بالایی وجود دارند. از مکانیسم های دیگر تأثیر عصاره گیاهان این خانواده بر سلول های سرطانی تأثیر بر مورفولوژی این سلول ها هستند. این سلول ها وابسته به سطح هستند اما عصاره گیاهان این خانواده که دارای ترکیب های مشترک و بسیار مشابه با کاکوتی هستند با تأثیر بر نفوذپذیری غشاء سلول ها موجب گرد شدن و رها شدن آن ها از بستر می- شود و همین امر موجب مرگ و جلوگیری از تکثیر آن ها می- شود (۳۵). در صورتی که این اتفاق در دودمان سلول های نرمالی چون MRC<sub>5</sub> رخ نداده و این سلول ها ثبات مورفولوژیک خود را حفظ نموده اند (۲۲). ترکیب های مهم موجود در این گیاه پولگون، لیمونن، لینالول، ترپنین، فنول، کارواکرول و منتون است. اما بیشترین ترکیب ماده مؤثره شناسایی شده در این گیاه پولگون است که بیشترین اثرهای درمانی نیز به آن اختصاص داده شده است (۳۶). پولگون که در گروه مونوترپن ها است دارای بوی خوشی بوده که معطر بودن کاکوتی را به این مونوترپن اکسیژن دار حلقوی نسبت می دهند. ترپن ها با نفوذ به ترکیب های لیپیدی غشاء سلول ها موجب بهم ریختگی دیواره سلول شده و در نتیجه با واپاشی سیتوپلاسم و دنا تورا سیون ترکیب های پتیدی مرگ سلول مربوطه را رقم می زنند (۳۷). در پژوهشی اثرهای ضدباکتریایی آن اثبات و چند برابر نیستاتین گزارش شده است. این اثرها از طریق واکنش با غشاء سلول های متخاصم و تغییر در نفوذ پذیری آن ها ممکن می شود. بنابراین موجب مرگ بسیاری از سلول ها نظیر باکتری های گرم منفی شده و با خروج لیپو ساکاریدها و افزایش نفوذپذیری غشاء زمینه نابودی این سلول-

بالای رادیکال های آزاد، فعالیت آنزیم هایی نظیر سیکلواکسیژناز است. به احتمال عصاره این گیاه با از بین بردن این شرایط مساعد برای سلول های سرطانی زمینه را برای مرگ و میر آن ها و زندهمانی بیش تر سلول های سالم هک فراهم نموده است.

ها فراهم می شود. این گیاه بر باکتری های اشریشیاکلای و سودوموناس اثرهای بازدارندگی زیادی دارد و به این دلیل در درمان ناراحتی های گوارشی میکروبی بسیار مهم است (۳۸،۳۹). وجود ماده لیمونن در این گیاه نیز در خواص ضدسرطانی آن بسیار مهم می تواند باشد. لیمونن با درصد بالای خاصیت آنتی اکسیدانی خود در پیشگیری از سرطان، رشد تومور و همچنین جلوگیری از متاستاز نقش مهمی را دارد (۴۰،۴۱). ترکیب آلفا پینن نیز بر پایه مکانیسم های گفته شده هر سه ویژگی ضدباکتریایی، ضدالتهابی و ضدسرطانی را از خود نشان داده که در چندین پژوهش به اثبات رسیده است (۳۱،۴۲). همچنین در پژوهشی اثرهای سمی این گیاه بر رده سلول های سرطانی AGS معده به میزان بالای ۸۸٪ ثابت شده است (۹). در پژوهش یاد شده اثر ضدسرطانی عصاره چهار گیاه زعفران، زنجبیل، آلوورا و کاکوتی مورد بررسی قرار گرفت که اثر ضدسرطانی کاکوتی بسیار قابل توجه بود. با توجه به اثرهای سیتوتوکسیک این عصاره بر رده سلول سرطانی AGS احتمال بروز این اثرهای از بین برنده بر سایر رده های سلول های سرطانی نیز وجود دارد (۱۱).

با توجه به نتایج این پژوهش مشاهده شد که عصاره متانولی برگ های گیاه کاکوتی کوهی بر میزان زندهمانی سلول های سرطانی هلا اثر معنی داری را دارد و این میزان در هر سه زمان اندازه گیری و دوزهای مختلف مشاهده شد. همچنین تأثیر این عصاره بر سلول های سالم هک نیز مورد بررسی قرار گرفت. میزان تأثیر عصاره بر درصد زندهمانی این سلول ها به اندازه سلول های هلا نبود و میزان زندهمانی سلول های سالم بسیار بالاتر از سلول های سرطانی بود. با توجه به نتایج پژوهش هایی که در گذشته صورت گرفته و تحقیق حاضر، گمان می رود این ترکیب ها با تخریب و اثر منفی بر غشاء سلول های سرطانی موجبات مرگ آن ها را فراهم نموده اند. کاهش فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز نیز موجب افزایش آپوپتوز در رده سلول های سرطانی هلا شده است. تغییرهای مورفولوژیک و سست کردن پیوند سلول های سرطانی از دیگر دلایل احتمالی کاهش شدید درصد زندهمانی آن ها می تواند باشد. اما عدم مشاهده این تأثیرها در سلول های سالم هک می تواند بنا به این دلیل باشد که چرخه زیستی سلول های سرطانی بسیار منتج از درصد

1. Balunas MJ, Kinghorn AD. Drug discovery from medicinal plants. Life sciences. 2005 Dec 22;78(5):431-41.
2. Ghafari H, Yasa N, Mohammadirad A, Dehghan G, Zamani MJ, Nikfar S, Khorasani R, Minaie B, Abdollahi M. Protection by *Ziziphora clinopoides* of acetic acid-induced toxic bowel inflammation through reduction of cellular lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. Human & experimental toxicology. 2006 Jun;25(6):325-32.
3. Carović-Stanko K, Petek M, Martina G, Pintar J, Bedeković D, Ćustić MH, Šatović Z. Medicinal Plants of the Family Lamiaceae as Functional Foods—a Review. Czech journal of food sciences. 2016 Jan 1;34(5):377.
4. Azadmehr A, Mosalla S, Hajiaghache R, Shahnazi M. Immunomodulatory effects of *Ziziphora tenuior* L. extract on the dendritic cells. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014 Dec;22(1):63.
5. Parija m. Soft tissue sarcoma recurrence in flap donor site-case report. University Journal of Surgery and Surgical Specialities. 2018 Apr 5;4(2).
6. Naeini A, Khosravi A, Tadjbakhsh H, Ghazanfari T, Yaraee R, Shokri H. Evaluation of the immunostimulatory activity of *Ziziphora tenuior* extracts. Comparative clinical pathology. 2010 Oct 1;19(5):459-63.
7. Nasab FK, Khosravi AR. Ethnobotanical study of medicinal plants of Sirjan in Kerman Province, Iran. Journal of ethnopharmacology. 2014 May 28;154(1):190-7.
8. Fumagalli I, Penel N, Wacrenier A, El Bedoui S, Adenis A. Advanced Abrikossoff tumour: A metastatic or a multifocal malignancy?. Acta Oncologica. 2012 Jan 1;51(1):133-5.
9. Dihazi H, Dihazi GH, Nolte J, Meyer S, Jahn O, Müller GA, Engel W. Multipotent adult germline stem cells and embryonic stem cells: comparative proteomic approach. Journal of proteome research. 2009 Oct 27;8(12):5497-510.
10. Aliakbarlu J, Shameli F. In vitro antioxidant and antibacterial properties and total phenolic contents of essential oils from *Thymus vulgaris*, *T. kotschyanus*, *Ziziphora tenuior* and *Z. clinopodioides*. Turkish Journal of Biochemistry/Türk Biyokimya Dergisi. 2013 Dec 1;38(4).
11. Harris IS, Treloar AE, Inoue S, Sasaki M, Gorrini C, Lee KC, Yung KY, Brenner D, Knobbe-Thomsen CB, Cox MA, Elia A. Glutathione and thioredoxin antioxidant pathways synergize to drive cancer initiation and progression. Cancer cell. 2015 Feb 9;27(2):211-22.
12. Azwanida NN. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. Med Aromat Plants. 2015 Jul;4(196):2167-0412.
13. Schottenfeld D, Fraumeni Jr JF, editors. Cancer epidemiology and prevention. Oxford University Press; 2006 Aug 24.
14. Maiorano G, Sabella S, Sorce B, Brunetti V, Malvindi MA, Cingolani R, Pompa PP. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein–nanoparticle complexes and influence on the cellular response. ACS nano. 2010 Nov 17;4(12):7481-91.
15. Gaddy VT, Barrett JT, Delk JN, Kallab AM, Porter AG, Schoenlein PV. Mifepristone induces growth arrest, caspase activation, and apoptosis of estrogen receptor-expressing, antiestrogen-resistant breast cancer cells. Clinical Cancer Research. 2004 Aug 1;10(15):5215-25.

16. Nasri, S.. Antinociceptive and Anti-inflammatory effects of Hydroalcoholic extract of aerial parts of *Thymus carmanicus* in male mice. *Journal of Paramedical Sciences*. 2018, 9(1), pp.42-50.
17. Tilg H, Adolph TE, Gerner RR, Moschen AR. The intestinal microbiota in colorectal cancer. *Cancer cell*. 2018 Jun 11;33(6):954-64.
18. Hadi MY, Mohammed GJ, Hameed IH. Analysis of bioactive chemical compounds of *Nigella sativa* using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2016 Feb 29;8(2):8-24.
19. Vickers A. Botanical medicines for the treatment of cancer: rationale, overview of current data, and methodological considerations for phase I and II trials. *Cancer investigation*. 2002 Jan 1;20(7-8):1069-79.
20. Navaderi M, Gholamhoseinpour F, Bateni K. The Effect of *Ziziphora Tenure* Plant Extraction on MRSA Bacteria in Urinary Tract Infection *Jacobs Journal of Nephrology and Urology*. 2015, 2 (4).
21. Jalilian S. The effect of colchicine on the pathways of apoptosis in prostate cancer cell lines pc3. 2016, (Doctoral dissertation, University of Zabol).
22. Gudarzi H, Salimi M, Irian S, Amanzadeh A, Mostafapour Kandelous H, Azadmanesh K, Salimi M. Ethanolic extract of *Ferula gummosa* is cytotoxic against cancer cells by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Natural product research*. 2015 Mar 19;29(6):546-50.
23. Ghazanfari T, Yaraee R, Shams J, Rahmati B, Radjabian T, Hakimzadeh H. Cytotoxic effect of four herbal medicines on gastric cancer (AGS) cell line. *Food and agricultural immunology*. 2013 Mar 1;24(1):1-7.
24. Yousefbeyk F, Tabaside J, Ostad SN, Salehi Sourmaghi MH, Amin GR. Investigation of chemical composition and cytotoxic activity of aerial parts of *Ziziphora clinopodioides* Lam. *Research Journal of Pharmacognosy (RJP)*. 2016 Jan 1;3(2):47-51.
25. Hajializadeh Z, Nasri S, Kaeidi A, Sheibani V, Rasoulia B, Esmaeili-Mahani S. Inhibitory effect of *Thymus carmanicus* Jas on hyperglycemia-induced apoptosis in in vitro and in vivo models of diabetic neuropathic pain. *Journal of ethnopharmacology*. 2014 May 14;153(3):596-603.
26. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life sciences*. 2006 Mar 27;78(18):2081-7.
27. Berrington D, Lall N. Anticancer activity of certain herbs and spices on the cervical epithelial carcinoma (HeLa) cell line. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012;2012.
28. Ozturk S, Ercisli S. The chemical composition of essential oil and in vitro antibacterial activities of essential oil and methanol extract of *Ziziphora persica* Bunge. *Journal of ethnopharmacology*. 2006 Jul 19;106(3):372-6.
29. Salehi P, Sonboli A, Eftekhar F, Nejad-Ebrahimi S, Yousefzadi M. Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (B OISS.) R ECH. f. from Iran. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2005;28(10):1892-6.
30. Surmaghi, M.S., Amin, Y.A.G. and Mahmoodi, Z. Survey of Iranian plants for saponins alkaloids flavonoids and tannins. IV. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1992. 2(2-3), pp.1-11.



31. Hough CD, Sherman-Baust CA, Pizer ES, Montz FJ, Im DD, Rosenshein NB, Cho KR, Riggins GJ, Morin PJ. Large-scale serial analysis of gene expression reveals genes differentially expressed in ovarian cancer. *Cancer Research*. 2000 Nov 15;60(22):6281-7.
32. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology letters*. 2006 Jan 5;160(2):171-7.
33. Triantaphyllou, Georgios Blekas, Dimitrios Boskou K. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. *International journal of food sciences and nutrition*. 2001 Jan 1;52(4):313-7.
34. Dakah A, Zaid S, Suleiman M, Abbas S, Wink M. In vitro propagation of the medicinal plant *Ziziphora tenuior* L. and evaluation of its antioxidant activity. *Saudi journal of biological sciences*. 2014 Sep 1;21(4):317-23.
35. Steimer KS, Packard R, Holden D, Klagsbrun M. The serum-free growth of cultured cells in bovine colostrum and in milk obtained later in the lactation period. *Journal of cellular physiology*. 1981 Nov;109(2):223-34.
36. Olaku O, White JD. Herbal therapy use by cancer patients: a literature review on case reports. *European journal of cancer*. 2011 Mar 1;47(4):508-14.
37. D'Ambro E, Schobesberger S, Lopez-Hilfiker F, Shilling JE, Lee BH, Thornton JA. Molecular characterization and volatility evolution of alpha-pinene ozonolysis SOA during isothermal evaporations. In AGU Fall Meeting Abstracts 2017 Dec.
38. Najafi KR, Bagher M, Shahram BT. Effect of essential oil and extract of *Ziziphora clinopodioides* on yoghurt starter culture activity. *World Applied Sciences Journal*. 2007;2(3):194-7.
39. Joudi L, Bibalani GH. Exploration of medicinal species of Fabaceae, Lamiaceae and Asteraceae families in Ilkhji region, eastern Azerbaijan Province (northwestern Iran). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2010 Jun 4;4(11):1081-4.
40. Amini-Shirazi N, Hoseini A, Ranjbar A, Mohammadirad A, Khoshakhlagh P, Yasa N, Abdollahi M. Inhibition of tumor necrosis factor and nitrosative/oxidative stresses by *Ziziphora clinopoides* (Kahliti); a molecular mechanism of protection against dextran sodium sulfate-induced colitis in mice. *Toxicology mechanisms and methods*. 2009 Feb 1;19(2):183-9.
41. Hellmann MD, Nathanson T, Rizvi H, Creelan BC, Sanchez-Vega F, Ahuja A, Ni A, Novik JB, Mangarin LM, Abu-Akeel M, Liu C. Genomic features of response to combination immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell*. 2018 May 14;33(5):843-52.
42. Chen W, Liu Y, Li M, Mao J, Zhang L, Huang R, Jin X, Ye L. Anti-tumor effect of  $\alpha$ -pinene on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest. *Journal of pharmacological sciences*. 2015 Mar 1;127(3):332-8.