

بررسی سیتوتوکسیسیته عصاره آبی گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) بر روی رده سلولی U937

پروین تراب زاده^۱، مهروز دزفولیان^۱

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، دانشکده علوم، استادیار گروه میکروبیولوژی، کرج، ایران. torabzadeh@kiaou.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۶ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۱۷

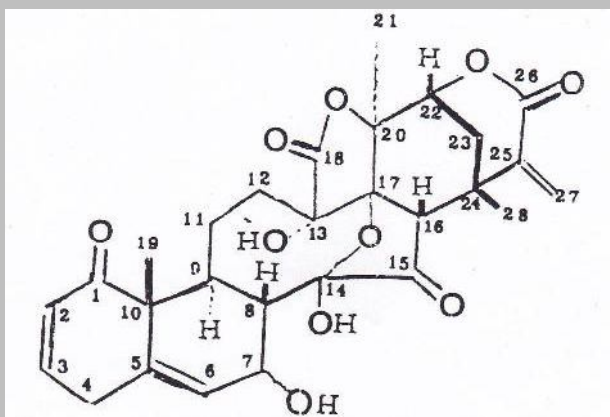
چکیده

زمینه و هدف: گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) از جمله گیاهان دارویی است که در طب سنتی ایران و اکثر نقاط جهان کاربرد داشته و از آن به عنوان تب بر، فعالیت آنتی توموری، ضد التهابی، ضد درد، ضد باکتری و ضد ویروس استفاده می شود. هدف از این تحقیق بررسی اثرات سیتوتوکسیسیته عصاره آبی این گیاه بر روی سلول های U937 است. روش کار: ابتدا عصاره ی آبی گیاه تهیه گردید. سپس در سه دوز مختلف، پایین، متوسط و زیاد از این عصاره بر روی کشت سلولی U937، هلا و L9۲۹ اثر داده شد و با روش MTT Assay میزان زنده ماندن سلول ها بررسی شد یافته ها: نتایج حاصل اختلاف معنی داری را در میزان زنده ماندن سلول های U937 در بین گروه های کنترل و تیمار غلظت های مختلف نشان می دهد. LC50 سلول های U937 ۲۸/۱۲۵ mg/ml بود. نتایج آزمایش ها نشان داد عصاره آبی گیاه مذکور بر روی سلول های U937 خاصیت سیتوتوکسیسیته ی خوبی را دارا می باشد. واژه های کلیدی: عروسک پشت پرده، سرطان، خواص سیتوتوکسیک، سلول های U937.

مقدمه

این ترکیبات در حلال‌هایی نظیر استن، کلروفرم، اتانول، اتر و آمونیاک محلول می باشند (۲). فیزالین‌ها ساختمان حلقوی سیکلوپنتانو فناترن داشته و در تمام آن‌ها حلقه‌ی گامالاکتون وجود دارد. این مواد، استروئیدهای ۲۸ کربنی می باشند که از نظر ساختمان شیمیایی بسیار مورد توجه محققین بوده، به ویژه این که در اسکلت کربنی آن‌ها ۲ شکل جالب بیوژنتیکی وجود دارد: ۱- پیوند بین کربن ۱۳ و ۱۴ در مولکول شکسته شده و در یک حلقه، ۹ کربن وجود دارد. ۲- با ایجاد پیوند کربن بین کربن ۱۶ و ۲۴، یک گروه کربوکسیل ۶ عضوی جدید به وجود آمده است (شکل ۱) (۹).

فیزالین‌ها از جمله ترکیبات اصلی گیاه عروسک پشت پرده بوده که به گروه تری ترپنوئیدها تعلق دارند. ولی از نظر ساختمانی نه تنها یک نوع استروئید نرمال نبوده، بلکه یک نوع تری ترپنوئید نرمال نیز نمی باشد و از این نظر بسیار جالب توجه می باشد (۱۴). این ماده برای اولین بار توسط Dessaigne و همکارانش در سال ۱۸۵۲ از برگ های گیاه *Physalis alkekengi* کشف گردید، بیش از ۱۵ نوع فیزالین مختلف به نام های A,B,C,D,E,F,G,H,I,J,K,L,M,N,O از گیاه *P. alkekengi* و سایر گونه‌های جنس *Physalis* شناسایی شده است. فیزالین‌ها ترکیباتی جامد، زرد رنگ، بی شکل و دارای طعم تلخ می باشند و نقطه ی ذوب آن‌ها بین ۲۰۰-۳۰۰ درجه سانتی‌گراد می باشد.



شکل ۱- ساختمان عمومی فیزالین

گوارشی، دردهای روماتیسمی و گلو درد، نقش ضد التهابی در التهاب کبد و دهانه رحم، هم چنین نقش مدر و تب بر، گزارش شده است (۱۳). به علاوه به نقش عصاره آبی این گیاه در تعدیل سیتوتوکسیسیته سلول های کشنده طبیعی طحال موش (Killer cells) و اثر آنتی توموری فیزالین F این گیاه بر روی ۵ نوع سلول توموری انسان اشاره شده است (۷، ۶). ترکیبات ویتانولیدی گیاه *P. peruviana* که از نظر شیمیایی وابسته به فیزالین ها است، رشد لارو حشرات را مهار می کند (۱۱). فعالیت سیتوتوکسیسیته ضعیف فیزالین M استخراج شده از گیاه *P. alkekengi* بر روی سلول های سرطانی Hela توسط Kawai و همکارانش در سال ۱۹۸۸ تأیید شده است (۱۷). نقش آنتی توموری ویتانگولانتین A که نوعی ترکیب ویتانولیدی استخراج شده از بخش های هوایی گیاه *P. angulata* می باشد و از طریق مهار آنزیم توپو ایزومراز II عمل می کند، به وسیله Chen در سال ۱۹۹۰ گزارش شده است (۸). فعالیت ضد توموری و ضد باکتریایی و ضد ویروسی ترکیبات موجود در *P. alkekengi* مورد بررسی قرار گرفته است (۳، ۴، ۱۰). اثر ضد باکتریایی و ضد توموری عصاره آبی گیاه *P. alkekengi* توسط Frisbey و همکارانش در سال ۱۹۵۳ و Hartwell در سال ۱۹۷۱ بررسی و گزارش شده است (۱۲، ۱۵). سلول های U937 یک مدل رده سلولی هستند که در

Matsuura و همکارانش در سال ۱۹۷۰ فیزالین های A, B, C را از گیاه *P. alkekengi* و Chiang و همکارانش در سال ۱۹۹۲ فیزالین های D, F را از گیاه *P. angulata* استخراج نمودند (۲۲، ۸). انواع فیزالین های E, F, G, H و نیز توسط Row و همکارانش در سال ۱۹۸۰ از گونه های *P. angulata* و *P. lancifolia* استخراج شده است (۲۶، ۲۷). Kawai و همکارانش قبلاً فیزالین های A و B استخراج شده از گیاه *P. alkekengi* را با فرمول عمومی ۱۳ و ۱۴ سکوی، ۱۶ و ۲۴ سیکلو استروئید معرفی نمود. آن ها در سال ۱۹۸۷ فیزالین، در سال ۱۹۸۸ فیزالین M و در سال ۱۹۹۲ نیز انواع فیزالین های O, N را از همین گیاه استخراج و گزارش نمودند (۲۱-۱۷). فیزالین J توسط Row و همکارانش در سال ۱۹۷۸ از گیاه *P. angulata* استخراج گردید (۲۵). در سال ۱۳۷۳ برای اولین بار در ایران فیزالین D, F از گیاه *P. alkekengi* استخراج و شناسایی گردید (۱) (شکل ۱). برای فیزالین ها و ترکیبات شیمیایی وابسته به آن ها نظیر ویتانولید ها، هیدرو فیزالین ها و فیزالو لاکتون ها خواص زیستی متعددی گزارش شده است که مهم ترین آن ها به شرح زیر می باشد: نقش مهارتی فیزالین های F, B بر روی سلول های لوسمی انسان در محیط Invitro مشخص شده است (۷، ۶). برای ترکیبات شیمیایی گیاه *P. angulata* اثرات ضد درد در دردهای سیستم

محلول تهیه شده عصاره ۱/۵ گرم پودر میوه گیاه است (۲۸، ۱۹).

تهیه محیط کشت RPMI 1640

بر اساس دستور العمل شرکت Gibco، ۱۰/۴۴ گرم از پودر RPMI 1640 را با یک لیتر آب مقطر اتوکلاو شده به کمک همزن مغناطیسی کاملاً حل نموده، سپس به آن ۲ گرم بی کربنات سدیم اضافه و برای تعیین pH و انجام تست های میکروبیولوژی، محیط کشت تهیه شده با استفاده از فیلتر Millipore با قطر ۰/۲ میکرون استریل گردید. در زمان استفاده از محیط کشت RPMI ۱۶۴۰، ۱۰۰ μg/ml پنی سیلین، استرپتومایسین ۱۰۰ μg/ml و ۱۰٪ FBS به آن اضافه شد (سیستم کمپلمان FBS به وسیله قرار دادن آن در بن ماری ۵۶ درجه سانتی گراد به مدت یک ساعت غیر فعال شده است).

کشت داخل پلیت ۹۶ خانه ای

در زیر هود لامینار استریل شده، سلول های فیروبلاست کشت شده در داخل فلاسک ریخته و تریپسین/EDTA به مقداری که روی سلول ها را اندکی بپوشاند به آن اضافه می گردد. فلاسک به مدت ۱۰ دقیقه داخل انکوباتور CO₂ دار قرار گرفتند (تریپسین باعث تخریب مولکول های چسبنده سلول به کف پلیت می شود. زمان اعمال باید کم باشد تا به خود سلول ها آسیبی نرسد). پس از این مدت محتویات فلاسک در زیر میکروسکوپ برای مشاهده سلول ها به صورت شناور گذاشته شد. سپس به اندازه دو برابر حجم آن ها تریپسین / EDTA، محیط کشت ۱۰٪ FBS + RPMI اضافه گردید (پروتئین موجود در سرم FBS، باعث غیر فعال شدن تریپسین می شود). سپس سوسپانسیون محتوی سلول را به فالكون ۱۵ میلی لیتر منتقل و با دور ۲۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رویه محلول

تحقیقات زیست پزشکی از آن استفاده می شود. این سلول ها از بافت لنفومای یک بیمار مرد ۳۷ ساله جدا شده است که دارای خصوصیات رفتاری مونوسیتی می باشد و در پاسخ به محرک های خاص سازش یافته و خصوصیات یک ماکروفاژ را نشان می دهد. بنابراین با توجه به خواص درمانی این گیاه هدف از این تحقیق بررسی اثرات سیتو توکسیسیته این گیاه بر روی سلول های U937، هلا و L۹۲۹ است.

مواد و روش ها

رده های سلولی مورد استفاده

رده های سلولی مورد استفاده U937، L929 و Hela هستند، که به صورت منجمد و یا در محیط کشت از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شدند. سلول های منجمد که در ویال های مخصوص می باشند به یخ خشک منتقل و در آزمایشگاه کشت سلول دانشگاه آزاد واحد کرج در ازت مایع نگهداری شدند. در تمام مدت انجام تحقیقات برای تکثیر سلول های مورد استفاده در آزمایش ها از فلاسک های ۲۵ و ۸۰ سانتی متر مربع استفاده گردید. سلول ها در ظروف پتری (پنج سانتی متری) استریل به صورت سه گانه و به تعداد ۸۰۰۰۰ در هر میلی لیتر کشت و به مدت ۲۴ ساعت سلول ها در انکوباتور CO₂ دار با ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند.

روش تهیه عصاره آبی

برای تهیه عصاره آبی گیاه، مقدار ۳۰ گرم پودر میوه گیاه به وسیله آسیاب برقی تهیه و به آن ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده و سوسپانسیون حاصل را به آهستگی به مدت یک ساعت جوشانده و پس از صاف نمودن با کاغذ صافی، محلول صاف شده تا حداکثر در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد تغلیظ نموده تا حجم نهایی آن به ۲۰ میلی لیتر برسد. در این حالت هر میلی لیتر از

در داخل انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند، سپس رنگ موجود از چاهک ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول ساخت شرکت مرک آلمان به سلول ها اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه OD سلول ها در دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شدند.

تست تغییرات سیتوپلاسمی

تست تغییرات سیتوپلاسمی به منظور بررسی تغییرات سیتوپلاسم، به ویژه تغییرات هسته انجام می شود. در طی انجام تست MTT، سلول های کنترل هم چنان سالمند و با افزایش MTT به بنفش تغییر رنگ می دهند. ولی اگر نمونه های آزمایشی که به سلول های سرطانی تلقیح می شوند باعث مرگ آن ها از طریق آپوپتوزیس شده باشند، با افزایش MTT، محلول بی رنگ باقی مانده و اگر صورتی شد نشانه آغاز آپوپتوز می باشد. البته، آپوپتوز با نکروز تفاوت دارد. در نکروز، سیتوپلاسم جمع شده و فضای سلول حالت پراکندگی دارد. اما در حالت آپوپتوزیس، میتوکندری کارایی نداشته، هسته قطعه قطعه شده و اندامک ها تدریجاً از بین رفته و هضم می شوند. در آپوپتوزیس پیشرفته تر، هسته مشاهده نمی شود. وضعیت سیتوپلاسم و هسته در آپوپتوزیس، بدون رنگ آمیزی سلول توسط میکروسکوپ نوری مشخص و قابل مشاهده نیست و در این حالت سلول ها سالم به نظر می رسند. در حالی که با استفاده از رنگ آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین، تغییرات سیتوپلاسم و هسته در آپوپتوزیس قابل رویت می باشد. این رنگ آمیزی مطابق روش زیر انجام شده است:

- ۱- خالی کردن تمام مایع رویی داخل چاهک
- ۲- قرار دادن ۱۰۰ میکرولیتر فرمالدهید ۱۰٪ در چاهک به مدت ۱۰ دقیقه و سپس خالی کردن آن

دور ریخته و ۲ میلی لیتر از محیط کشت RPMI + FBS ۱۰٪ به فالکون اضافه شد.

شمارش سلول ها

قبل از انتقال سلول ها به پلیت ۹۶ خانه ای باید آن ها شمارش گردد، زیرا هر WELL پلیت دارای گنجایش ۲۰۰ میکرولیتر باید دارای ۸۰ هزار سلول باشد که کف well را کاملاً بپوشاند. برای این کار یک قطره از محلول سلولی را با یک قطره رنگ در داخل میکروتیوب کاملاً مخلوط و با لام نتوبار شمارش و توسط فرمول زیر متوسط سلول ها به دست آمد.

$$\frac{\text{تعداد سلولها در } 2\text{ml محیط}}{80000} = \frac{2000 \text{ (میلان محیط)}}{X}$$

X میزانی از سوسپانسیون است که برای هر well باید برداشته شود تا در هر well به میزان ۸۰ هزار سلول است. سپس به هر well به میزان لازم محیط کشت اضافه، تا به حجم ۲۰۰ میکرولیتر برسد. پلیت را به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار قرار داده تا سلول ها به کف پلیت بچسبند و به شکل دوکی درآیند.

MTT Assay

برای تعیین میزان تکثیر سلول ها از روش رنگ سنجی کمی استفاده شد که در آن نمک زرد رنگ تترازولیوم 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- tetrazolium (2,5-Diphenyltetrazolium-bromide) به وسیله آنزیم سوکسینیک دهیدروژناز میتوکندری متابولیزه شده و به فورمازان ارغوانی رنگ تبدیل می شود. محصول فورمازان تنها در صورت سلامت میتوکندری ها ساخته می شود. برای انجام این روش از محلول MTT10X استفاده شد و از این محلول با رقیق کردن توسط 1X PBS برای ساختن محلول 1X MTT استفاده گردید.

روش کار: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از این محلول به سلول ها اضافه شد. سلول ها به مدت ۲ ساعت در تاریکی و

تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ی ۸ و آزمون ANOVA یک طرفه انجام شد.

نتایج

MTT Assay سلول های L929

بعد از انجام تست MTT Assay، OD های به دست آمده برای سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه به صورت زیر بود: غلظت های به کار برده شده به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر می باشد (جدول ۱).

- ۳- قرار دادن ۵۰ میکرولیتر PBS در چاهک به مدت ۵ دقیقه و سپس خالی کردن آن
- ۴- قرار دادن ۵۰ میکرولیتر رنگ هماتوکسیلین در چاهک به مدت ۱ دقیقه و خالی کردن آن
- ۵- شستشوی چاهک با استفاده از PBS ۱۰٪.
- ۶- قرار دادن ۵۰ میکرولیتر رنگ ائوزین در چاهک به مدت ۵ دقیقه و سپس خالی کردن آن
- ۷- شستشوی چاهک با استفاده از PBS ۱۰٪، تا حدی که از رنگ قرمز چاهک کاسته شود.
- ۸- مشاهده سلول های رنگ آمیزی توسط میکروسکوپ نوری

جدول ۱ - تست MTT Assay سلول های فیروبلاست (L 929)

غلظت ۱۰ μl	غلظت ۲۰ μl	غلظت ۳۰ μl	غلظت ۴۰ μl	کنترل
۰/۶۳۴	۰/۵۴۴	۰/۶۵۹	۰/۴۸۸	۰/۳۳۳
۰/۵۶۰	۰/۵۶۶	۰/۴۷۴	۰/۵۴۵	۰/۶۲۹
۰/۵۱۰	۰/۴۶۲	۰/۴۶۱	۰/۴۶۶	۰/۳۶۵

دوز عصاره آبی، میزان زنده ماندن سلول ها نیز کاهش پیدا می کرد. LC 50 برای سلول های L929 mg/ml ۱۸۷۵ نشان داده شد (نمودار ۲).

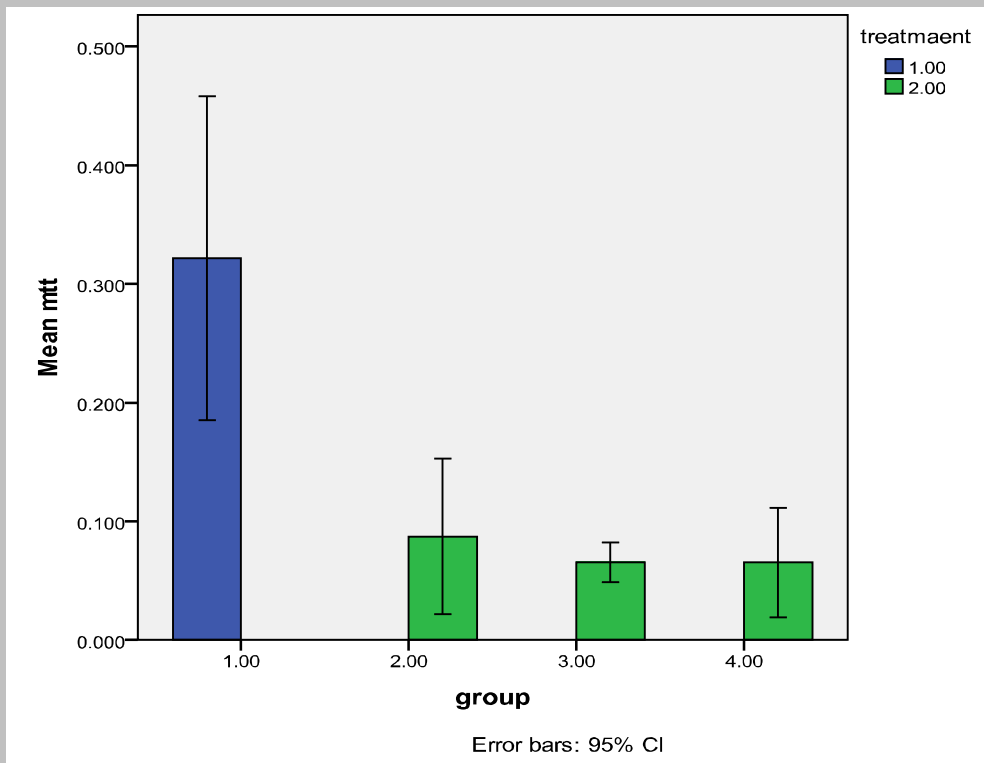
MTT Assay سلول های Hela

بعد از انجام تست MTT Assay، OD های به دست آمده برای سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه به صورت زیر بود: غلظت های به کار برده شده به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر می باشد (جدول ۲).

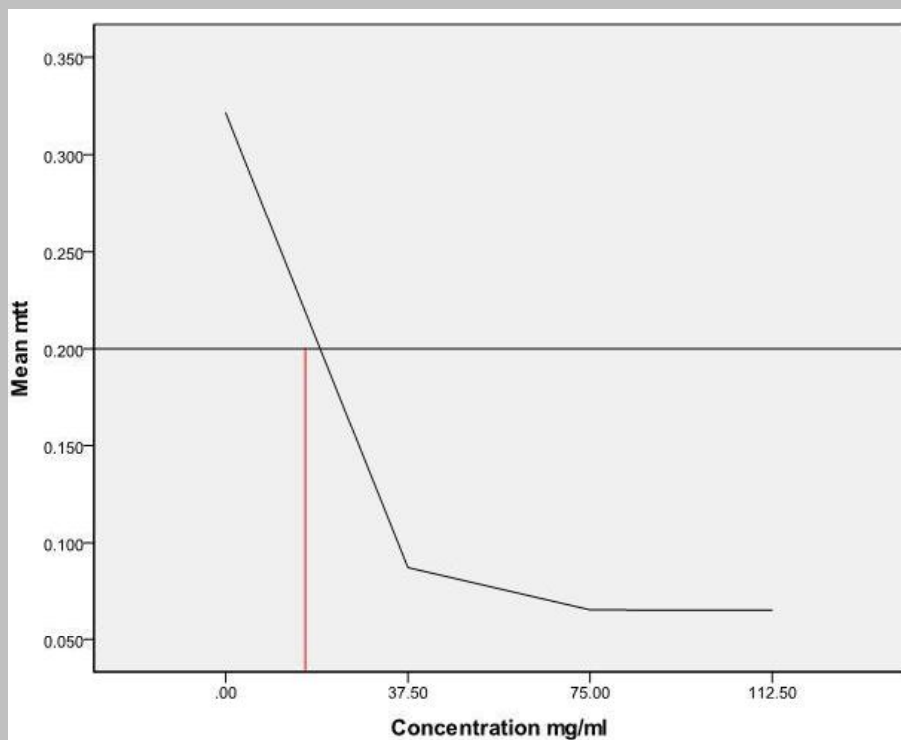
نتایج حاصل، میزان زنده ماندن سلول های L929 در بین گروه کنترل و غلظت های مختلف اختلاف معنی داری را نشان می دهد (نمودار ۱ و ۲). با توجه به نتایج MTT Assay سلول های L929، در همه ی گروه های تجربی، کاهش نشان داد و در دوز ۷۵ و ۱۱۲/۵ mg/ml تعداد سلول های زنده، کاهش بیشتری نسبت به دوز ۳۷/۵ mg/ml نشان داد (نمودار ۱). با توجه به افزایش

جدول ۲ - تست MTT Assay سلول های Hela

غلظت ۱۰ میکرولیتر	غلظت ۲۰ میکرولیتر	غلظت ۳۰ میکرولیتر	غلظت ۴۰ میکرولیتر	کنترل
۰/۵۸۰	۰/۸۲۴	۰/۸۷۶	۰/۹۰۵	۰/۷۲۹
۰/۴۲۱	۰/۹۱۲	۰/۹۲۷	۰/۸۵۷	۰/۶۷۷
۰/۴۱۶	۰/۸۳۱	۰/۹۳۲	۰/۸۸۶	۰/۶۸۴



نمودار ۱- مقایسه گروه‌های مختلف بررسی شده بر روی سلول‌های L929. گروه ۱: گروه کنترل می باشد که فقط تحت تاثیر محیط کشت به همراه ۱۰٪ FBS بوده است. گروه‌های ۲ الی ۴ به ترتیب غلظت‌های ۳۷/۵mg/ml، ۷۵ و ۱۱۲/۵ از عصاره آبی می باشد.



نمودار ۲- تاثیرات سابتوکسیسیته عصاره بر روی سلول‌های L929. LC 50 برای این ماده به منظور تاثیرات کشندگی بر روی سلول ۱۸/۷۵ mg/ml می باشد.

معنی داری را در میزان زنده ماندن سلول های U937، L929 و HeLa در بین گروه های کنترل و تیمار غلظت های مختلف نشان می دهد.

وجود اختلاف معنی دار در میزان زنده ماندن سلول ها در جلوگیری از تقسیم و تمایز سلولی می باشد. به طوری که برخی از بررسی ها برای فیزالین ها و عصاره-ی آبی گیاه عروسک پشت پرده، نقش آنتی توموری و سیتوتوکسیسته از طریق تخریب DNA و مهار آنزیم توپوایزومراز II توضیح می دهند (۷-۴، ۱۶). Basey و Chiang و همکارانش نقش ضد توموری و سیتوتوکسیسته فیزالین F₆B را در گروه سلول های سرطانی هیپاتوما و کم خونی های حاد انسان بررسی نموده اند. این عمل از طریق مهار کننده توپوایزومراز II انجام می گیرد (۷-۴). Kawai و همکارانش در سال ۱۹۸۸ از شکل ساختمانی فیزالین F چنین نتیجه گرفتند که عملکرد گروه اپوکسی برای فیزالین F در محل کربن ۵ و ۶ باشد (۱۷). در حالی که گروه 5 α -OH و 6 β -OH در فیزالین D غیر فعال می باشد. گروه اپوکسی از باند دوگانه بین کربن ۵ و ۶ در اثرات ضد توموری بسیار فعال تر می باشد. گروه کربونیل در کربن ۲۷ (C-27) علت خاصیت سیتوتوکسیک برای فیزالین ها می باشد. غیر فعال بودن فیزالین L را به عدم پیوستگی در بخش سیکلوهگزانون نسبت می دهند. فیزالین M سیتوتوکسیسته ی ضعیفی را در برابر سلول های توموری نشان می دهد و علت آن پیوند دوگانه ی کربن ۲ و ۳ به جای کربن ۳ و ۴ و اتصال بخش سیکلوهگزان در حلقه ی A در فعالیت ضد توموری فیزالین ها می باشد. در بررسی میزان کشندگی عصاره آبی گیاه عروسک پشت پرده بر روی سلول های HeLa و L929 و U937 آزمایش شد.

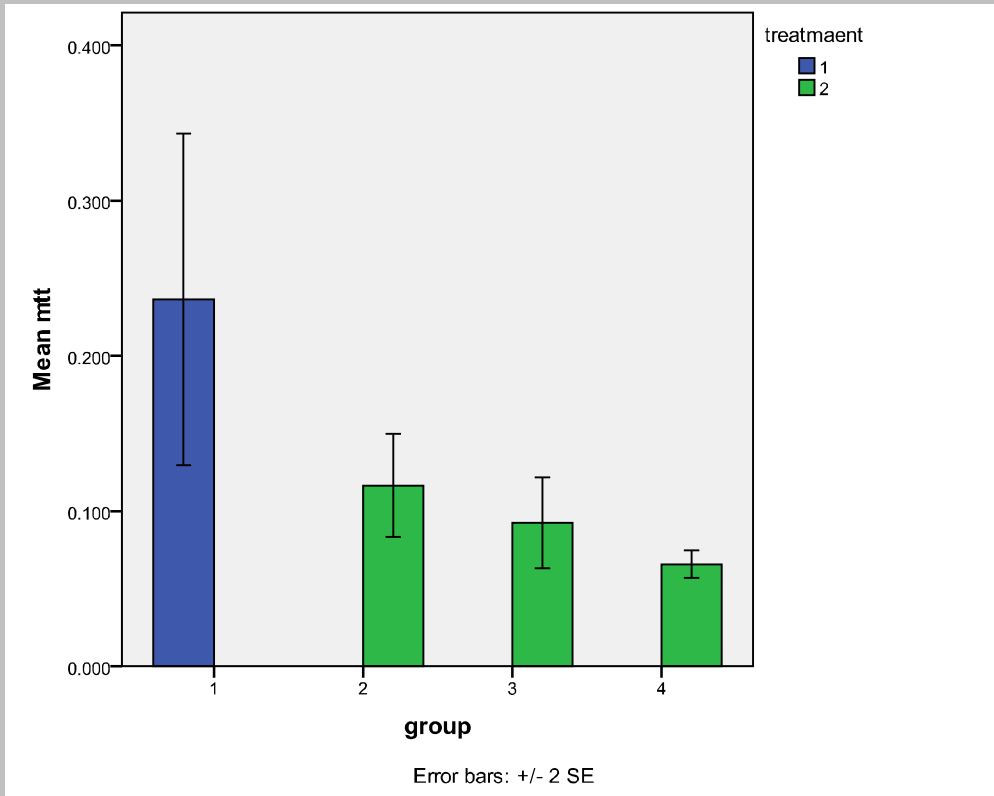
نتایج حاصل، میزان زنده ماندن سلول های HeLa در بین گروه کنترل و غلظت های مختلف اختلاف معنی داری را نشان می دهد (نمودار ۳ و ۴). نتایج MTT Assay سلول های HeLa نشان داد که در همه ی دوزها، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل در تعداد سلول های زنده وجود دارد. با توجه به نمودار ۳، این کاهش را در دوز ۷۵ بیشتر از ۳۷/۵، و در دوز ۱۱۲/۵ بیشتر از ۷۵ mg/ml نشان می دهد. LC 50 سلول های HeLa، ۲۵ mg/ml بود (نمودار ۴). نتایج MTT Assay سلول های HeLa نسبت به L 929 بهتر بود.

MTT Assay سلول های U937

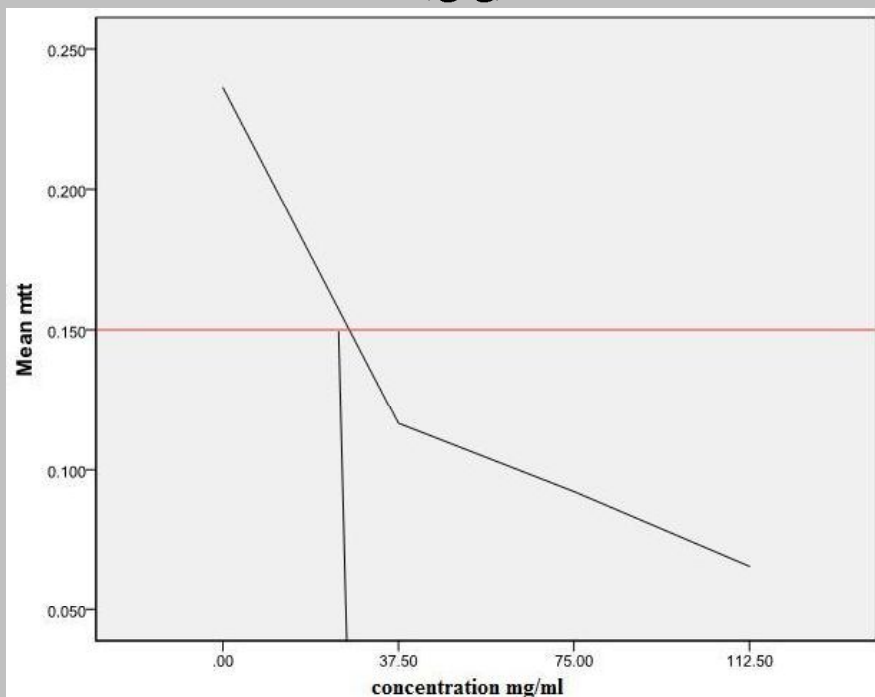
بعد از انجام تست MTT Assay، ODهای به دست آمده برای سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره آبی گیاه به صورت زیر بود: غلظت های به کار برده شده به ترتیب ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر می باشد. نتایج حاصل، میزان زنده ماندن سلول های U 937 در بین گروه کنترل و غلظت های مختلف اختلاف معنی داری را نشان می دهد (جدول ۳، نمودار ۵ و ۶). نتایج MTT Assay سلول های U 937 در همه ی گروه های تجربی، کاهش معنی داری نسبت به گروه کنترل نشان داد (نمودار ۵) LC50 برابر با ۲۸/۱۲۵ mg/ml بود (نمودار ۶). در مقایسه LC50 سلول های نام برده، رده ی سلولی L 929 از همه کمتر بود و این نشان دهنده ی آن است که این سلول ها نسبت به این عصاره، حساسیت بیشتری نشان می دهند.

بحث و نتیجه گیری

گیاه عروسک پشت پرده (*Physalis alkekengi*) از جمله گیاهان دارویی است که در طب سنتی ایران و اکثر نقاط جهان کاربرد داشته و از آن به عنوان تب بر، فعالیت آنتی توموری، نقش ضد التهابی، ضد درد، ضد باکتری و ضد ویروس استفاده می شود (۲۳). در این تحقیق نتایج اثرات سیتوتوکسیسته عصاره آبی اختلاف



نمودار ۵- تاثیرات گروه های مختلف بررسی شده بر روی سلول های U937. گروه ۱: گروه کنترل می باشد که فقط تحت تاثیر محیط کشت به همراه ۱۰٪ FBS بوده است. گروه های ۲ الی ۴ به ترتیب غلظت های ۳۷/۵، ۷۵ و ۱۱۲/۵ mg/ml از عصاره آبی می باشد.



نمودار ۶- تاثیرات سیتوتوکسیسیته عصاره بر روی سلول های U937. LC 50 برای این ماده به منظور تاثیرات کشندگی بر روی سلول mg/ml ۲۸/۱۲۵ می باشد.

عصاره ی *P.minima* را بر روی DNA سلول های توموری موش گزارش کرده است (۲۴). از آن جایی که فیزالین ها ساختمان شبه استروئیدی دارند، قادرند به راحتی از غشای سلول ها عبور کرده، با گیرنده های استروئیدی داخل سیتوپلاسم پیوند شوند و به رسپتور خود در داخل هسته وارد و به بخشی از DNA متصل شود و در سنتز پروتئین و یا آنزیم اختلال ایجاد کند و موجب بروز بی نظمی در رشد و نمو و تقسیم سلولی گردد. با توجه به تحقیق حاضر و نتایجی که از آن به دست آمد می توان چنین تفسیر نمود در عصاره آبی میوه گیاه عروسک پشت پرده ترکیباتی وجود دارد که دارای ساختمان استروئیدی می باشند که به راحتی می تواند از غشاء سلول عبور کرده و توسط گیرنده های خود به DNA متصل شده و در سنتز و یا مهار سنتز یک پروتئین یا آنزیم، شرکت کنند. با توجه به ساختمان فیزالین F، Chiang و همکارانش در سال ۱۹۹۲ وجود گروه اپوکسی در فیزالین F را محصول ارائه این اثرات معرفی کردند (۷). در پایان می توان امیدوار بود از این گیاه به عنوان یک داروی ضد سرطان و بدون داشتن عوارض جانبی استفاده کرد. البته باید به زمان و مقدار مصرف عصاره توجه داشت.

تشکر و قدردانی

ضمن تشکر از مسئولین محترم دانشگاه آزاد واحد کرج، کلیه هزینه های اجرایی این طرح، از طرف معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج پرداخت شده است.

رقت های مختلفی از عصاره بر روی سلول ها اثر داده شد و نمودار فراوانی زنده ماندن سلول ها پس از تیمار، رسم شده است که بر اساس جدول OD های موجود، تفاوت معنی داری بین سلول های کنترل با دیگر سلول ها که تحت تیمار بودند وجود داشت. میزان کشته شدن سلول های Hela بالا بود. در نتیجه می توان گفت که عصاره آبی گیاه عروسک پشت پرده، خاصیت کشندگی بر روی سلول های سرطانی Hela دارد که به دلیل حضور رسپتور های اختصاصی روی سلول های سرطانی است. برای تایید این نتیجه آزمایش دیگری طراحی شد که رنگ آمیزی هسته و هم چنین سیتوپلاسم بود. در این بررسی با مشاهده سلول های کنترل و تحت تیمار زیر میکروسکوپ، معلوم شد که هسته در سلول های تحت تاثیر عصاره آبی، یا به صورت چند قسمتی در آمده بودند و یا این که هسته کاملاً از بین رفته است که نشان دهنده ی وقوع آپوپتوزیس می باشد. ولی در سلول های کنترل، هسته رنگ شده و کاملاً مشخص بود. در نتیجه خاصیت کشندگی عصاره آبی گیاه عروسک پشت پرده بر روی سلول های U937, L 929, Hela تایید شد. این نتایج نشان می دهند که احتمالاً ترکیبات موجود در عصاره ی آبی گیاه نقش مهمی بر روی رشد و نمو و تقسیم و تمایز سلولی دارند. برخی از محققین برای ترکیبات فیزالین و آلکالوئیدی این گیاه اثر آنتی توموری و آنتی نئوپلاستیکی را گزارش نموده اند (۱۱، ۱۰، ۷، ۶، ۳). این تأثیر ممکن است ناشی از اثر مستقیم ترکیبات موجود در عصاره بر روی DNA باشد، زیرا بررسی های Ma, Fuwa در ۱۹۹۱ اثر مهمی آلکالوئیدهای

topoisomerase – mediated DNA damage. Biochem. Biophys. Res. Commun., 31,159(3); 1128-34.

17. Kawai, M., Ogura, T., Nakanishi, M., Matssura, T. (1988). Structure of Physalin M isolated from *Physalis alkekengi* Var. francheti. Bull. Chem. Soc. Jpn., 61; 2696-2698.

18. Kawai, M. (1987). A new Physalin from *Physalis alkekengi*: structure of Physalin L. Phytochemistry, 26(12); 3313-3317.

19. Kawai, M. (1969). Bitter principles of *Physalis alkekengi* var. francheti : x-ray analysis of 5-acetoxy-6 – bromo hexa hydro physalin A. Tetrahedron letters, 14; 1087-1088.

20. Kawai, M. (1992). Physalins N and O from *Physalis alkekengi*. Phytochemistry, 31(12); 4299-4302.

21. Kawai, M. (1989). Isolation of (25S)-25,27-dihydro physalin A from *Physalis alkekengi* Var. francheti. Chem. Express, 4(2); 97-100.

22. Matssura, T. (1970). Structure of physalin A and B, 13,14-seco-16,24-cyclo-steroides from *Physalis alkekengi* var. francheti. J. Chem. Soc. (c), 664-670.

23. Matssura, T. (1969). Bitter principles of *Physalis alkekengi* var. francheti. Tetrahedron letters, 14; 1083-1086.

24. Ma, Fuwa. (1991). Inhibitory effects of the *Physalis minima* alkaloid on the DNA synthesis of S-180 ascitic tumor cell of mice in vitro. Shaanxi Yixue Zazhi, 20 (11); 689-691.

25. Row, R. L. (1979). New Physalins from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia*. Structure and reactions of Physalins D, I, G and K. Phytochemistry, 19; 1175-1181.

26. Row, R.L. (1978). The structure of Physalins F and J from *Physalis angulata* & *Lancifolia*. Phytochemistry, 17; 1647-1650.

27. Row, R.L. (1980). New physalin from *Physalis angulata* and *Physalis lancifolia* : structure and reactions of Physalins D, I, G and K. Phytochemistry, 19; 1175-1181.

28. Vessal, M., Mehrani, H.A., Hossein Omrani, G. (1991). Effects of an aqueous extract of *Physalis alkekengi* fruit on estrus cycle, reproduction and uterine ceratine kinase BB-isozyme in Rats. Journal of Ethnopharmacology, 34; 69-78.

29. Vessal, M., Mehrani, H.A., Yazdani, G. (1995). Comparison of the effects of an

منابع

۱- تراب زاده، پروین. ۱۳۷۳. پایان نامه کارشناسی ارشد، بررسی اثرات بیولوژیک عصاره آبی گیاه عروسک پشت پرده بر روی رشد و نمو جنین های موش نژاد Balb/c در روز های ۳، ۴، ۵ و ۶ حاملگی.

۲- آئینه چی، یعقوب. ۱۳۶۸. ترجمه روش های نوین تجزیه شیمیایی گیاهان.

3. Alluri, R.R., Miller, R.J., Shelver, W.II., Khalil, W. (1976). Dihydroxyphysalin B : a new Physalin from *Physalis minima* leaves. Lioydia, 39(6); 405-407.

4. Basey, K., McGow, B.A., Woolley, J.G. (1990). Phygrin, an alkaloid from *Physalis* species. Phytochemistry, 31(12); 4173-4176.

5. Basey, K., McGow, B.A., Woolley, J.G. (1973). Alkaloids of *Physalis alkekengi*. Phytochemistry, 12; 2557-2559.

6. Chiang, H.C., Jaw, S.M., Chen, P.M., Kan, W.S. (1992). Antitumor agent, physalin F from *Physalis angulata* L. Anticancer Res, 12(3); 837-843.

7. Chiang, H.C., Chen, P.M. (1992). Inhibitory effects cells in vitro. Anticancer research, 12; 1155-1162.

8. Chen, C.H. (1990). Constituents of formosan folk medicine. Withangulatin A. a new withanolide from *Ohysalis angulata*. Heterocycles, 31(7); 1371-1375.

9. Christen, P. (1986). Withanolides, plant steroids of unusual structure. Parm. Acta, 61/q; 242-246.

10. Dornberger, K. (1986). Investigation on the potential antineoplastic constituents of *Physalis alkekengi* L. Var. francheti Mast. Pharmazie, 41(4); 265-268.

11. Elliger, C.A., Waiss, A.C. (1989). Insect growth inhibitors from *Petunia* and other *Solanaceous* plants. Acs. Symp. Ser, 387(Insectic. Plant origin); 188-205

12. Frisbey, A., Roberts, J.M., Jennigs, J.C., Gollshall R.Y., Lucas, E.H. (1953). Mich. Agric. Exp. Sta. Quart. Bull, 35; 392.

13. Heywood, A. (1985). The flowering plant on the world. London, Croom helm, 229.

14. Harbone, I.B. (1973). Phytochemical Methods. (1979)

15. Hartwell, J.I. (1971). Plants use against cancer A survey. Lioyda, 34; 232.

16. Juang, J.K. (1989). A new compound, withangulatin A, promotes type DNA

aqueous extract of *Physalis alkekengi* fruits and/or various doses of 17B-estradiol on rat estrous cycle and uterine glucose G-phosphate

dehydrogenase activity. Comp. Biochem .
physiol, 112(2); 244-236.

