

## بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره نام هیدرومتانولی حاصل از چای سیاه ارتودکس ایرانی بر سلولهای سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما)

دکتر امیر علاء‌آغایی<sup>۱</sup>، دکتر سپیده وثوق حسینی<sup>۲</sup>، دکتر فرانک مرادی عباس آبادی<sup>۳</sup>، لیلا محمدنژاد<sup>۴</sup>، داریوش شانه بندی<sup>۵</sup>، دکتر بهزاد برادران<sup>۶\*</sup>

- ۱- دانشیار بخش آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ۲- استاد بخش آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ۳- دستیار تخصصی بخش آسیب شناسی دهان، فک و صورت دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ۴- کارشناس پژوهشی مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ۵- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ۶- استادیار گروه ایمونولوژی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

### خلاصه:

**سابقه و هدف:** چای سیاه ارتودکس ایرانی متعلق به خانواده Theaceae می‌باشد که به طور گسترده در جامعه و طب سنتی ایران مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره هیدرومتانولی تام حاصل از چای ارتودکس ایرانی بر سلولهای سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) و القای آپوپتوز بر روی آنها انجام گردید.

**مواد و روش‌ها:** مطالعه بصورت تجربی و آزمایشگاهی بر روی سلول‌های سرطانی KB به عنوان مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما دهانی انجام شد. برگ‌های چای سیاه با روش ماسراسیون به کمک حلال هیدرومتانولی ۷۰ درصد عصاره‌گیری شدند. میزان سمیت و درصد بقای سلولی غلظت‌های مختلف عصاره تام بر روی سلولهای کشت داده شده، در طی ۲۴ ساعت با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. روش الایزا برای مطالعه القای آپوپتوز در زمان ۲۴ ساعت در غلظت‌های IC<sub>50</sub> از عصاره هیدرومتانولی انجام شد. علاوه بر این جهت تایید القای مرگ سلولی آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده، تست الایزا و TUNEL انجام گردید. جهت تجزیه و تحلیل داده‌ها از آزمون ANOVA استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج تست MTT نشان داد که عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی توانایی مهار رشد و خاصیت سایتوتوکسیک در سلولهای سرطانی KB را در تمام غلظت‌ها دارد. در بررسی ۲۴ ساعته غلظت IC<sub>50</sub> برای عصاره هیدرومتانولی برابر با ۱۲/۴ ± ۴۴۶/۰۸ میکروگرم بر میلی لیتر بود و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی در این غلظت ۳۴ درصد گزارش شد. **نتیجه‌گیری:** عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی در تمام غلظت‌ها موجب مهار رشد و مرگ سلول‌های رده سرطانی اسکواموس سل کارسینوم به شکل آپوپتوز می‌شود.

**کلید واژه‌ها:** چای ارتودکس، سمیت سلولی، آپوپتوز، رده سلولی KB، رده سلولی Hela KB

وصول مقاله: ۹۱/۱۲/۶ اصلاح نهایی: ۹۲/۳/۱ پذیرش مقاله: ۹۲/۳/۱۵

غذایی، عادات خوردن و روش زندگی در ارتباط است.<sup>(۱)</sup>

### مقدمه:

درمان مرسوم این سرطان، با شیمی درمانی و جراحی رادیکال و در برخی از موارد، رادیوتراپی است. هنوز با وجود پیشرفت‌های اخیر، درمان‌های پیچیده و ترکیبی، شانس بقای بیماران مبتلا به اسکواموس سل کارسینوما در حد ۵۰ تا ۵۹ درصد باقی مانده است.<sup>(۱،۲)</sup> روش‌های درمان نوین، روش‌های پیشگیری و حتی راهکارهای مختلف تشخیص زود هنگام این بیماری مورد بحث و بررسی قرار گرفته است. یکی از راه‌های

سرطان دهان هشتمین سرطان شایع آقایان و پانزدهمین سرطان شایع در میان خانم‌ها است. تقریباً ۹۴ درصد بدخیمی‌های دهان را کارسینومای سلول سنگفرشی (SCC) تشکیل می‌دهد. متوسط بروز سالیانه و میزان مرگ و میر به طور قابل توجهی در بین نژادها و گروه‌های سنی و جنسی مختلف متفاوت می‌باشد و همچنین بسیاری از انواع سرطان‌ها با سنن

\* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر بهزاد برادران، استادیار گروه ایمونولوژی - مرکز تحقیقات کاربردی دارویی - دانشگاه علوم پزشکی تبریز. تلفن: ۰۹۱۴۴۰۲۰۵۲۶

### مواد و روش‌ها:

این تحقیق به روش تجربی و آزمایشگاهی انجام شد، جهت تهیه عصاره گیاهی، ابتدا چای سیاه توسط آسیاب مکانیکی به پودر کاملاً ریزی تبدیل شده و سپس اقدام به چربی زدایی توسط حلال ان-هگزان با روش ماسراسیون گردید. پس از آن پودر حاصل کاملاً خشک و عاری از حلال گردیده و عمل استخراج توسط حلال هیدرومتانولی ۷۰ درصد صورت گرفت. عصاره گیری سه بار تکرار، و عصاره ها جمع آوری گردیده و نهایتاً توسط Rotary Evaporator در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد کاملاً خشک گردیدند، عصاره خشک تا زمان بکارگیری در فریزر (دمای زیر صفر) نگهداری گردیدند. محلول ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر از آن در محیط Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI1640) حاوی Dimethyl sulfoxide (DMSO) تهیه شد و با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۰۲ میکرومتری استریل شده و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری گردید.<sup>(۱۱)</sup>

### کشت سلول

رده سلولی KB به عنوان مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوم دهانی از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI-1640 (SIGMA, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی FBS و آنتی بیوتیک های پنی سیلین IU 100 بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (Invitrogen USA) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، محیط مرطوب حاوی ۵ درصد CO2 کشت داده شد.<sup>(۱۰)</sup>

### بررسی اثر سایتوتوکسیسیته با روش MTT

اثر سایتوتوکسیک عصاره هیدرومتانولی تام بر روی رده سلولی KB با روش رنگ سنجی، با استفاده از روش (MTT) یا Micro culture tetrazolium test بررسی شد. این تست براساس فعالیت سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول های زنده استوار است، که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می کند،

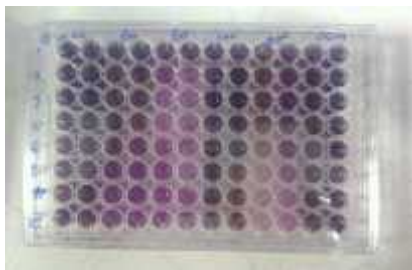
درمان سرطان استفاده از ترکیبات شیمیایی القا کننده آپوپتوز در سلول های سرطانی می باشد.<sup>(۲)</sup>

آپوپتوز مرگ برنامه ریزی شده سلول است، که در خلاف جهت تکثیر سلول تکامل یافته، و در پاسخ به برخی محرک‌ها و همچنین در طی فرایند تمایز مرفولوژیکی رخ می دهد. آپوپتوز همراه با چروکیدگی سلول، تراکم کروماتینی در کنار غشای سلول، چروکیدگی غشای سلول و سر انجام قطعه قطعه شدن سلول به اجسام آپوپتوتیک است.<sup>(۳)</sup>

ترکیبات ضد سرطانی مشتق از گیاهان، با کشف آلکالوئیدونیکا و استخراج ماده سایتوتوکسیک فیلوتوکسین، در سال ۱۹۵۰ آغاز شده است.<sup>(۴)</sup> این ترکیبات طبیعی مانند آلکالوئیدها، تریپن‌ها، لیگنان‌ها و فلاونوئیدها در گیاهان مختلف دارای اثرات ضد توموری مختلفی می باشند.<sup>(۵)</sup>

گیاه چای از خانواده Theaceae، به صورت بوته، درختچه و یا درختی و با نام علمی Thea Sinensis یا Camelia می باشد. قسمت اصلی مورد استفاده ی بوته‌ی چای، برگ آن است که به روش‌های مختلف تبدیل به انواع چای می شود. بواسطه وجود ترکیبات فعال آنتی اکسیدانی (پلی فنل‌ها از جمله کاتسین‌ها) چای، اثرات ضدسرطانی (آنتی موتازنیک) چشمگیری با مصرف آن حاصل می گردد.<sup>(۶)</sup> تحقیقات در این راستا نشان داده است که فعالیت انواع سارکوما (که معمولاً ماهیچه‌ها، استخوانها و سایر نسوج ارتباطی، نسج مئانه، کلیه‌ها، کبد، ریه و طحال را در بر می گیرد) با مصرف چای سرکوب شده و میزان ابتلاء به انواع سرطان‌های دهان، کاهش می یابد.<sup>(۶-۹)</sup>

در طی مطالعاتی که بر روی چای ارتودکس ایرانی انجام گرفته، اثرات ضد باکتریایی این گیاه تایید شده است.<sup>(۱۰)</sup> با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای برای بررسی تاثیر عصاره چای ارتودکس ایرانی و ترکیبات موجود در آن بر روی ویژگی‌های آپوپتوتیک و زیست پذیری کارسینوم سلول سنگفرشی دهان صورت نگرفته است، لذا این مطالعه، با هدف بررسی اثر عصاره هیدرومتانولی حاصل از چای سیاه ارتودکس ایرانی بر روی رده سلولی (KB) سرطان سلول سنگفرشی دهان انجام پذیرفت.



شکل ۱- رنگ سنجی با استفاده از روش (MTT)

### تست الایزا

از این تست برای سنجش میزان القای آپوپتوز توسط عصاره هیدرومتانولی تام بر روی سلول‌های سرطانی و با استفاده از دستورالعمل کیت شرکت سازنده (Roche Applied Science, Germany) انجام گرفت. ابتدا سلول‌ها به تعداد ۱۰۰۰۰ عدد به صورت تریپلیکیت در پلیت های ۹۶ خانه‌ای کشت داده شدند و در مدت زمان ۲۴ ساعت در مجاورت با عصاره در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر و کنترل مثبت قرار گرفتند. سپس طبق دستور العمل کیت Cell Death Detection ELISA سلول‌ها با بافر لیز شده و برای مشخص شدن القای آپوپتوز جمع‌آوری گردیده و به میکروپلیت های آماده که حاوی دو نوع مونوکلونال آنتی بادی بر علیه هیستون‌های هسته و DNA هستند، افزوده شدند. بعد از انکوباسیون، ۳ بار شستشو داده و سپس سوبسترا را اضافه نموده و مقدار جذب در ۴۰۵ نانومتر ثبت شد.<sup>(۱۱)</sup>

### بررسی تغییرات مورفولوژیک

یک فلاسک حاوی  $1 \times 10^6$  سلول های سرطانی در ۱۰ میلی لیتر محیط کشت تهیه گردید. پس از ۲۴ ساعت که از اتصال سلول‌ها اطمینان حاصل شد، عصاره هیدرومتانولی با غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه گردید. پس از ۲۴ ساعت تغییرات ایجاد شده، با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست (Nikon, Japan) در بزرگنمایی ۲۰ مشاهده و سپس عکس برداری شد.<sup>(۱۲)</sup> (شکل ۲)

که می توان پس از حل کردن در DMSO با دستگاه الایزا ریدر سنجش نمود. به طور خلاصه ۲۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی ( $5 \times 10^4$  سلول در هر میلی لیتر محیط کشت) در میکرو پلیت های ۹۶ خانه (Nunc, Denmark) کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید، سپس غلظت های مختلف عصاره اضافه شد. تاکسول به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و به عنوان کنترل منفی محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد (Merck, DMSO (Germany) فاقد عصاره به کار رفت. میکروپلیت های حاوی سلول و عصاره به مدت ۲۴ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند علاوه بر این جهت بررسی اثر زمان بر سایتوتوکسیسیتی عصاره هیدرومتانولی، سلول های تیمار شده با این عصاره در زمان های مختلف انکوبه گردیدند.<sup>(۹)</sup> پس از ۲۴ ساعت محیط حاوی عصاره حذف شده و بجای آن ۱۰۰ میکرولیتر محیط RPMI1640 حاوی ۵۰ میکرولیتر MTT (2mg/ml) ریخته شد و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محیط انکوبه شده با MTT شد و برای حل کردن کریستال های فورمازان به آرامی پیپت گردید. جذب نور در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر سنجیده شد. اثر هر غلظت عصاره در ۳ چاهک و در زمان ۲۴ ساعت بررسی شد. درصد سایتوتوکسیسیتی سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ منظور شد. درصد سایتوتوکسیسیتی سلول هایی که تحت تاثیر غلظت خاصی از دارو قرار گرفته اند با تقسیم جذب چاهک های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل می دهد، به عنوان IC50 در نظر گرفته شد، این مقدار از روی نمودار با استفاده از نرم افزار اکسل مایکروسافت تعیین گشت.<sup>(۱۱)</sup>

## تست Tunel

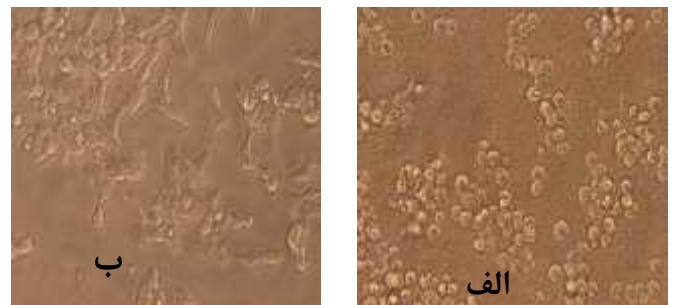
با استفاده از کیت TUNEL و طبق دستورالعمل شرکت سازنده (Roche Applied Science, Germany) مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده مورد بررسی قرار گرفت. به طور خلاصه، سلول‌های تیمار شده با فرمالدئید ۴ درصد در PBS در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت فیکس شدند و پس از شستشو با PBS در آب اکسیژنه ۳ درصد در متانول به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از شستشو با PBS به مدت ۵ دقیقه در محلول تریتون ۱۰۰ X در دمای ۴ درجه سانتیگراد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه در محلول تانل انکوبه شدند و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در محلول DAB در تاریکی قرار گرفتند. پس از آن سلول‌ها با میکروسکوپ نوری مشاهده گردیدند. در این رنگ آمیزی سلول‌های آپوپتوزی با هسته‌های قهوه‌ای رنگ مشخص گردیدند.<sup>(۱۱)</sup> برای انجام آنالیز آماری، از نرم افزار SPSS ۲۰ استفاده گردید.

KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) توسط تست MTT، در طی ۲۴ ساعت نشان داد که عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی در همه غلظت‌های بررسی شده، اختلاف معنی دار با گروه کنترل داشت و توانایی مهار رشد و خاصیت سایتوتوکسیک در سلول‌های سرطانی KB را دارد (نمودار ۱). در بررسی ۲۴ ساعته، غلظت IC50 برای عصاره هیدرومتانولی برابر با  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم بر میلی لیتر است.



نمودار ۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدرو متانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی بر سلول‌های سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) توسط تست MTT در طی ۲۴ ساعت.

با توجه به نتایج حاصل از آزمایشات MTT و تعیین میزان IC50 عصاره هیدرومتانولی تام بر روی سلول‌های سرطانی در زمان ۲۴ ساعت، مشخص شد این غلظت جهت تعیین نوع مرگ سلولی و بررسی میزان القای آپوپتوز مناسب می باشد. مقایسه شدت جذب سوپرناتانت و لایزت سلول‌ها با کنترل مثبت نشان داد، که نوع مرگ سلولی آپوپتوز می باشد. با افزایش غلظت عصاره هیدرومتانولی تام، شدت القای آپوپتوز افزایش یافت و در غلظت  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم بر میلی لیتر برابر ۳۴ درصد شد. نتایج حاصل از تیمار رده سلولی (KB) سلول‌های سرطان سنگفرشی دهان، با غلظت  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم بر میلی لیتر (IC50)، از عصاره

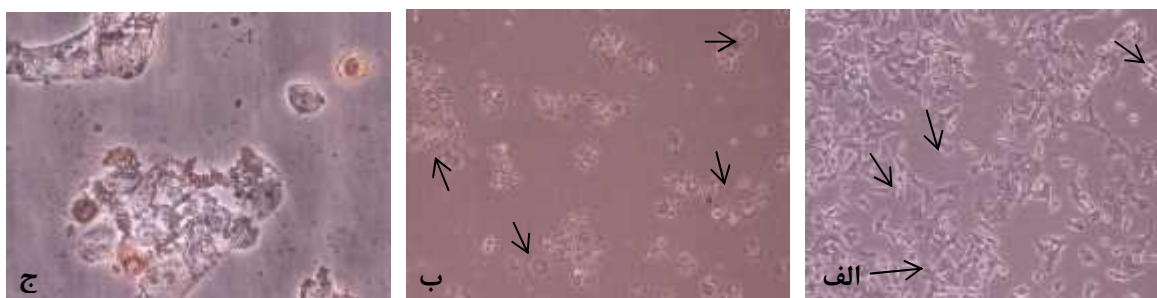


شکل ۲- تغییرات مورفولوژیک سلول‌های سرطانی پس از تیمار با عصاره هیدرومتانولی. الف) سلول‌های سرطانی در غلظت  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی بر سلول‌های سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) پس از ۲۴ ساعت ب) سلول‌های سرطانی KB بدون تیمار عصاره

## یافته‌ها:

نتایج حاصل از بررسی اثر سایتوتوکسیسیته عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی بر سلول‌های سرطانی

ساعت مشخصات ظاهری آپوپتوز را نشان می‌دهند. مشخصات اختصاصی سلول‌های آپوپتوز شده شامل: متراکم شدن هسته و قطعه قطعه شدن سلولها می‌باشد که در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده که کروماتین هسته‌ای یکنواخت داشته قابل تفکیک می‌باشند و هسته سلول‌های آپوپتوزی رنگ قهوه‌ای تیره به خود گرفته است. شکل (ج- ۳) به خوبی تغییرات آپوپتوزی سلولهای سرطانی در غلظت  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدرومتانولی را پس از ۲۴ ساعت نشان می‌دهد.



شکل ۳- تغییرات مورفولوژیک هسته سلول‌های سرطانی آپوپتوز شده پس از تیمار با عصاره هیدرومتانولی. الف) سلول‌های سرطانی KB بدون تیمار عصاره. ب) سلولهای سرطانی در غلظت  $446.08 \pm 12.4$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدرومتانولی جای سیاه ارتودکس ایرانی بر سلولهای سرطانی KB (مدل سلولی اسکواموس سل کارسینوما) پس از ۲۴ ساعت بوسیله تست تانل. ج) مشخصات اختصاصی سلول‌های آپوپتوز شده شامل هسته متراکم قهوه‌ای تیره (با فلش نشان داده شده است) و قطعه قطعه شدن سلول است که در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده که کروماتین هسته‌ای یکنواخت دارند، قابل تفکیک هستند.

#### بحث:

امروزه ترکیبات گیاهی فراوانی با اثرات بیولوژیک مختلف جداسازی شده و در علم داروسازی نوین وارد شده اند که در درمان سرطان‌های مختلف موثرند. (۱۵) چای غنی از ترکیبات آلکالوئیدها (کافئین)، فلاونوئیدها (کاتپسین‌ها)، فنولیک اسیدها (گالیک اسید، کوماریک اسید، کافئیک اسید و کلروژیک اسید) بوده که عامل اثرات آنتی اکسیدانی، آنتی موتاژنیک، ضدسرطانی و حذف‌کنندگی رادیکالهای آزاد مضر می‌باشد. (۱۶)

در تحقیقاتی که در گذشته صورت گرفته است، نشان داده شده که ترکیبات فنولی به خصوص گالیک اسید بدست آمده از عصاره برگ چای سیاه، توانایی القای آپوپتوز در

هیدرومتانولی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت چروکیدگی و تغییر شکل در غشا سلول‌ها ایجاد شده و همچنین درصدی از سلول‌ها از بستر خود جدا شده اند. (شکل ۳)

#### تایید اثر عصاره هیدرومتانولی بوسیله تست TUNEL

تست تانل جهت بررسی القای مرگ سلولی و اثر القای آپوپتوز بر روی سلول‌های سرطانی انجام شد. نتایج نشان داد که رده سلولهای اسکواموس سل کارسینوم در غلظت  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدرومتانولی پس از ۲۴

سرطان یکی از عوامل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است. در آمار سازمان بهداشت جهانی تخمین زده شده است که سرطان عامل ۸۳/۲ میلیون مرگ در بین سال‌های ۲۰۰۵ تا ۲۰۱۵ خواهد بود. (۱۳) بیماری سرطان، بدخیمی است که مشخصه بارز آن میزان پایین آپوپتوز است. چگونگی تنظیم آپوپتوز یکی از دغدغه‌های اصلی توسعه داروهای ضدسرطانی و شیمی درمانی سلول‌های بدخیم است. در سالهای اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به عوارض جانبی کم و تاثیرات امید بخش مورد توجه واقع گشته است. (۱۴)

اسکواموس کارسینوما، منجر به کاهش رشد سلولهای سرطانی می‌شود.

همان طور که مشاهده می‌شود یافته‌های این پژوهش با یافته‌های دیگران در مورد اثر ضدسرطانی ترکیبات موجود در چای سبز بر روی سلولهای سرطانی دهان تاحدی مشابه اثرات ترکیبات موجود در چای سیاه بر روی سلولهای سرطانی دهان در این مطالعه می‌باشد و چای سیاه نیز مشابه چای سبز بر روی سلولهای سرطانی دهان اثرات ضد سرطانی دارد.

با توجه به عدم بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی بر سرطان دهان، در مطالعه حاضر اثر عصاره هیدرومتانولی بر روی رده سلولهای سرطانی KB در غلظت‌های مختلف با استفاده از تست MTT بررسی گردید و نتایج نشان داد، که عصاره هیدرومتانولی در زمان ۲۴ ساعت بر روی سلولهای سرطانی منجر به کاهش رشد سلولهای سرطانی همراه می‌شود. بنابراین ترکیبات ضد سرطان موجود در عصاره چای سیاه دارای اثر وابسته به غلظت بر روی سلولهای سرطانی KB دارد.

مهار رشد و تکثیر سلولهای سرطانی همراه با القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی تیمار شده با عصاره با تست‌های اختصاصی تایید شد. مورفولوژی سلولهای در حال آپوپتوز خصوصیات اختصاصی نظیر چروکیدگی سلول و آماس غشا را نشان می‌دهند که چروکیدگی شدن سلولهای سرطانی تیمار شده با غلظت  $446/08 \pm 12/4$  میکروگرم در میلی لیتر عصاره هیدرومتانولی، القای آپوپتوز را در طی مهار رشد تایید می‌کند.

### نتیجه گیری

بنظر می‌رسد که در صورت شناسایی ترکیبات فعال عصاره چای سیاه و مطالعات تکمیلی اثرات آن می‌توان در آینده از آن در درمان سرطان استفاده نمود. با توجه به نتایج حاصل،

سلولهای سرطانی معده، کولون ولوسمی را دارد ولی تاکنون تحقیقی درباره اثر عصاره چای سیاه بر روی رده سلولهای سرطانی دهان انجام نگرفته است. (۱۹-۱۷)

در مطالعه ای که توسط Jiebolu و همکارانش در سال ۲۰۰۸ انجام شد، برای اولین بار به این نتیجه رسیدند که پلی فنل‌های موجود در چای سیاه با ایجاد اختلال در مسیرهای رشد سلول و فعال سازی مسیرهای آپوپتوز، بطور بالقوه اثر ضدسرطانی داشته باشند. (۲۰)

همچنین در مطالعه دیگری که توسط Arindam Bha و همکارانش در سال ۲۰۰۵ انجام شد، به این نتیجه رسیدند که چای سیاه باعث القای آپوپتوز در سلولهای کارسینوم پستان می‌شود. (۲۱)

تحقیق نشان داد که، مهار رشد و تکثیر سلولهای سرطانی سرطان دهان همراه با القای آپوپتوز در سلولهای سرطانی تیمار شده با عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی با تستهای اختصاصی انجام گرفت و نتایج بدست آمده، تایید کننده مطالعات دیگران در مورد مکانیسم اثر ضدسرطانی چای سیاه با القای آپوپتوز می‌باشد.

اکثر مطالعات گذشته بر روی سلولهای سرطان دهان توسط عصاره چای سبز صورت گرفته است. به عنوان مثال در مطالعه Hsu و همکاران در سال ۲۰۰۲، به این نتیجه رسیدند که اثرات شیمیایی پلی فنل‌های چای سبز به خصوص Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) در سلولهای سرطانی دهان منجر به فعال سازی مسیر آپوپتوتیک میشود. (۸) و مطالعه بسیار جدیدی که توسط Zlotogorski و همکاران در سال ۲۰۱۳ انجام گرفت، نشان داد که پلی فنل‌های چای سبز دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و میتوانند به طور بالقوه خاصیت درمانی در بدخیمی‌های انسان به ویژه اسکواموس سل کارسینوما سرگردن داشته باشند. (۲۲)

در مطالعه حاضر، نتایج نشان داد که عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی نیز با اثر بر سلولهای سرطانی

تشکر را داریم. این طرح با کد طرح ۹۱/۶۲ در تاریخ ۹۱/۶/۶ در مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تصویب گردید.

عصاره هیدرومتانولی چای سیاه ارتودکس ایرانی حاوی ترکیبات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک بیشتر بوده و کاندید مناسبی برای شناسایی و خالص سازی ترکیبات فعال می باشد.

### تشکر و قدر دانی

از حمایت های مالی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و تمامی همکاران عزیز که ما را در جهت اجرای هر چه بهتر این تحقیق یاری نموده اند، نهایت

### References:

- 1-Kacher JE. Oral and maxillofacial pathology. Case of the month. Histoplasmosis. Tex Dent J. 2013 Mar;130(3):198, 232.
- 2- Chin YW, Balunas MJ, Chai HB, Ringhorn AD. Drug discovery from natural sources . AAPS J. 2006 Apr 14;8(2):E239-53.
- 3- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516
- 4- Cragg GM, Newman DJ. Plant as source of anti cancer agents. J Ethnopharmacol. 2005 Aug 22;100(1-2):72-9.
- 5- Uruña C, Cifuentes C, Castañeda D, Arango A, Kaur P, Asea A, et al. Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. BMC Complement Altern Med. 2008 Nov 18;8:60.
- 6- Mehta RG, Murillo G, Naithani R, Peng X. Cancer chemoprevention by natural products: how far have we come? Pharm Res. 2010 Jun;27(6):950-61.
- 7- Katiyar SK, Perez A, Mukhtar H. Green tea polyphenol treatment to human skin prevents formation of ultraviolet light  $\beta$ -induced pyrimidine dimers in DNA. Clin Cancer Res. 2000 Oct;6(10):3864-9
- 8- Hsu S, Lewis J, Singh B, Schoenlein P, Osaki T, Athar M, et al. Green tea poly phenol targets the mitochondria in tumor cells inducing caspase 3-dependent apoptosis. Anticancer Res. 2003 Mar-Apr;23(2B):1533-9.
- 9- Hsu S, Farrey K, Wataha J, Lewis J, Borke J, Singh B, et al. Role of p21 WAF1 in Green tea polyphenol induced growth arrest and apoptosis of oral carcinoma cells. Anticancer Res. 2005 Jan-Feb;25(1A):63-7.
- 10- Valiyari S, Baradaran B, Delazar A, Pasdaran A, Zare M. Dichloromethane and Methanol Extracts of Scrophularia oxysepala Induces Apoptosis in MCF-7 Human Breast Cancer Cells. Advanced Pharmaceutical Bulletin. 2012; 2(2), 223-231.
- 11- Mc P. Basic techniques for mammalian to cell tissue culture. Current Protocols In Cell Biology. 1998; 7: 1-10.- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J of Immunol Methods. 1998; 65: 55-63..
- 12-Kumar V, Abbas AK, Fauston. Robbins and cotran Pathologic Basic of Disease. 7nd ed. Philadelphia: W.B.Saunders Co;2007. p:19-20.

- 13- Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, Chang JC. Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res.* 2013 Jan 22;15:(1)
- 14-Sun SY, Hail JN, Lotan R. Apoptosis as a novel target for cancer chemoprevention. *J Nat Can Ins.* 2004; 96: 662-72.
- 15-Kinghorn AD, Farnsworth NR, Soejarto DD, Cordell GA, Swanson S.M., Pezzuto JM. Novel strategies for the discovery of plant-derived anticancer agents. *Pharmaceutical Biol.* 2003; 41: 53-67.
- 16-Hudaykulyev Y, Tastekin M, Poyrazoglu E, Baspinar E, Velioglu YS. Variables affecting fluoride in turkish black tea. *Fluoride.* 2005;38(1):24-29.
- 17-Okabe S, Ochiai Y, Aida M, Park K, Kim SJ, Nomura T, Suganuma M, Fujiki H. Mechanistic aspects of green tea as a cancer preventive: effect of components on human stomach cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res.* 1999;90:733-9.
- 18-Lung HL, Ip WK, Chen ZY, Mak NK, Leung KN. Comparative study of the growth-inhibitory and apoptosis-inducing activities of black tea theaflavins and green tea catechin on murine myeloid leukemia cells. *Int J Mol Med.* 2004;13:465-71.
- 19-Weisburger JH, Rivenson A, Aliaga C, Reinhardt J, Kelloff GJ, Boone CW, Steele VE, Balentine DA, Pittman B, Zang E. Effect of tea extracts, polyphenols, and epigallocatechin gallate on azoxymethane-induced colon cancer. *Exp Lung Res.* 1998;24:629-39
- 20-Jiebo Lu, Alexander G, Alice Yee-C L, Kuang Y C. PCR differential display-based identification of regulator of G protein signaling 10 as the target gene in human colon cancer cells induced by black tea polyphenol theaflavin monogallate. *European Journal of Pharmacology.* 2008; 601:66-72.
- 21-Arindam B, Lakshmi L, Debaprasad M, Gaurisankar Sa and Tanya D. Black tea induces tumor cell apoptosis by Bax translocation, loss in mitochondrial transmembrane potential, cytochrome c release and caspase activation. *Int. J. Cancer* 2005;117: 308-315.
- 22-Ayelet Z, Aliza D, Dan D, Gavriel C, Tuula S, Marilena V. Nutraceuticals as new treatment approaches for oral cancer: II. Green tea extracts and resveratrol. *Oral Oncology.* 2013; 49:502-506