Iranian Journal of Biological Sciences.2023; 18(2):49-62

Original Article

Iranian Journal of Biological Sciences

https://zisti.iauvaramin.ac.ir

Phytochemical examination of the hydroalcoholic extract of *Polylophium involucratum* (Pall.) Boiss. harvested from the heights of the Javaherdeh - Ramsar and determination of its cytotoxic effects on chronic myeloid leukemiag

Shahab Ojani[1], Naser Montazeri[2,*], Masoud Mohammadi Zeydi[3], Masoud Ghane[4]

1. Department of Chemistry and Medicinal Chemistry, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
2. Associate Professor, Department of Chemistry and Medicinal Chemistry, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
3. Assistant Professor,Department of Chemistry and Medicinal Chemistry, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.
4. Associate Professor, Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran

,Place of research Department of Chemistry and Medicinal Chemistry, Tonekabon Branch, Islamic Azad University

Article Info

Article History:
received 08.07.2023
revised 09.22.2023
accepted 12.18.2023
online 01.02.2024

KeyWords:

Antioxidant effect
Antibacterial activity
Chronic myelogenous leukemia (CML)
Flavonoids
Polylophium involucratum

*Corresponding author:
E-mail address
shahab_ojani@yahoo.com
montazer1350@gmail.com
zedi.65@gmail.com
masoodghane@gmail.com

Abstract

Introduction: Nowadays, the emergence of allergies, side effects of drugs, antibiotic-resistant strains, and the need of body to antioxidants emphasized the importance of herbal medicines.
Aim: Therefore, this project aims to investigate the phytochemical extract of hydroalcoholic of Polylophium involucratum harvested from the heights of the Javaherdeh - Ramsar and determine its cytotoxic effects on chronic myeloid leukemia
Materials and methods: To this end, Polylophium involucratum seeds were collected from the heights of the Javaherdeh, Ramsar, and extracted using a microwave assisted extraction. Then, using quantitative and qualitative phytochemical tests, determining antibacterial activity by disk emission method and finally, assessing the effect of cytotoxicity on the category of K562 cancer cells using the MTT method was investigated
Results: Phytochemical screening of the hydroalcoholic extract of Polylophium involucratum confirmed the presence of secondary metabolites such as flavonoids, terpenoids, coumarins, cardiac glycosides, tannins, phenols, quinones, and saponins. The total amount of phenolic compounds and flavonoid compounds was calculated as 12.93±2 and 7.58±7 mg/ml respectively. The percentage of free radical inhibition was obtained at 57.70±0.5 and the IC50 value was 0.66 µg/ml. The aura diameter of non-growth was observed in Gram-negative Escherichia coli bacteria and Gram-positive Staphylococcus aureus and Bacillus cereus 25, 10, and 10 mm respectively. The results of cellular toxicity also showed that Polylophium involucratum hydroalcoholic extract is dose-dependent, with the highest toxicity effect at a concentration of 50 µg/ml, and the highest bioavailability effect at a concentration of 20 µg/ml in 24 hours, with an IC50 level equal to 50.35±0.03 µg/ml with a meaningful level of 5%.
Conclusion: Based on the obtained results, in general, the use of effective plant compounds is considered one of the most effective strategies in the treatment of cancer, and the secondary metabolites in Polylophium involucratum extract can be a promising method in the treatment of cancer, which requires more studies and experiments are to be done in the future

Cite this article:Ojani S, Montazeri N*, Mohammadi Zeydi M. Ghane MPhytochemical examination of the hydroalcoholic extract of *Polylophium involucratum* (Pall.) Boiss. harvested from the heights of the Javaherdeh - Ramsar and determination of its cytotoxic effects on chronic myeloid leukemia Iranian Journal of Biologiacal Sciences. 2023; 18(2): 49-62

10.30495/ZISTI.2023.1993274.1169
Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch Print ISSN: 1735-4226 Online ISSN: 1727-459X
This is an open access article under the: https://creativecommons.org/license/by-nc/4.0/

مقاله تحقیقی
دانش زیستی ایران
https://zisti.iauvaramin.ac.ir

بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گیاه *گاوزیره* *Polylophium involucratum* (Pall.) Boiss برداشت شده از ارتفاعات جواهرده رامسر و تعیین اثرات سیتوتوکسیک آن بر روی لوسمی میلوئید مزمن

شهاب اوجانی [۱]، ناصر منتظری [۲،*]، مسعود محمدی زیدی [۳]، مسعود قانع [۴]

۱. گروه شیمی و شیمی دارویی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران
۲.دانشیار، گروه شیمی و شیمی دارویی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران
۳. استادیار، گروه شیمی و شیمی دارویی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران
٤. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران
محل انجام تحقیق: گروه شیمی و شیمی دارویی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاداسلامی، تنکابن، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
ارسال ۱۴۰۲/۰۵/۱۶
بازنگری ۱۴۰۲/۰۷/۳۰
پذیرش ۱۴۰۲/۰۹/۲۷
نمایه ۱۴۰۲/۱۰/۱۲

کلمات کلیدی
اثر آنتی اکسیدانی
فعالیت ضد باکتریایی،
لوسمی میلوئید مزمن (CML)
فلاونوئیدها
گیاه *گاوزیره* *Polylophium involucratum*

* نویسنده مسؤل

shahab_ojani@yahoo.com
montazer1350@gmail.com
zedi.65@gmail.com
masoodghane@gmail.com

چکیده

مقدمه: امروزه عواملی مانند بروز حساسیت ها، پیدایش عوارض جانبی داروها، سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و نیاز بدن به ترکیبات آنتی اکسیدان، اهمیت گیاهان دارویی را مورد توجه قرار داده است.

هدف: از این رو، هدف از پژوهش حاضر، بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره برداشت شده از ارتفاعات جواهرده رامسر و تعیین اثرات سیتوتوکسیک آن بر روی لوسمی میلوئید مزمن می باشد.

مواد و روش ها: بدین منظور، دانه های گیاه گاوزیره از ارتفاعات جواهرده رامسر جمع آوری و با استفاده از دستگاه مایکروویو عصاره گیری انجام شد. سپس با استفاده از آزمون های فیتوشیمیایی به صورت کمی و کیفی، تعیین فعالیت ضد باکتریایی به روش انتشار دیسک و در نهایت، ارزیابی اثر سمیت سلولی بر روی رده سلول سرطانی K٥٦٢ با استفاده از روش MTT مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج : غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره وجود متابولیت های ثانویه از قبیل فلاونوئیدها، ترپنوئیدها، کومارین‌ها، کاردیاک گلیکوزیدها، تانن ها، فنول‌ها، کینون‌ها و ساپونین‌ها را تائید کرد. مقدار کل ترکیبات فنولی و ترکیبات فلاونوئیدی به ترتیب ۱۲/۹۳±۲، ۷/۵۸±۷ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه گردید. درصد مهار رادیکال آزاد ۵۷/۷۰±۰/۵ و مقدار IC٥٠ ۰/٦٦ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. قطر هاله عدم رشد، در باکتری گرم منفی اشریشیاکلی و باکتری های گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس به ترتیب ۲۵، ۱۰ و ۱۰ میلی متر مشاهده شد. همچنین نتایج سمیت سلولی نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره، وابسته به دوز می باشد که در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین اثر سمیت مشاهده گردید و در غلظت ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۲٤ ساعت نیز بیشترین اثر توان زیستی مشاهده شد که میزان IC٥٠ آن برابر با ۵۰/۳۵±۰/۰۳ میکروگرم بر میلی لیتر با سطح معناداری ۵٪ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده، به طور کلی یکی از راهکارهای موثر در درمان سرطان استفاده از ترکیبات موثره گیاهی به شمار می رود و احتمالا متابولیت های ثانویه موجود در عصاره گیاه گاوزیره می تواند یک روش امیدبخش در درمان سرطان باشد که نیازمند مطالعات و انجام آزمایشات بیشتر در آینده است.

شیوه آدرس‌دهی این مقاله : شهاب اوجانی ش ، منتظری ن*، محمدی زیدی م، قانع م .بررسی فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره Polylophium involucratum (Pall.) Boiss. برداشت شده از ارتفاعات جواهرده رامسر و تعیین اثرات سیتوتوکسیک آن بر روی لوسمی میلوئید مزمن . مجله دانش زیستی ایران. ۱۴۰۲؛ ۱۸(۲): ۴۹-۶۲

doi 10.30495/ZISTI.2023.1993274.1169

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا **شاپا چاپی:** ۱۷۳۵-٤۲۲٦ **شاپا الکترونیکی:** ۲۷۱۷-٤٥٩X **نویسندگان:** © حق مؤلف

مقدمه:

از آغاز تمدن بشری گیاهان در درمان های دارویی به کار برده شدند. بعضی از مشتقات آن ها مانند آسپرین، رزرپین و گلیکوزیدهای قلبی نقاط اتکای اصلی در دارو درمانی بوده اند. امروزه نیز داروهای گیاهی سهم بزرگی از فرآورده های دارویی تجاری شناخته شده را به خود اختصاص داده اند. کشف داروی ضد سرطان پاکلیتاکسل با نام تجاری تاکسول از گیاه سرخدار نیز تاکیدی بر نقش گیاهان به عنوان منبع جاودانه طب مدرن است. بنابراین بررسی خواص دارویی گیاهان بومی هر منطقه به علت رویکرد دوباره برای مصرف داروها و فرآورده های گیاهی، دارای اهمیت خاصی است. همچنین از سوی دیگر بدن به ترکیبات آنتی اکسیدان نیاز دارد، زیرا آنتی اکسیدان ها با منع فعالیت رادیکال آزاد (آسیب های ناشی از واکنش های اکسیداسیون) یا حذف آن ها و مصون داشتن سلول های بدن از اثرات مخرب این ترکیبات با روند پیری، ابتلا به بیماری های قلبی - عروقی، سکته و همچنین پیشرفت سرطان در اثر آسیب به DNA مبارزه می کنند(۳-۱). در حقیقت یکی از بیماری-هایی که در حال حاضر از عامل های اصلی مرگ و میر در دنیا شناخته می شود، بیماری سرطان است که با وجود تولید داروهای گوناگونی که تا به امروز برای آن معرفی گردیده، همچنان بسیاری از انواع سرطان های رایج، غیر قابل کنترل هستند و از همین روی موجب تحمیل هزینه های سنگین به بیماران و جامعه می شود. تاکنون همچنان اطلاعات دقیقی در مورد عامل اصلی به وجود آمدن و پیشرفت بیماری سرطان در دست نیست اما با توجه به تحقیقات صورت گرفته نشان می دهند که احتمالا عواملی مانند اختلالات متابولیسمی در بافت و اختلالات ایمنی در به وجود آمدن و پیشرفت این بیماری موثر هستند (٤). افزون بر این اختلالات متابولیسمی پارامترهای حائز اهمیتی در ایجاد و دفع رادیکال های آزاد اکسیژن می باشند که قادرند روی سلول های سرطانی اثرگذار باشند. آپوپتوزیس فرآیندی بیوشیمیایی هماهنگ بوده که موجب مرگ سلول می-گردد و در سه مدل آپوپتوزیس، شبه آپوپتوزیس و شبه نکروز تقسیم بندی می شود (٦-٥). در واقع فرآیند آپوپتوزیس مهم-ترین وضعیت مرگ برنامه ریزی شده است که نقشی تعیین کننده در تکامل، سیستم ایمنی و زندگی طبیعی موجودات پرسلولی را بر عهده دارد و شایان ذکر است که Bcl-2، P53، Bax و چندین ژن دیگر در تولید آپوپتوزیس نقش به سزایی دارند. در حقیقت عامل به وجود آمدن بسیاری از سرطان ها و دیگر بیماری ها، برهم خوردن سرعت وقوع آپوپتوزیس به طور افزایشی و یا کاهشی می باشد. بنابراین، شناسایی این فرآیند سلولی و طریقه های کنترل آن در کسب داده های ضدسرطانی و ضدالتهابی کاملا مفید است. در حال حاضر درمان های معمول سرطان در برگیرنده جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی بوده که بیشتر مواقع موجب مرگ سلول های سالم هم می شوند که این موضوع ممکن است سبب تاثیرات سمی و عوارض جانبی در بیمار گردد (۹-۷). در این راستا، لوسمي ميلوئيدي مزمن، بيماري بدخيم خوني بوده که با خود نوعي اختلال کروموزومي ايجاد می کند که در این بیمارها، امکان دارد نشانگان ویژه ای به چشم نخورد، ولی بیشتر علائمی مانند خستگی، تنگی نفس، اختلالات مرتبط با خواب، کم شدن وزن به علت بی اشتهایی، کم خونی و غیره گزارش گردیده است. در بسیاری از بیمارانی که به لوسمي ميلوئيدي مزمن ابتلا می یابند، کلون مربوط به يك سلول بنيادي که حامل کروموزوم فيلادلفيا می باشد، گسترش پیدا می کند. در حقیقت، عامل این بیماري اکثرا به علت ژن ادغام یافته BCR-ABL بوده که در سلول ها ي بنيادي خون ساز به وجود آمده و به عنوان کروموزوم فيلادلفيا شناخته مي شود. به صورت عمده، کروموزوم فيلادلفيا همان کروموزم کوتاه شده ۲۲ می باشد که از انتقال متقابل بازوي بلند کروموزوم ۹ (حاوی ABL) و ۲۲ (حاوی BCR) ایجاد می شود. جابجايي مذکور، ژن ادغام یافته، پروتئین BCR-ABL را ایجاد می کند که عملکرد تیروزین کینازی این پروتئین موجب القای لوسمي در سلول هاي بنيادي خون ساز می شود (۱۱-۱۰). درمان دارویی از جمله اصلی ترین پایه های درمان بیماری سرطان است و از آنجایی که در سال های گذشته، بالا رفتن آمار مرگ و میر به وسیله سرطان ها رو به افزایش بوده و از سوی دیگر شیوه های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم های پیشرفته سرطان با نقص های

بسیار همراه است، نیاز به پیدا کردن روش های تازه جهت کنترل بیماری سرطان به وجود آمده است که از جمله این شیوه ها، بهره بردن از مواد موثره گیاهان (متابولیت های ثانویه) می باشد (۱۳). حدودا نزدیک بر بیست و پنج هزار ماده شیمیایی گیاهی (متابولیت ثانویه) در گیاهان وجود داشته که تاثیرات و ویژگی های بیولوژیک فوق العاده ای دارند (۱۶-۱۴). در این راستا، از پرکاربردترین گیاهان در بین گیاهان دارویی می توان به خانواده چتریان اشاره نمود. این خانواده دارای ۲۷۵ جنس و ۲۸۵۰ گونه می باشد که عموما علفی، یک ساله و یا چند ساله است. در این میان، گاوزیره با نام علمی Polylophium involucratum (Pall.) Boiss. گیاهی پایا از تیره چتریان می باشد (۱۷). این گیاه به عنوان ادویه در غذا، ترشیجات و همچنین جهت محافظت از گوشت کاربرد دارد. Scheffer و Schoenmakers در طی یک مطالعه ترکیبات اسانس دانه های گاوزیره را بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که گاما- ترپینن (۲۶ درصد)، کومین آلدئید (۱۲درصد)، سابینن (۱۲ درصد)، پارا - سیمن (۱۱ درصد) و ژرانیل استات (۱۱ درصد) فراوان ترین اجزاء این اسانس هستند که هر یک از آن ها دارای خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی قابل توجهی می باشند. (۱۸). در همین راستا، ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گیاه گاوزیره و بررسی اثرات بیولوژیک آن توسط Verdian Rizi و Hadjiakhoondi در سال ۲۰۰۷ انجام گرفت. بدین منظور، ترکیبات شیمیایی اسانس دانه گیاه گاوزیره را با روش های کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی بررسی کردند و بر اساس نتایج مشخص شد که اجزاء اصلی اسانس این گیاه را ترکیباتی نظیر لیمونن تشکیل می دهند و همچنین نتایج حاصل از اثرات اسانس دانه گیاه گاوزیره بر روی لاروهای Anopheles stephensi و Culex pipiens حاکی از آن است که اسانس دانه گیاه گاوزیره به خوبی لاروهای آنوفل و کولکس را از بین می برد به طوری که می توان از آن به عنوان یک روش مبارزه با ناقلین بیماری مالاریا که امروزه از بیماری های مهلک و گسترده است، استفاده نمود (۱۹). Kashipaz Ha و Nematollahi در سال ۲۰۱۵ نیز مطالعه ا ی بر روی مواد فرار موجود در دانه های گیاه گاوزیره انجام دادند. در این مطالعه، اجزاء فرار گیاه با روش میکرواستخراج فازجامد از فضای فوقانی استخراج گردید. سپس به وسیله ی کروماتوگرافی گازی و کروماتوگرافی گازی - طیف سنج جرمی تحت آنالیز قرار گرفته و اجزاء آن شناسایی شدند. نتایج نشان داد که اجزاء اصلی این ترکیب به ترتیب گاما- ترپینن (۲۰/۷۱ درصد)، سابینن (۱۴/۸۶ درصد)، پارا - سیمن (۱۲/۹۱ درصد) و برنیل آنجلات (۱۰/۲ درصد) می باشند (۲۰). Ayoubi و همکاران نیز در سال ۲۰۱۸ اثر ضد باکتریایی اسانس گیاه گاوزیره را بر روی باکتری های دهان و دندان مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش، اسانس گیاه گاوزیره بر روی ۲ گروه از باکتری های دهانی شامل Streptococcus mutans و استرپتوکوکوس سانگوئیس با روش دیسک دیفیوژن سنجیده شد. نتایج حاصل از پژوهش آن ها نشان داد که اسانس گیاه گاوزیره تاثیر بیشتری بر روی استرپتوکوکوس سانگوئیس نسبت به استرپتوکوکوس موتانس دارد. به طوری که بیشترین هاله عدم رشد با مقدار ۱۸ تا ۲۷ میلی متر در مورد استرپتوکوکوس سانگوئیس مشاهده شد و در نهایت به این نتیجه رسیدند که خواص ضد باکتریایی اسانس گیاه گاوزیره نسبت به داروهای شیمیایی بیشتر بوده است (۲۱). در سال ۲۰۱۶ نیز در طی پژوهشی غربالگری فیتوشیمیایی عصاره آبی دانه گیاه گاوزیره برداشت شده از ارتفاعات رامسر وجود متابولیت های ثانویه نظیر فلاونوئیدها، کومارین ها، کینون ها، کاردیاک گلیکوزید ها، فنول ها، ترپنوئید ها و فلوباتانن ها را تائید کرد و مشخص گردید که گیاه گاوزیره می تواند در زمینه های داروسازی، فارماکولوژیکی و فیتوپاتولوژی مورد استفاده قرار بگیرد (۲۲). در این راستا، با توجه به بومی بودن گیاه گاوزیره و همچنین تکمیل مطالعات انجام شده در گذشته، شناسایی هر چه بیشتر و بهتر خصوصیات بیولوژیک عصاره گیاه گاوزیره امری ضروری به نظر می رسد. از این رو، هدف از پژوهش حاضر بررسی خواص آنتی اکسیدانی، ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره برداشت شده از ارتفاعات جواهرده رامسر و تعیین اثرات سیتوتوکسیک آن بر روی لوسمی میلوئید مزمن می باشد.

مواد و روش ها

مشخصات منطقه مورد پژوهش

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) در تیر ماه سال ۱۴۰۰ جمع آوری شدند و پس از شناسایی توسط مسئول هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی - واحد تنکابن با کد ۷۵۴ ثبت گردید.

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره با استفاده از دستگاه مایکروویو

مقدار ۳۰ گرم از پودر آسیاب شده گیاه گاوزیره به همراه ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۵ درصد داخل ارلن اضافه و سپس دهانه آن پوشانده شد. بدین منظور، ظرف حاوی پودر گیاه و حلال، به مدت ۱۰ دقیقه به فاصله ۳ دقیقه یک بار، در درون دستگاه مایکروویو (شرکت سازنده: Samsung، مدل دستگاه: GE۲۸۰S) با توان ۱۰۰ قرار گرفت و این مرحله سه بار تکرار شد. پس از صاف کردن عصاره بدست آمده به کمک کاغذ واتمن شماره ۱، با استفاده از دستگاه روتاری (شرکت سازنده: Efficient، مدل دستگاه: LABOROTA ۴۰۰۱) تغلیظ گردید و در نهایت عصاره خشک توزین و تا زمان انجام آزمایشات در دمای ۴+ درجه سانتی گراد در یخچال (شرکت سازنده: Samsung، مدل دستگاه: BAEW RTV۹۰) نگهداری شد.

غربالگری فیتوشیمیایی مقدماتی (روش کیفی)

به منظور شناسایی متابولیت های ثانویه موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره بر اساس فارماکوپه از روش های موجود نظیر Trease and Evans "با کمی تغییر" استفاده شد (۲۳).

سنجش مقدار فنول کل به روش رنگ سنجی فولین - سیو کا لتیو

مقدار کل ترکیبات فنولی موجود در عصاره از طریق رنگ سنجی به روش فولین - سیوکالتیو مورد بررسی قرار گرفت (۲۴). سپس مقدار فنول کل بر اساس معادله خط منحنی استاندارد (R۲ = ۰/۹۷۹ ، X ۴۷/۰۰ = Y) بر حسب میلی گرم گالیک اسید بر گرم عصاره گزارش گردید.

سنجش مقدار فلاونوئید کل به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید

مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره با استفاده از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۵). در نهایت، مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی بر اساس معادله خط منحنی استاندارد (R۲ = ۰/۹۹۵ ، X ۸/۲۶ = Y) بر حسب میلی گرم روتین (سیگما آلدریچ، آلمان) بر گرم عصاره محاسبه گردید.

تعیین خواص آنتی اکسیدانی به روش DPPH۰

فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق اندازه گیری ظرفیت مهار رادیکالی ۲ و ۲ دی فنیل - ۱و۱ - پیکریل هیدرازیل مورد بررسی قرار گرفت (۲۷-۲۶). سپس بر اساس معادله خط منحنی استاندارد (R۲= ۰/۹۹۸ ، X ۴۴/۴۲ = Y) محاسبه و به صورت مقدار IC۵۰. گزارش گردید.

بررسی فعالیت ضدباکتریایی به روش انتشار دیسک

ابتدا باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس و اشریشیاکلی به ترتیب با کد سوش های میکروبی ATCC ۲۹۲۱۳ ، ۱۴۵۷۹ و ۲۵۹۲۲ از مرکز کلکسیون های میکروبی صنعتی ایران خریداری شد. سپس، آزمون فعالیت ضد باکتریایی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره ، بر روی دو باکتری گرم مثبت و همچنین یک باکتری گرم منفی با استفاده از روش انتشار دیسک و بر اساس استاندارد NCCLS ۲۰۰۶ انجام گردید (۲۸). برای این منظور، در ابتدا سوسپانسیونی معادل نیم مک -فارلند(CFU/ml ۱۰۳×۱,۵) از تمامی سویه های باکتری تهیه شد. در مرحله بعد با استفاده از ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون تهیه شده، کشت باکتری ها به صورت یکنواخت در سطح محیط مولر هینتون آگار انجام شد. سپس دیسک های استریل در غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر از نمونه غوطه ور شدند. در نهایت دیسک های آماده شده با فاصله مشخصی از یکدیگر در داخل پلیت ها قرار گرفتند. پس از این مرحله، پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه

شـــدند. ســـپس قطر هالـــه عدم رشـــد بر اســـاس میلی متر ارزیابی و ثبت شـــد. شـــایان ذکر اســـت که در این سنجش از آنتی بیوتیـــک آمپی ســـیلین (ســـیگما آلدریـــچ، آلمان) به عنـــوان کنترل اســـتفاده گردید.

رده سلولی و نحوه کشت سلولی

رده سلولی استفاده شـــده در این پژوهش، لوسمي ميلوئيدي مزمن مدل K٥٦٢ می باشـــد که از بانک ســـلولی انســـتیتو پاســـتور با کـــد C١١٢ تهیه شـــد . بدین منظور، ســـلول ها در فلاسک T٢٥حاوی محیط کشـــت RPMI-١٦٤٠ (سیگما آلدریـــچ، آلمان) غني شـــده بـــا ١٠ درصـــد سرم جنین گاوی (ســـیگما آلدریچ، آلمـــان) و ١ درصـــد محلـــول آنتي بيوتيك پني ســـيلين و آنتي بيوتيك استرپتومايســـين (ســـيگما آلدريچ، آلمـــان) "بـــرای جلوگیری از رشـــد باکتری های گـــرم مثبت و گـــرم منفی" درون انکوباتور در دمای ٣٧ درجه ســـانتي گراد، CO٢ ٥ درصد و رطوبت ٩٥ درصد کشـــت و پاساژ داده شد.

ارزیابی سمیت سلولی به روش آزمون رنگ سنجی MTT

یکی از پرکاربردترین آزمون های ســـلولی MTT اســـت که بـــه عنوان یک مشـــخصه بـــرای زنـــده بودن ســـلول، میزان بقاء آن را مشـــخص مـــی کند. به طور معمـــول از این آزمون برای بررســـی ســـمیت ســـلولی اســـتفاده می کنند. اســـاس ایـــن روش تبدیل نمـــک تترازولیوم زرد رنگ یـــا همان معرف MTT (ســـیگما آلدریچ، آلمان)، به کریســـتال هـــای فورمازان بنفـــش رنگ در ســـلول هـــای فعال اســـت. بدیـــن منظور، تعداد ١٠٤ ســـلول بـــه هر چاهـــک از پلیـــت ٩٦ خانه ای اضافه گردید و پس از گذشـــت ٢٤ ســـاعت انکوباســـیون، از عصـــاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره غلظت هـــای ١٠، ٢٠، ٣٠، ٤٠ و ٥٠ میکروگـــرم بر میلی لیتر تهیـــه و به مدت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ســـاعت بر روی رده ســـلولی K٥٦٢ تیمار شد. پس از طی زمان های مذکـــور ١٠ میکرولیتر از محلـــول MTT به همراه ١٠٠ میکرولیـــتر محیط کشـــت پایـــه به هر چاهـــک اضافه گردید. ســـپس به مدت ٤ ســـاعت در تاریکی درون انکوباتور CO٢ با دمـــای ٣٧ درجه ســـانتی گراد قرار داده شـــد. بعد از گذشـــت این زمان به هر چاهـــک ١٠٠ میکرولیتر DMSO اضافه گردید و ســـپس مقدار جذب نوری بر حســـب شـــدت رنـــگ فورمـــازان در طول مـــوج ٥٤٠ نانومتر با اســـتفاده از دســـتگاه خوانش گـــر الایزا (مـــدل دســـتگاه:-BioTec ELx ٨٠٠) اندازه گیـــری شـــد و در نهایت نیز بـــه منظور تبدیل چگالـــی نـــوری (Optical Density) به درصد ســـلول های زنده از فرمـــول زیر اســـتفاده گردید (٣٠-٢٩).

درصد توانایی زیستی = نمونه OD / شاهد OD × ١٠٠

در ایـــن آزمون غلظتـــی از ترکیبات مـــورد آزمایش که درصد حیات ســـلولی را بـــه نصف تقلیل می دهد بـــه عنوان IC٥٠ در نظر گرفته شـــد.

محاسبات آماری

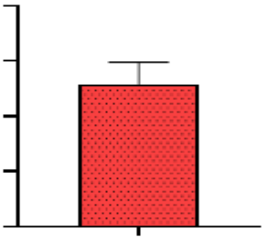
اطلاعات بدســـت آمده به صورت (انحراف معیار± میانگین) برای ســـه بار تکرار محاســـبه و از نرم افزار SPSS نسخه ٢٦ به منظور تجزیه و تحلیل داده ها اســـتفاده شـــد.

نتایج

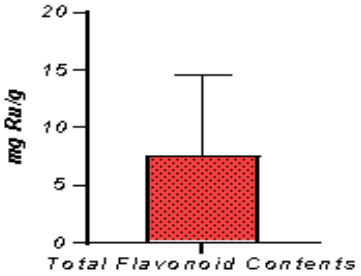
غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره حضور فلاونوئید ها، ترپنوئید ها، کومارین ها، کاردیاک گلیکوزید ها، تانن ها، فنول ها، کینون ها و ساپونین ها را تائید کرد. همچنین مقدار کل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره به ترتیب ٢± ١٢/٩٣ و ٧/٥٨±٧ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد مطابق با شکل های (١) و (٢) نتایج حاکی از این است که مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره بیشتر از مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی می باشد. همچنین، بر اساس شکل (٣) نتایج درصد مهار رادیکال آزاد مربوط به عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره ٠/٥ ± ٥٧/٧٠ و مقدار IC٥٠ نیز ٠/٦٦ میکرو گرم بر میلی لیتر بدست آمد. شایان ذکر است که در این سنجش از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید که مقدار IC٥٠ آن ٠/٠١١٦ میکرو گرم بر میلی لیتر گزارش گردید.

شکل (٤) مقدار قطر هاله عدم رشد در عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره را نمایش می دهد که مقدار قطر هاله عدم رشد، در باکتری گرم منفی نسبت به باکتری های گرم مثبت بیشتر است همچنین مقدار قطر هاله عدم رشد آنتی بیوتیک آمپی سیلین ٦ میلی متر گزارش شد

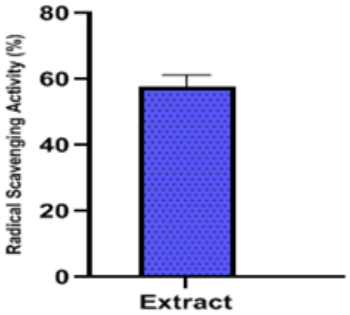
در ادامه، اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره بر روی رده سلول سرطانی K٥٦٢ مربوط به لوسمی میلوئید مزمن با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت و درصد زنده بودن سلول ها پس از گذشت ٢٤، ٤٨ و ٧٢ ساعت اندازه گیری شد. مطابق با شکل (٥) نتایج سمیت سلولی نشان داد که عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره، وابسته به دوز می باشد که در غلظت ٢٠ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ٢٤ ساعت نیز بیشترین اثر توان زیستی (بیشترین زنده مانی) مشاهده شد که میزان IC٥٠ آن برابر با ٠/٠٣±٥٠/٣٥ میکروگرم بر میلی لیتر با سطح معناداری ٥٪ تعیین گردید.



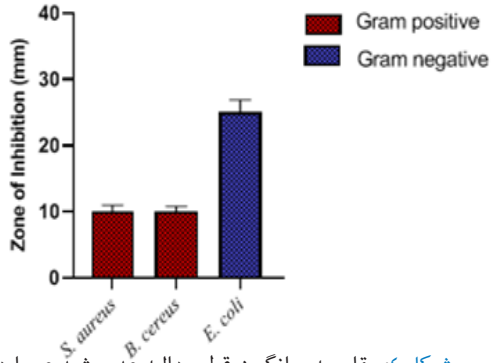
شکل ١: مقدار کل ترکیبات فنولی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره



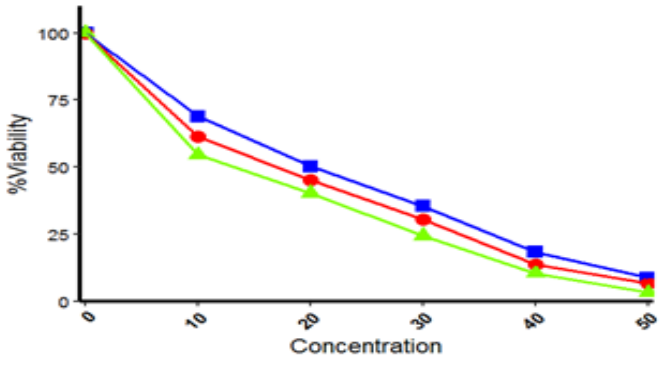
شکل ٢: مقدار کل ترکیبات فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره



شکل ٣: درصد مهار رادیکال آزاد عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره



شکل ٤: مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره بر روی باکتری¬های گرم مثبت و منفی



شکل ٥: درصد توان زیستی عصاره هیدروالکلی¬ گیاه گاوزیره بر روی رده¬ سلولی سرطانی K٥٦٢

بحث

امروزه با توجه به عوارض جانبی و اثرات نامطلوب داروهای شیمیایی بر سلامتی انسان، بسیاری از مردم از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری های خود استفاده می کنند. در واقع انسان ها و عصاره های گیاهی ترکیبات موثره متنوعی دارند و می توانند نیازهای اولیه و مواد لازم برای درمان بیماری های مختلف از جمله سرطان را فراهم کنند (۳۱). در لوسمی میلوئید مزمن سلول های مغز استخوان تحت تاثیر قرار دارند و به نوعی بیماری روند مزمن دارد. این بیماری اغلب بزرگسالان را درگیر می کند. وقوع این بیماری سالانه ۱ تا ۳ نفر در هر۱۰۰۰۰۰ نفر است و به نظر می رسد که بیشترین مطالعه درباره بدخیمی های انسان روی این بیماری صورت گرفته است (۳۲).

از دیدگاه بالینی، لوسمی میلوئید مزمن در سه فاز مزمن، سرعت بالا و بلاستیک ظهور می یابد. در حقیقت، منظور از درمان لوسمی میلوئید مزمن کنترل بیمارها در حالت و یا فاز مزمن و ممانعت از رشد بیماری و کم شدن اثرات سمیت داروهای مصرفی معمول این بیماران می باشد. امروزه ایماتینیب مسیلات به عنوان رایج ترین و بروزترین درمان در نظر گرفته می شود ولی درمان قطعی تر پیوند مغز استخوان می باشد که مسئله جالب توجه این است که بالاترین تاثیر درمانی روی سطوح سلول سرطانی K۵۶۲ به دلیل ویژگی های ترکیبات آنتی اکسیدانی موجود در عصاره های گیاهی بوده است (۳۳). آنچه مسلم است این است که در مفردات پزشکی یک گیاه معمولا از دو نظر مورد بررسی قرار می گیرد که یکی از نظر اسانس و دیگری از نظر عصاره است. در این بخش برای این که گیاهان مترادف با گیاه گاوزبره از زوایای گوناگون مورد بحث قرار گیرند بهتر است اسانس این دسته از گیاهان نیز بررسی شود. از این رو، در این بخش به برخی از تحقیقات و گزارشات مربوط به اسانس و عصاره اشاره می شود.

بررسی عصاره Prangos platychlaena توسط Ulubelen و همکاران در سال ۱۹۹۵ انجام شد. در این پژوهش ابتدا کومارین های عصاره گیاه به وسیله دستگاه های IR، UV، NMR و MS تجزیه و شناسایی شد و پس از تعیین ساختمان اجزاء حاصله، فعالیت ضد میکروبی هر یک از ترکیبات ارزیابی شد که نتایج آن نشان داد که بیشترین اثر ضد میکروبی بر روی اشریشیاکلی و کاندیدا آلبیکنس مشاهده شده متعلق به ترکیبات کومارینی از جمله Imperatorin می باشد (۳۴).

Massumi و همکاران در سال ۲۰۰۷ در طی پژوهشی خواص ضد باکتریایی اسانس دانه Prangos ferulacea (L.) Lindl. را با استفاده از دو روش دیسک دیفیوژن و حداقل غلظت مهار کنندگی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از پژوهش آن ها نشان داد که اسانس دانه Prangos ferulacea دارای اثرات ضد باکتریایی قابل توجهی می باشد (۳۵).

Sharma و همکاران در سال ۲۰۱۳ عصاره های اتری، اتیل استاتی، متانولی و آبی اندام هوایی گیاه Prangos ferulacea را از لحاظ غربالگری فیتوشیمیایی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از غربالگری فیتوشیمیایی عصاره اتری حضور فلاونوئیدها و استروئیدها، عصاره اتیل استاتی حضور آلکالوئیدها، کربوهیدرات ها، تانن ها، فنول ها و استروئیدها و عصاره متانولی حضور آلکالوئیدها، کربوهیدرات ها، کاردیاک گلیکوزیدها، آنتراکینون گلیکوزیدها، تانن ها، فنول ها و فلاونوئیدها و عصاره آبی نیز آلکالوئیدها، کربوهیدرات ها، آنتراکینون گلیکوزیدها، تانن ها، فنول ها و فلاونوئیدها را نشان داد (۳۶).

Ojani نیز در سال ۲۰۱۵ در طی پژوهشی که تحت عنوان بررسی کمی و کیفی اسانس و عصاره الکلی دانه گاوزبره برداشت شده از ارتفاعات رامسر با استفاده از تابش مایکروویو و استفاده از آن جهت سنتز نانو ذرات نقره در قالب پایان نامه داشت نشان داد که بیشترین درصد ترکیبات اسانس را، گاما - ترپینن (۲۰/۰ درصد) به خود اختصاص داده بود و از طرفی در پژوهش مذکور، برای اولین بار با استفاده از عصاره آبی دانه گیاه گاوزبره به عنوان واکنشگر کاهنده جهت سنتز نانوذرات نقره استفاده شد که نتایج بدست آمده از پراش پرتوی ایکس، میکروسکوپ الکترونی عبوری و میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی نشان داد که نانوذرات سنتز شده با ساختار کریستالی مکعبی وجوه مرکز دار، دارای شکل کروی و با اندازه ۱۰ و ۲۵ نانومتر تشکیل شده اند که خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی قابل توجهی را دارند (۳۷).

همچنین در همین راستا، سنتز نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 پوشش دار جهت حذف سرب و کادمیم از آب به روش سبز با استفاده از عصاره آبی دانه گیاه گاوزبره را Nematollahi و همکارانش در سال ۱۳۹۵ با موفقیت انجام دادند که نتایج حاصل از پژوهش آن ها نشان داد که

عامل دار کردن نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4با استفاده از عصاره آبی دانه گیاه گاوزیره، تمایل ایجاد واکنش و تشکیل پیوند بین فلزات سنگین و اکسید آهن را افزایش داده است و عامل بهبودی این روند گروه عاملی (-OH) می باشد و شایان ذکر است که در پژوهش مذکور اندازه نانوذرات سنتز شده ۶۰-۵۲ نانومتر تعیین شده است (۳۸). عصاره اتانولی گیاه گاوزیره نیز با روش خیساندن تهیه و جهت شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفت. در این مطالعه فلاونوئید ها، ترپنوئید ها، کومارین ها، کینون ها و ... شناسایی شدند که هر یک از آن ها خواص بیولوژیک فوق-العاده ای را دارند (۳۹).

Bahrami و همکاران در سال ۲۰۱۹ در طی مطالعه ای که بر روی اسانس گاوزیره نشان دادند که استفاده از ۱۰ درصد نانو امولسیون اسانس گیاه گاوزیره جهت کاهش تعداد میکروب ها و افزایش مدت زمان نگهداری میگو ببری سبز توصیه می شود (۴۰).

Oghbayi و همکاران در سال ۲۰۲۲ در طی پژوهشی اثرات ضد میکروبی فیلم های ژلاتین نانوسلولز حاوی درصدهای مختلف کتیرا و اسانس های گاو زیره و کاکوتی کوهی بر برخی باکتری های بیماری زای غذازاد را مورد بررسی قرار دادند. در رابطه با اثر ضد میکروبی فیلم ها مشخص گردید فیلم ژلاتین نانوسلولز به تنهایی یا به همراه کتیرا و یا به همراه ۰/۳ درصد اسانس کاکوتی کوهی بر روی هیچکدام از میکروارگانیسم های مورد مطالعه اثری نداشت. همچنین بیشترین میزان هاله عدم رشد در رابطه با فیلم های ژلاتین حاوی ۰/۹ درصد اسانس کاکوتی کوهی و ۰/۹ درصد اسانس گاوزیره در رابطه با لیستریا مونوسیتوژنز به میزان ۲۲/۲۲ میلی متر مشاهده گردید. بنا بر یافته های این مطالعه، فیلم ژلاتین نانوسلولز حاوی اسانس کاکوتی کوهی، اسانس گاوزیره و کتیرا با توجه به خواص ضد میکروبی مطلوبشان می توانند در مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۴۱).

در همین راستا، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که غربالگری فیتوشیمیایی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه گاوزیره وجود متابولیت های ثانویه از قبیل فلاونوئید ها، ترپنوئید ها، کومارین ها، کاردیاک گلیکوزید ها، تانن ها، فنول ها، کینون ها و ساپونین ها را تائید می کند که از لحاظ غربالگری فیتوشیمیایی با نتایج سایر پژوهشگران هم خوانی دارد. همچنین قطر هاله عدم رشد نیز، در باکتری اشریشیاکلی و باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس به ترتیب ۲۵، ۱۰ و ۱۰ میلی متر مشاهده شد که از نظر فعالیت ضد باکتریایی با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت بیشتری دارد. نکته ای که در رابطه با این مطالعه وجود دارد این است که بیشتر تحقیقات انجام شده بر روی اسانس گیاه گاوزیره انجام شده است که بیشتر با محوریت شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس و تعیین فعالیت ضد میکروبی آن بوده و مطالعاتی که بر روی عصاره گیاه مذکور صورت گرفته بیشتر در رابطه با سنتز نانوذرات نقره و نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4و همچنین سنجش های فیتوشیمیایی جهت شناسایی متابولیت های ثانویه به صورت کیفی بوده است. شایان ذکر است که تاکنون پژوهشی در مورد بررسی سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه گاوزیره بر روی لوسمی میلوئید مزمن صورت نگرفته است، لذا پژوهش حاضر اولین مطالعه در این زمینه می باشد و نتایج بدست آمده از آن با سایر مطالعات انجام شده بر روی ترکیبات موثره طبیعی مانند سلاسترول و گیاهان دارویی: پونه، آلوئه ورا، پیاز یزدی ، پیاز تابستانه لرستانی و پروبیوتیک های ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی مقایسه شده است.

Aslani و همکارانش در سال ۲۰۱۴ پژوهشی را با عنوان بررسی اثر سمیت سلولی عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی بر رده سلولی سرطان خون (K۵۶۲) انجام دادند. بر اساس نتایج، مشخص شد که عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی، بالاترین اثر سمیت سلولی را در IC_{50}=۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر و ۷۲ ساعت پس از تیمار، از خود نشان داد. به عبارت دیگر، عصاره هیدروالکلی گیاه پونه در مرحله قبل از گل دهی اثر سمیت سلولی وابسته به دوز و زمان را بر رده سلولی K۵۶۲ از خود بروز داده است (۴۲). در بررسی که Mokriani و همکاران در سال ۲۰۱۵ با عنوان مهار رشد رده سلول سرطانی K۵۶۲ با استفاده از دیواره سلولی استخراج شده از پروبیوتیک های ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی به همراه نانوذرات روی انجام دادند. نتایج نشان داد که دیواره سلولی مخمر ساکارومایسس بولاردی در مقایسه با دیواره سلولی ساکارومایسس سرویزیه به طور معنی-داری سبب

می شود. همچنین نانوذرات روی نیز به طور معنی داری قادر هستند رشد رده سلول سرطانی K٥٦٢ را در شرایط آزمایشگاهی مهار نمایند. با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که همراه نمودن دیواره سلولی مخمرهای ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی با نانوذرات روی می تواند سبب مهار رشد رده سلول سرطانی K٥٦٢ در شرایط آزمایشگاهی گردد (٤٣).

در واقع در رابطه با نانوذرات تحقیقات مختلف نشان داده است که به دلیل ریز بودن قادرند به درون سلول ها نفوذ کرده و سبب القاء تغییرات در عملکرد سلول های سرطانی شوند. به طوری مکانیسم های احتمالی مختلفی برای اثرگذاری نانوذرات بر سلول های سرطانی پیشنهاد شده است که نانوذرات می توانند با القاء آسیب به DNA ، تولید گونه های فعال اکسیژن، القاء اتوفاژی، تغییر در پتانسیل غشاء میتوکندی، نشت LDH ، اثرگذاری بر محتوای MDA و فعالیت آنزیم های آنتی اکسیدان، رشد سلول های سرطانی را مهار کنند (٤٤). در طی پژوهشی که Dorosti و همکارانش در سال ۲۰۱۷ با عنوان بررسی و مقایسه اثرات ضد سرطانی عصاره متانولی پیاز یزدی و پیاز تابستانه لرستانی (بر روی رشد سلول های سرطانی HeLa و K٥٦٢ انجام دادند. نتایج بیولوژیکی بدست آمده، در محیط آزمایشگاهی حاکی از آن است که سمیت عصاره های متانولی گیاهان مطالعه شده در این پژوهش وابسته به دوز می-باشد و افزایش غلظت موجب کاهش معنی دار سلول های سرطانی می شود. بر اساس داده های بدست آمده بیشترین سمیت ٤٨ ساعت پس از افزایش عصاره این گیاهان اتفاق می افتد. همچنین آزمون MTT نشان داد حساسیت رده سلول سرطانی K٥٦٢ به عصاره پیاز یزدی بیشتر از عصاره پیاز تابستانه لرستانی بود. بدین صورت که، پیاز یزدی با IC٥٠ برابر ٥٧٦/٧١ میکروگرم بر میلی لیتر در برابر سلول K٥٦٢ اثر سمیت بیشتری در مقایسه با پیاز تابستانه لرستانی با IC٥٠ برابر ٦٢١/٢٧ میکروگرم بر میلی لیتر نشان داد (٤٥).

در طی مطالعه ای که Dadakhani و همکارانش در سال ۲۰۱۸ با عنوان تاثیر ضد سرطانی سلاسترول بر روی سلول های سرطانی رده K٥٦٢ داشتند. طبق بررسی های آماری، داده های بدست آمده از آزمون MTT نشان داد که رشد سلول های تیمار شده با غلظت های مختلف سلاسترول به صورت معناداری کاهش پیدا کرده است که این تاثیر مهاری سلاسترول وابسته به غلظت و مدت زمان تیمار است. لذا بیشترین تاثیر در غلظت ٨ میکرومولار و ٧٢ ساعت رشد رده سلول سرطانی K٥٦٢ مشاهده و غلظت IC٥٠ سلاسترول برابر با ٤ میکرومولار بدست آمد. شایان ذکر است سلاسترول که از ریشه گیاه Tripterygium wilfordii استخراج می شود یک تری ترپنوئید است که در درمان های سنتی چین کاربرد دارد (٤٦). در پژوهشی که Shaddelو همکارانش در سال ۲۰۱۹ با عنوان بررسی اثرات عصاره پوسته عصاره آلوئه ورا بر روی رده سلولی سرطانی K٥٦٢ و سلول های PBMC انجام دادند. نتایج حاصل از داده ها حاکی از کاهش درصد زنده مانی هر دو رده سلولی اریترولوسمی و سلول های تک هسته ای خون محیطی عادی بعد از تیمار با عصاره به صورت وابسته به غلظت بودند، اما باید خاطر نشان کرد که سمیت عصاره پوسته آلوئه ورا برای سلول های تک هسته ای خون محیطی به صورت قابل ملاحظه ای بیشتر از سلول های اریترولوسمی است (٤٧).

در این راستا، نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان داد که در غلظت ٥٠ میکروگرم بر میلی لیتر بیشترین اثر سمیت (کمترین زنده مانی) مشاهده گردید و در غلظت ٢٠ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ٢٤ ساعت نیز بیشترین اثر توان زیستی (زنده مانی) مشاهده شد که میزان IC٥٠ آن برابر با ٠/٠٣±٥٠/٣٥ میکروگرم بر میلی لیتر با سطح معناداری ٥٪ بدست آمد که از نظر اثر سمیت سلولی وابسته به دوز می باشد و از این لحاظ با نتایج سایر پژوهشگران هم خوانی دارد. در حقیقت، نقطه نظر مشابه پژوهش ما با سایر مطالعات انجام شده، اثرات معنادار سمیت سلولی عصاره و ترکیبات موثره می-باشد که با افزایش دوز، سمیت سلولی نیز افزایش می یابد و در واقع وابسته به دوز است. در نهایت بر اساس نتایج بدست آمده در پژوهش حاضر، این طور به نظر می رسد که پس از تیمار سلول ها با عصاره گیاه، متابولیت های ثانویه وارد سلول سرطانی شده و احتمالا به طور مستقیم بر مسیرهای پیام رسانی و یا DNA سلول اثر می گذارند و همانطور که قبل تر اشاره شد تحقیقات اخیر نشان داده است که اکثر پژوهشگران به دنبال یافتن ترکیبات ضد سرطانی که اثرات خود را از طریق آپوپتوزیس نشان می دهند، می باشند. در نهایت، شایان ذکر است

کـه تفـاوت در نتایـج حاصـل از پژوهـش هـا در زمینـه بررسـی فعالیـت آنتی-اکسـیدانی، ضـد باکتریایـی و اثـرات سـمیت سـلولی، حاکـی از ایـن اسـت کـه عوامـل متعـددی از قبیـل منطقـه جغرافیایـی گیـاه، زمـان برداشـت گیـاه، سـن گیـاه، انـدام گیاهـی مـورد اسـتفاده، روش عصاره گیـری و نوعمهـار حـلال مـورد اسـتفاده، غلظـت عصـاره، نـوع رده سـلول سرطانـی، نـوع محیـط کشـت، نـوع آزمـون سـلولی، نـوع میکروارگانیسـم، نـوع سـنجش تـوان آنتی اکسـیدانی، زمـان، دمـا، pH و سـایر عوامـل مرتبـط می تواننـد بـر فعالیت هـای بیولوژیـک اثـر بگذارنـد.

نتیجه گیری

در مجمـوع ایـن موضـوع حائـز اهمیـت اسـت که بـرای اولیـن بار اثـرات سیتوتوکسـیک عصـاره هیدروالکلـی گیـاه گاوزیره برداشـت شـده از ارتفاعـات جواهـرده رامسر بر روی لوسـمی میلوئید مزمن نشـان داده شـد کـه ایـن نتایـج موید ایـن مطلـب اسـت کـه ایـن گیـاه می¬توانـد بـه عنـوان یـک انتخـاب دارویی طبیعی مناسـب، از پیشرفـت رشـد سـلول¬های سرطانـی در محیـط درون¬تن مورد توجـه قـرار بگیرد. البته تحقیقات بیشـتر جهت شـناختن مکانیسـم سـلولی و مولکولـی ترکیبـات موثـره عصـاره خالـص و همچنیـن نانـوذرات سـنتز شـده بـا اسـتفاده از آن بر مسـیر آپوپتوزیـس لازم می¬باشـد. در خاتمـه نیـز یـادآوری می¬شـود کـه نتایـج پژوهـش حـاضر حاصـل کار تحقیقاتی در محیـط آزمایشـگاهی (برون¬تن) اسـت و لـزوم انجـام تحقیقـات بیشـتر مـورد تاکیـد می¬باشـد.

تقدیر و تشکر

نویسـندگان لازم می¬داننـد کـه بدینوسـیله مراتـب تشـکر و قدردانـی خـود را از حـوزه معاونـت پژوهشـی دانشـگاه آزاد اسـلامی - واحـد تنکابـن اعـلام نماینـد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می کنند که تعارض منافعی در این مطالعه وجود نداشته است

References

1. Dzah CS, Duan Y, Zhang H, Wen C, Zhang J, Chen G, Ma H. The effects of ultrasound assisted extraction on yield, antioxidant, anticancer and antimicrobial activity of polyphenol extracts: A review. food bioscience. 2020; (1) 35:100547.
https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100547.

2. Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. Microbial pathogenesis. 2019; 1;134:103580.
https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103580.

3. Campêlo MC, Medeiros JM, Silva JB. Natural products in food preservation. International food research journal. 2019; 1;26(1).

4. Metzcar J, Wang Y, Heiland R, & Macklin P. A review of cell-based computational modeling in cancer biology. JCO clinical cancer informatics 2019; 3: 1-13.

DOI: 10.1200/CCI.18.00069.

5. Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes C J, & Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Molecular and cellular biochemistry 2004; 266: 37-56.

DOI: 10.1023/b:mcbi.0000049134.69131.89.

6. Purnamasari R, Winarni D, Permanasari A A, Agustina E, Hayaza S, & Darmanto W. Anticancer activity of methanol extract of Ficus carica leaves and fruits against proliferation, apoptosis, and necrosis in Huh7it cells. Cancer informatics 2019; 18: **DOI: 10.1177/1176935119842576.**

7. Wang, C. G., Zhong, L., Liu, Y. L., Shi, X. J., Shi, L. Q., Zeng, L., & Liu, B. Z. Emodin exerts an antiapoptotic effect on human chronic myelocytic leukemia K562 cell lines by targeting the PTEN/PI3K-AKT signaling pathway and deleting BCR-ABL. Integrative Cancer therapies 2017; 16(4): 526-539.

DOI: 10.1177/1534735416664784.

8. Lounnas N, Frelin C, Gonthier N, Colosetti P, Sirvent A, Cassuto J P, ... & Imbert V. NFB inhibition triggers death of imatinib-sensitive and imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells including T315I Bcr-Abl mutants. International journal of cancer 2009; 125(2): 308-317.

DOI: 10.1002/ijc.24294.

9. Al-Zharani M, Nasr, F A, Abutaha N, Alqahtani A S, Noman O M, Mubarak M, & Wadaan M A. Apoptotic induction and anti-migratory effects of Rhazya stricta fruit extracts on a human breast cancer cell line. Molecules 2019; 24(21): 3968.

DOI: 10.3390/molecules24213968 .

10. Ahmed A M B, YagoubT E, AlSaid A M, Mohammed J S, & Osman S M. Chronic leukemia in patients N2016; 1(3): 211-218.

11. Lozzio C B, Lozzio B B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood 1975; 45(3): 321-34.

12. Klein E, Vánky F, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, & Polliack A. (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. International journal of cancer 1976; 18(4): 421-431.

DOI: 10.1002/ijc.2910180405.

13. Lee WJ, Hsiao M, Chang J L, Yang S F, Tseng T H, Cheng C W, ... & Chien M H. Quercetin induces mitochondrial-derived apoptosis via reactive oxygen species mediated ERK activation in HL-60 leukemia cells and xenograft. Archives of toxicology 2015; 89: 1103-1117.

DOI: 10.1007/s00204-014-1300-0.

14. Ayromlou A, Masoudi S, Mirzaie A. Scorzonera calyculata aerial part extract mediated synthesis of silver nanoparticles: Evaluation of their antibacterial, antioxidant and anticancer activities. Journal of cluster science 2019; 30: 1037-1050.

DOI: 10.1007/s10876-019-01563-2.

15. Ortiz R, Melguizo C, Prados J, J Alvarez, P, Caba O, Rodríguez-Serrano F, ... & Aránega A. New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. Recent patents on anti-cancer drug discovery 2012; 7(3): 297-312.

DOI: 10.2174/157489212801820093.

16. Bagheri Farahani Z, Mirzaie A, Ashrafi F, Rahimpour Hesari M, Chitgar A, Noorbazargan H, & Rahimi A. Phytochemical composition and biological activities of Artemisia quettensis Podlech ethanolic extract. Natural product research 2017; 31(21): 2554-2558.

DOI: 10.1080/14786419.2017.1318385.

17. Mozaffarian V. Flora of Iran. No. 54: Umbelliferae, Tehran: Publication of Research Institute of Forests and Rangelands; 2007

18. Scheffer J J C , Schoenmakers M. Composition of the essential oil of Polylophium involucratum. Planta medica 1986; 52(6): 532.

DOI: 10.1055/s-2007-969324.

19. Verdian Rizi M R, Hadjiakhoondi A. Chemical constituents and larvicidal activity of the essential oil of Polylophium Involvucratum (Pall.) Boiss (Apiaceae). Journal of plant sciences 2007; 2: 575-578.

DOI: 10.3923/jps.2007.575.578.

20. Kashipaz Ha S, Nematollahi F. Volatile constituents of Polylophium involucratum, a wild plant grown in Iran-, extracted by HS-SPME. International journal of biosciences 2015; 6(6): 68-71.

DOI: 10.1016/j.focha.2022.100066.

21. Ayoubi S, Hajian Z, Habibpour H, Kazemi S, Aghajani J, Yazdani Qadikollaee P. Antimicrobial effect of Polylophium involucratum essential Oil on oral bacteria. Journal of herbal drugs 2018; 8 (4): 257-260. **DOI: 10.14196/JHD.2018.257.**

22. Pourshamsian Kh, Ojani Sh. Phytochemical screening of the aqueous extract of seeds of Polylophium involucratum (Pall.) Boiss. from Ramsar-Iran. Planta medica 2016; 82(05): PC62. **DOI:10.1055/s-0036-1578764.**

23. Trease GE., Evans WC. Pharmacognosy. London: Saunders Publishers; 2002

24. Singleton VL, Orthofer R. & Lamuela-Raventos RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. Methods in enzymology 1999; 299: 152-178. **DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1**.

25. Chang C C, Yang M H, Wen H M, & Chern J C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of food and drug analysis 2002; 10(3):

DOI: 10.38212/2224-6614.2748.

26. Brand-Williams W, Cuvelier M E, & Berset C L W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food science and technology 1995;28(1): 25-30.

DOI: 10.1016/S0023-6438(95)80008-5.

27. Sharma O P, & Bhat T K. DPPH antioxidant assay revisited. Food chemistry 2009; 113(4): 1202-1205. **DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.08.008.**

28. Pfaller, M A, Diekema D J, Gibbs D L, Newell V A, Ellis D, Tullio V, ... & Ling T A. Results from the artemis disk global antifungal surveillance study, 1997 to 2007: a 10.5- year analysis of susceptibilities of Candida species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. Journal of clinical microbiology 2010; 48(4): 1366-1377.

DOI: 10.1128/JCM.02117-09.

29. Stockert J C, Horobin, R W, Colombo L L, & Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. Acta histochemica 2018; 120(3): 159-167.

DOI: 10.1016/j.acthis.2018.02.005.

30. Wong S, McLaughlin J, Cheng, D, & Witte, O. ¬N. Cell context–specific effects of the BCR-ABL oncogene monitored in hematopoietic progenitors. Blood, the Journal of the american society of hematology 2003; ¬101(10): 4088-4097.

DOI: 10.1182/blood-2002-11-3376.

31. Emamghoreishi M, Talebianpour MS. Antidepressant effect of Melissa officinalis in the forced swimming test. DARU journal of pharmaceutical sciences. 2015; 13;17(1):42-7.

32. Ahmadzadeh N, Asghari moghaddam N, Keshtmand Z. The effect of synthetic silver nanoparticle from hydroalcoholic extract Digitalis nervosa on CDH1, Bax , Bcl2 and P53 gene expressions in cervical cancer cell line (Hela). Iranian journal of biological sciences 2022; 17(1): 19-30. [in Persian]

DOI: 10.30495/zisti.2022.1962960.1127.

33. O'Brien SG, Guilhot F, Larson RA, Gathmann I, Baccarani M, Cervantes F, Cornelissen JJ, Fischer T, Hochhaus A, Hughes T, Lechner K. Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. New england journal of medicine. 2003; 13;348(11):994-1004.

34. Ulubelen A, Topcu G, Tan N, Olçal S, Johansson C, Uçer M, Birman H, Tamer S. Biological activities of a Turkish medicinal plant, Prangos platychlaena. Journal of ethnopharmacology 1995; 45(3):193-7.

DOI: 10.1016/0378-8741(94)01215-I.

35. Massumi MA, Fazeli MR, Alavi S HR, Ajanid Y. Chemical constituents and antibacterial activity of essential oil of Prangos ferulacea (L.) Lindl. fruits. Iranian journal of pharmaceutical sciences 2007; 3(3): 171-176.

DOI: 10.22037/ijps.v3.41016.

36. Sharma N, Negi A, Ashok P K. Standardization and phytochemical evaluation of the aerial parts of Prangos pabularia. Journal of pharmacognosy and phytochemistry 2013; 1(5): 47-51.

37. Ojani Sh. Quantitative and qualitative study of the essential oil and alcoholic extract of the Polylophium involucratum (Pall.) Boiss. harvested in the highlands of Ramsar using microwave irradiation and its use to synthesis of silver nanoparticles. (M.Sc) Thesis: Islamic Azad University, Tonekabon Branch; 2015

38. Nematollahi F, Mozaffari Sh, Zmani Hargalani F, Zeinali M. Elimination of lead and cadmium in water, Using green coated Fe3O4 nanoparticles. Journal of food technology and nutrition 2018; 15(3): 99-106.

39. Ojani, Sh., Pourshamsian, K. & Sadeghi, B. Investigation of phytochemical of ethanolic extract of Polylophium involucratum (Pall.) Boiss. The first national congress of biology and natural sciences of iran 2014.

40. Bahrami F, Ahari H, Yousefi Sh. The effect of efficient bioactive nano-emulsion formulation based on Polylophium Involucratum improving quality feayures of green tiger pawn fridge storage. Annals of military and health sciences research 2019; (In Press):e89422.

DOI: https://doi.org/10.5812/amh.89422.

41. Oghbayi K, Khanjari A, Akhoundzadeh-¬Basti A, Kouhi M K, Moghimi N, Balani- Moghadam N, Teymorfard R, Bariri D. Study on the antimicrobial effects of gelatin / Tragacanth Containing Polylophium Involucratum and Ziziphora Cliniopodiodes essential oils on some foodborne pathogen bacteria. Food Engineering Research 2022; 20(2): 85-96. [in Persian]. **DOI: 10.22092/fooder.2020.125287.1201.**

42. Aslani E, Naghsh N, Ranjbar M. Cytotoxic effects of extracts of Mentha pulegium plants before flowering on human chronic myelogenous leukemia K562 cancer category. Journal of arak university medical sciences 2014; 16 (10)¬: 1-10.

43. Mokriani S, Tokmechi A, & Nojavan M. Growth inhibition of K562 cell line by extracted cell wall from Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces bouladi as probiotic with zinc nanopaeticles. Razi Journal of medical sciences 2015;22(132): 35-45.

44. Ghaidar F, Asghari Moghaddam N, Sharifnia F. Quantitative Assessment of CK-18 Gene Expression in Patients Suffering from Chronic Myeloid Leukemia. Iranian journal of biological sciences 2019; 13(4): 35-41.

45. Dorosti N, Zarabi S, Ahmadi S, Rostami R, Rashidi Pour M. Evaluation of anticancer activity methanolic extract of Allium jesdianum and Nectaroscordeum coelzi against HeLa and K562 cell lines. Yafte 2017; 19 (1)¬: 31-41.

46. Dadakhani S, pazhang Y, Imani M. The Anti-cancer effects of Celastrol on K562 cell line. Journal of advanced biomedical sciences 2018; 8 (4)¬: 1116-1126.

47. Shaddel M, Shamsi H, Tavakoli P, Abtahi Foroushani S.¬M, & Shamsi R. Comparing the effects of Aloe vera Leaf extract on K562 tumor cell and peripheral blood mononuclear cells. Internal medicine today 2019; 25(3): 216-229.

DOI:10.32598/hms.25.3.216.