ارزیابی سمیت سلولی اجزای بخش‌سازی شده عصاره متانولی گیاه سدابی جنوبی (*Haplophyllum tuberculatum*) بر رده‌های سلول سرطانی RAJI و A549

فاطمه دسترنج، فرح کریمی* و نصرت رحمانی

تهران، دانشگاه شاهد، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۱۶

چکیده

سدابی جنوبی (*Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss.) گیاهی چند ساله از تیره مرکبات (Rutaceae) است که در منابع طب سنتی به عنوان گیاه دارویی ارزشمندی شناخته می‌شود. در این پژوهش ضمن بررسی محتوای فنل، فلاونوئید و آلکالوئید کل عصاره متانولی برگ، ساقه و ریشه گیاه سدابی جنوبی جمع‌آوری شده از استان هرمزگان، این عصاره‌های متانولی توسط حلال‌هایی با قطبیت متفاوت شامل دی‌اتیل‌اتر، کلروفرم، بوتانول و آب بخش‌سازی شد و اثر سمیت سلولی این بخش‌ها بر رده‌های سلولی RAJI (سلول سرطانی لنفوئیدی انسانی) و A549 (سلول سرطانی اپی‌تلیال ریه انسان) و سلول‌های لنفوسیت سالم خون انسان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیشترین محتوای ترکیبات فنلی در ساقه و بیشترین محتوای فلاونوئیدها و آلکالوئیدها در برگ این گیاه تجمع می‌یابد. عصاره دی‌اتیل‌اتری هر سه اندام گیاه، IC_{50} کمتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به رده سلول سرطانی A549 نشان دادند و در مجموع اثر سمیت سلولی بر رده سلولی A549 بطور معنی‌داری نسبت به رده سلولی RAJI بیشتر بود. عصاره‌ها نسبت به سلول‌های سالم خون سمیت سلولی نشان ندادند. به نظر می‌رسد ترکیبات این گیاه ضمن عدم آسیب به سلول‌های سالم، بر رده‌های مختلف سلول سرطانی تاثیر اختصاصی دارند. این نتایج می‌تواند پتانسیل مناسبی برای استفاده از ترکیبات خالص شده این گیاه در صنعت داروسازی فراهم آورد. لازم به ذکر است که بررسی‌های انجام شده در این پژوهش برای اولین بار بر روی سدابی جنوبی ایران صورت پذیرفته است.

واژه‌های کلیدی: سمیت سلولی، سدابی جنوبی، عصاره متانولی

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۵۱۲۱۲۱۴۴ ، پست الکترونیکی: fkarimi@shahed.ac.ir

مقدمه

سرطان بیماری بسیار شایعی است و سالانه عامل مرگ میلیون‌ها نفر در سرتاسر جهان می‌باشد. با وجود پیشرفت های حاصل در روش‌های جراحی و رادیوتراپی، هنوز هم شیمی‌درمانی، یکی از روش‌های اساسی در درمان سرطان-های شایع به شمار می‌رود ولی کارایی شیمی‌درمانی به دلیل مقاومت سلول‌ها به دارو به مرور زمان کاهش می‌یابد. برای غلبه بر مقاومت شیمیایی سلول‌ها به داروهای پادسرطان نیاز به یافتن ترکیبات پادسرطانی جدید وجود دارد و در این راستا بررسی ترکیباتی با منشاء طبیعی بسیار ارزشمند خواهد بود (۱۵). مطالعات زیادی در دنیا در رابطه با آثار سمیت سلولی عصاره‌های گیاهی برای یافتن داروهای پادسرطان جدید صورت گرفته است (۷، ۹، ۱۱، ۱۵، ۱۸، ۱۹، ۲۱، ۲۶، ۳۳). اخیرا در ایران نیز همچون سایر کشورها توجه بیشتری به یافتن تاثیرات سمیت سلولی عصاره‌ها و مشتقات گیاهی نشان داده می‌شود. از آن جمله، میمندی و یعقوبی تاثیر عصاره‌های آبی و اتانلی گل محمدی را بر سلول‌های سرطانی معده انسان مورد آزمایش قرار داده و القای مرگ برنامه ریزی شده را در این سلول‌ها

مشاهده نموده‌اند (۲) و القای آپوپتوز در یک رده سلول سرطانی مثانه انسان نیز با استفاده از پودوفیلوتوکسین که لیگنانی با منشاء گیاهی است توسط صادقی و همکاران مشاهده شده است (۱).

سدابی (*Haplophyllum*) یکی از جنس‌های تیره مرکبات با ۷۰ گونه در مناطق مختلف جهان است (۳). در ایران ۳۰ گونه از این جنس به صورت خودرو در مناطق گوناگون رویش دارند و از این میان ۱۴ گونه انحصاری کشور ما قلمداد می‌شوند (۴). گونه‌های سدابی در آسیای مرکزی انتشار فراوان داشته و از مدیترانه تا شرق سیبری، در مناطق مختلف آب و هوایی می‌رویند. ترکیه، ایران و آسیای مرکزی مناطقی با بیشترین پراکنش این گیاهان معرفی شده‌اند (۱۶، ۳۱). گونه‌های این جنس بطور معمول از گذشته‌های دور در مناطق رویش مورد استفاده دارویی قرار گرفته و در قدیمی‌ترین منابع علمی، از گونه‌های سدابی برای درمان بیماری‌های مختلف نام برده شده است. نام سدابی جنوبی در طب سنتی مصر برای درمان تهوع، یبوست، مالاریا، روماتیسم مفاصل، بیماری های زنان و درد معده ذکر شده است (۱۳).

تجزیه و تحلیل فیتوشیمیایی گونه سدابی جنوبی وجود لیگنان‌ها، کومارین‌ها، فلاونوئیدها و آلکالوئیدها را در این گیاه نشان داده است (۲۹، ۳۰، ۳۴). اسانس این گیاه نیز مورد بررسی قرار گرفته و ترکیباتی نظیر β-phellandrene (23.3%)، limonene (12.6%)، (Z)-β-ocimene (12.3%)، β-caryophyllene (11.6%)، myrcene (11.3%) و α-phellandrene (10.9%) در آن شناسایی شده‌اند (۶، ۳۷).

پیش از این مطالعه‌ای در کشور لیبی در مورد اثر سمیت سلولی اسانس این گیاه بر رده‌های سلول سرطانی ریه (H-1299) و کبد (HEPG2) انسان صورت گرفته است (۲۷). در سال ۲۰۰۷ نیز Varamini و همکارانش اثر عصاره اتانلی چند گونه هاپلوفیوم از جمله سدابی جنوبی را بر رده‌های مختلف سلول سرطانی بررسی کرده و به نتایج قابل توجهی در این مورد رسیده‌اند (۳۵). گیاه سدابی جنوبی خواص داروشناختی متعددی داشته و ملکول‌های زیست‌فعال شناخته شده در این گیاه قادرند نقش مهمی در سلامت انسان ایفا کنند. این گیاه توزیع و پراکنش وسیعی در زیستگاه‌های مختلف داشته و در صحراهای شنی و انواع مختلفی از خاک‌ها و بخصوص رسوبات سیلتی (silt deposits) می‌روید و با توجه به اینکه شرایط سال‌های کم باران و خشک را نیز به خوبی تحمل کرده و تا ارتفاع ۱۳۰۰ متر از سطح دریا نیز رویش دارد، به عنوان علف هرز اغلب مزارع در تابستان شناخته می‌شود (۲۴). این گیاه در ایران نیز پراکنشی وسیع داشته و رویش آن در استان-های خوزستان، هرمزگان، کرمانشاه، لرستان، بختیاری، فارس، کرمان، سیستان، بلوچستان، مرکزی و گلستان گزارش شده است (۴، ۲۵). با در نظر گرفتن تنوع اقلیمی زیستگاه‌های مختلف گیاه سدابی جنوبی و تاثیر شرایط اقلیمی بر محتوا و ترکیب متابولیت‌های ثانوی گیاهی، بررسی و مطالعه این گونه در ایران نیز می‌تواند نتایج ارزشمندی در بر داشته باشد. با توجه به اهمیت دارویی این گیاه و مطالعات مختلفی که بر روی ترکیبات متشکله آن صورت گرفته، در این پژوهش به بررسی اثر سمیت سلولی اجزای بخش‌سازی شده با حلال‌هایی با قطبیت افزاینده حاصل از عصاره متانلی شامل عصاره‌های دی‌اتیل-اتری، کلروفرمی، بوتانلی و آبی به‌دست آمده از اندام‌های برگ، ساقه و ریشه این گیاه بر رده‌های سلولی RAJI (سلول سرطانی لنفوئیدی انسانی) و A549 (سلول سرطانی اپی‌تلیال ریه انسان) پرداخته شد. لازم به ذکر است که قبلا مطالعه‌ای بر روی آثار سمیت سلولی عصاره‌های مورد بررسی در این پژوهش، بر روی رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه (A549 و RAJI) صورت نگرفته است. با این هدف ابتدا عصاره متانولی از نظر محتوای آلکالوئیدها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی کل مورد بررسی قرار گرفت و پس از بخش‌سازی عصاره متانولی در حلال‌های مورد نظر (دی‌اتیل‌اتر، کلروفرم، بوتانول و آب)، آثار سمیت سلولی

بخش‌ها بر روی دو رده سلول سرطانی انسانی مطالعه شد. به منظور مقایسه آثار سمیت سلولی عصاره‌ها بر رده‌های سلول سرطانی با سلول‌های سالم انسان، اثر سمیت سلولی عصاره‌ها بر لنفوسیت‌های سالم جدا شده از خون انسان نیز بررسی شد.

مواد و روشها

مواد گیاهی: اندام هوایی و ریشه گیاه سدابی جنوبی (*Haplophyllum tuberculatum*) از بندرعباس، کوه گنو، ارتفاع ۱۱۲۰ متر با مشخصات جغرافیایی N '24 °27 و E '11 °56 جمع‌آوری و پس از تمیز کردن در دمای اتاق خشک شد. نمونه‌ها تا زمان انجام بررسی‌های مورد نظر در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج آلکالوئیدها و سنجش آلکالوئید کل: یک گرم از بافت مورد بررسی (برگ، ساقه، ریشه) در ۵۰ میلی‌لیتر متانول سائیده شد و در طول شب در دمای اتاق روی شیکر با سرعت ۴۵ دور در دقیقه قرار گرفت. پس از حذف بقایای بافت گیاهی توسط کاغذ صافی، اتانول توسط دستگاه تقطیر در خلاء تبخیر شد. سپس با افزودن سولفوریک‌اسید (V/V) ٪۵ و دی‌اتیل‌اتر به نسبت مساوی، فاز آبی حاوی آلکالوئید جدا شد و شستشو با دی‌اتیل‌اتر تا بی‌رنگ شدن ادامه یافت. با افزودن هیدروکسید سدیم ۱۰ نرمال pH محلول تا حدود ۱۰ افزایش یافت. سپس محلول به دکانتور انتقال داده شد و ۱۱۰ میلی‌لیتر کلروفرم در سه مرحله (۳۰+۴۰+۴۰) اضافه شد. هر بار فاز کلروفرمی حاوی آلکالوئید جمع و به یکدیگر اضافه شد. در نهایت کلروفرم توسط دستگاه تقطیر در خلاء تبخیر شد و ته مانده عصاره در متانول حل شد و حجم عصاره حاصل به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس با دستگاه اسپکتروفتومتر (Shimadzu, UV-Visible) مدل PC1601 مورد بررسی قرار گرفت (۱۷). منحنی استاندارد با استفاده از ترکیب استاندارد کلشی‌سین رسم شد و با استفاده از آن مقدار آلکالوئید کل در هر نمونه بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بافت محاسبه گردید.

تهیه عصاره پلی‌فنلی و سنجش ترکیبات فنلی: برای استخراج ترکیبات پلی‌فنلی دو گرم از بافت گیاهی (ریشه، ساقه، برگ) با ۳۰ میلی‌لیتر متانول عصاره‌گیری شد و در طول شب روی شیکر و در دمای اتاق نگهداری شد. عصاره به دست آمده برای سنجش ترکیبات فنلی و فلاونوئیدها مورد استفاده قرار گرفت.

برای سنجش ترکیبات فنلی، ۱۲۵میکرولیتر عصاره متانولی، ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۲۵ میکرولیتر معرف فولین-سیاکلتو (Folin-Ciocalteu) مخلوط و بعد از گذشت ۶ دقیقه ۱/۲۵ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷٪ به مخلوط حاصل افزوده شد و در نهایت محلول‌ها به مدت ۹۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس جذب آن‌ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنلی کل در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد حاصل از گالیک اسید بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بافت محاسبه گردید (۵).

سنجش فلاونوئیدها: برای سنجش فلاونوئیدها ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره متانولی، ۵۰ میکرولیتر استیک اسید ۳۳٪ و ۱۰۰ میکرولیتر محلول تازه تهیه شده آلومینیم کلراید ۱۰٪ مخلوط شد و حجم نهایی محلول با استفاده از متانول به ۲/۵ میلی‌لیتر رسید. بعد از ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها در طول موج ۴۱۴ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. سنجش همه نمونه‌ها با سه تکرار مستقل انجام شد و مقدار فلاونوئید کل در هر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین بر حسب میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بافت محاسبه گردید (۸).

استخراج و تهیه عصاره‌های گیاهی: پنج گرم از پودر هر یک از اندام‌های گیاه (ریشه، ساقه، برگ) همراه با ۵۰ میلی‌لیتر متانول ۸۰٪ به مدت ۱/۵ ساعت در حمام

اولتراسونیک قرار گرفت. عصاره متانولی حاصل از کاغذ صافی عبور داده شد و توسط دستگاه تقطیر در خلاء و در دمای اتاق کاملا تغلیظ شد. به عصاره متانولی تغلیظ شده ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۰ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر اضافه و در دکانتور بخوبی مخلوط شد. سپس فاز دی‌اتیل‌اتری (فاز رویی) جدا و بطور جداگانه تغلیظ گردید و این بار ۲۰ میلی‌لیتر کلروفرم به فاز آبی اضافه و به خوبی در دکانتور مخلوط شد. فاز کلروفرمی (زیرین) جدا و تغلیظ گردید. در مرحله آخر ۲۰ میلی-لیتر بوتانول به فاز آبی اضافه و در دکانتور بخوبی مخلوط شدو فازهای تشکیل شده آبی (زیرین) و بوتانولی (رویی) از هم جدا و با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ شده و برای مطالعات بعدی نگهداری شدند.

بررسی سمیت سلولی عصاره‌ها: رده‌های سلول سرطانی RAJI و A549 از انستیتو پاستور ایران تهیه شد. محیط کشت RPMI حاوی پنی سیلین- استرپتومایسین (IU/mL ۱۰۰) همراه با ۰/۵ میلی‌لیتر FBS ده درصد در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و محیطی با پنج درصد CO_2 و ۹۵٪ بخار آب کشت داده شدند. پس از رشد و تکثیر، سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای توزیع گردیدند (۲۰/۰۰۰ سلول در هر چاهک) و به مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت داخل انکوباتور ۳۷ درجه نگهداری شدند. سپس محیط کشت هر چاهک به آرامی خارج شد و ۱۸۰µl محیط کشت جدید همراه با ۲۰µl از عصاره گیاهی آماده شده و با غلظت‌های نهایی µg/ml ۶۲/۵ – ۱۰۰۰ حل شده در DMSO (Dimethyl sulfoxide) (بطوری‌که مقدار DMSO در هر چاهک از ۵٪ تجاوز نکند) به هر چاهک اضافه و مجدداً پلیت به مدت ۲۴ ساعت داخل انکوباتور قرار داده شد. بعد از این مدت پلیت از انکوباتور خارج کرده و به هر چاهک ۲۰µl محلول MTT ۵ mg/ml (3-((4,5-dimethyltetrazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium اضافه گردید. پس از گذشت چهار ساعت، محیط داخل هر چاهک به آرامی خارج و به هر چاهک DMSO ۱۰۰µl اضافه شد تا کریستال‌های ارغوانی رنگ حاصل از احیاء MTT در آن حل شود و سپس جذب نوری هر نمونه با دستگاه ELISA reader (Anthos 2020) در طول موج ۴۹۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد، بجای عصاره گیاهی، از همان حجم DMSO استفاده شد. در این روش نمک MTT که زرد رنگ است، توسط آنزیم‌های دهیدروژناز موجود در میتوکندری سلولهای فعال به ترکیب غیرمحلول و ارغوانی رنگ فورمازان تبدیل می‌شود و بنابراین شدت رنگ ارغوانی حاصله معرف نسبت سلول-های زنده در هر چاهک است (۱۴، ۲۲).

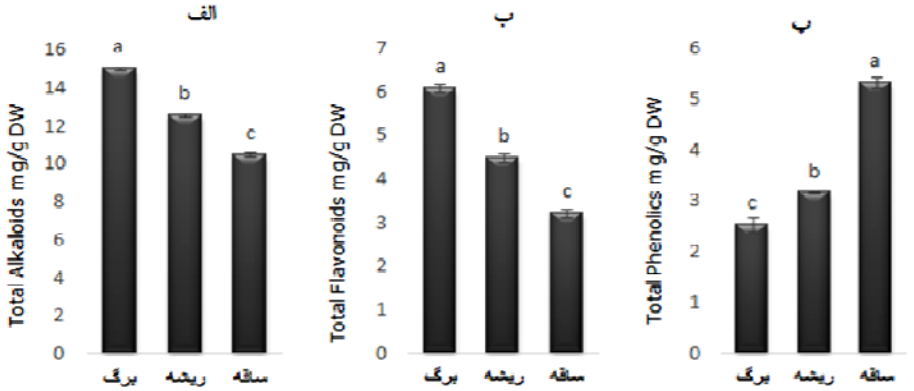
اثر سمیت سلولی عصاره‌ها بر سلول‌های لنفوسیت خون: به منظور مقایسه اثر سمیت سلولی عصاره‌های گیاه بر رده-های سلول سرطانی با سلول سالم، از لنفوسیت‌های جدا شده از خون تازه انسان استفاده شد. ابتدا خون‌گیری از فرد داوطلب سالم با اخذ رضایت‌نامه انجام شد (همه مراحل با استفاده از خون یک نفر انجام گرفت). خون تازه پس از آغشته شدن به Na_2EDTA به آرامی به ظرفی حاوی فایکول انتقال یافت به طوری که خون روی فایکول قرار گرفت (حجم فایکول نصف حجم خون مورد نظر بود). این مجموعه به مدت ۲۰ دقیقه در rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ شد و سپس سلول‌های لنفوسیت که به صورت لایه‌ای مجزا در زیر فایکول قرارگرفته بودند، به آرامی جدا شده و مجدداً سانتریفوژ شدند تا لنفوسیت‌ها رسوب کرده و اگر احیاناً با فایکول آغشته بودند کاملاً از آن جدا شوند. رسوب حاصل ابتدا با سرم فیزیولوژیک و سپس با محیط کشت RPMI شستشو داده شد و در انتها در دو میلی‌لیتر محیط کشت معلق شد و شمارش سلولی انجام گرفت تا تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر به دست آید. بر اساس نتیجه شمارش سلولی برای هر چاهک پلیت حجمی از محیط کشت حاوی ۲۰۰۰۰ سلول (معادل ۵۰ میکرولیتر) محاسبه

شد. سپس ابتدا در چاهک‌های هر ردیف ۲۰ میکرولیتر از رقت مورد نظر عصاره ریخته و سپس ۵۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی سلول و ۱۳۰ میکرولیتر محیط RPMI دارای ۱۰٪ FBS اضافه گردید. سپس به ازای ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت، ۵ میکرولیتر فیتوهماگلوتینین اضافه شد. بعد از انجام مراحل فوق، سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و سپس به روشی که پیش از این ذکر شد مورد ارزیابی MTT قرار گرفتند.

تجزیه و تحلیل آماری دادها: آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار بیولوژیک انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن با سطح احتمال $p \leq 0.05$ با استفاده از نرم‌افزار SPSS 2016 صورت گرفت.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل، محتوای آلکالوئید در اندام‌های مورد بررسی بطور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت بوده و بیشترین مقدار (۱۴/۹۹ mg/g DW) در برگ و کمترین مقدار آن (۱۰/۴۵ mg/g DW) در ساقه مشاهده شد (شکل۱–الف). محتوای فنل‌ها نیز در اندام‌های مورد بررسی بطور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت بوده و بیشترین مقدار در ساقه (۵/۳۳ mg/g DW) و کمترین مقدار آن (۲/۲۵ mg/g DW) در برگ مشاهده شد (شکل ۱–پ). نتایج بررسی محتوای فلاونوئیدها کل در شکل۱–ب نشان داده شده است. به طوری که از نتایج بر می‌آید، محتوای فلاونوئیدها نیز در اندام‌های مورد بررسی بطور معنی‌داری با یکدیگر متفاوت بوده و بیشترین مقدار (mg/g DW ۶/۰۷) در برگ و کمترین مقدار آن (۳/۲۱ mg/g DW) در ساقه مشاهده شد.



شکل ۱- مقایسه محتوای ترکیبات آلکالوئیدی کل (الف)، ترکیبات فنلی کل (ب) و ترکیبات فلاونوئیدی کل (پ) در اندام‌های برگ، ساقه و ریشه گیاه سدابی جنوبی (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است).

نتایج حاصل از بررسی سمیت سلولی عصاره‌ها به صورت IC_{50} (غلظتی از عصاره که باعث مهار ۵۰ درصد تکثیر سلولی نسبت به کنترل می شود) بیان شده است (هر چه مقدار IC_{50} کمتر باشد، سمیت سلولی عصاره بیشتر است).

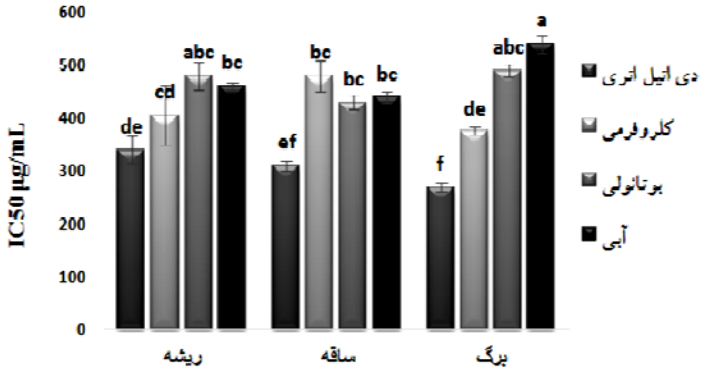
سمیت سلولی عصاره‌های دی‌اتیل‌اتری، کلروفرمی، بوتانولی و آبی حاصل از عصاره متانولی اندام‌های برگ، ساقه و ریشه سدابی جنوبی بر روی رده سلولی RAJI در شکل ۲ نشان داده شده است. همانطور که قابل مشاهده است، در تمامی اندام‌های مورد بررسی عصاره دی‌اتیل‌اتری بیشترین فعالیت سمیت سلولی را علیه این رده سلول سرطانی نشان داد و در بین اندام‌های مورد بررسی نیز عصاره دی‌اتیل‌اتری برگ بیشترین خاصیت سمیت سلولی را بر روی این رده سلولی داشت. سمیت سلولی عصاره کلروفرمی برگ تقریبا معادل سمیت سلولی عصاره دی-

اتیل‌اتری ریشه بر رده سلولی RAJI است ولی بین اثر عصاره‌های بوتانولی و آبی برگ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در ریشه و ساقه، عصاره دی‌اتیل‌اتری بیشترین تاثیر را نشان داد ولی تفاوت معنی‌داری بین اثر سمیت سلولی سایر عصاره‌ها با یکدیگر مشاهده نشد. بیشترین سمیت سلولی مشاهده شده در عصاره دی‌اتیل اتری برگ با IC_{50} معادل ۲۷۵/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین آن مربوط به عصاره آبی برگ با IC_{50} معادل ۵۴۱/۷۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. بر اساس تقسیم بندی انجام شده توسط Kuete و Efferth مقادیر IC_{50} بالاتر از ۲۰۰ µg/mL برای عصاره‌های گیاهی بر روی سلول سرطانی، فاقد سمیت سلولی لازم برای خالص سازی عصاره در نظر گرفته می‌شود (۱۹).

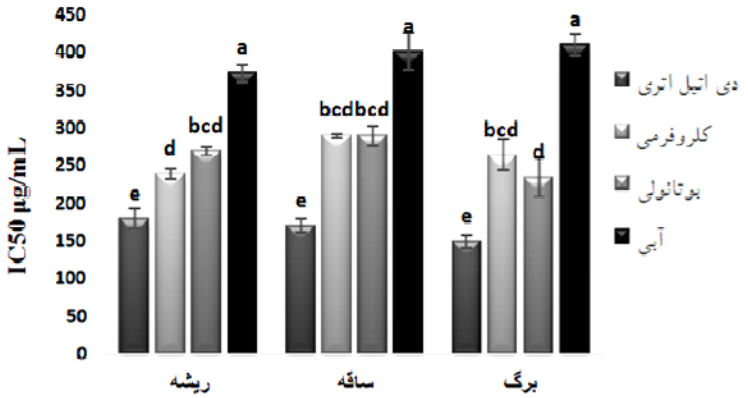
عصاره‌های مورد بررسی بر روی رده سلولی A549 سمیت بیشتری نسبت به RAJI نشان دادند (شکل۳). در برگ، ساقه و ریشه، عصاره دی‌اتیل‌اتری بیشترین فعالیت سمیت سلولی و عصاره آبی کمترین فعالیت را علیه این رده سلول سرطانی نشان دادند. در بین اندام‌های برگ، ریشه و ساقه تفاوت معنی‌داری از نظر سمیت سلولی عصاره دی‌اتیل‌اتری مشاهده نشد. بیشترین سمیت سلولی مشاهده شده در عصاره دی‌اتیل‌اتری برگ با IC_{50} معادل ۱۵۲/۱۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین آن مربوط به عصاره آبی برگ با IC_{50} معادل ۴۲۱/۵۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در تمام اندام‌ها مقادیر IC50 عصاره دی‌اتیل‌اتری کمتر از µg/mL ۲۰۰ بود.

در مجموع تاثیر عصاره دی اتیل اتری اندام‌های مختلف سدابی جنوبی بر رده سلولی A549 بطور معنی‌داری بیشتر از تاثیر آن بر رده سلولی RAJI بود. در ریشه، ساقه و برگ، تفاوت معنی‌داری بین اثر سمیت سلولی عصاره‌های کلروفرمی و بوتانولی با یکدیگر مشاهده نشد ولی تاثیر عصاره آبی بطور معنی‌داری کمتر از سایر عصاره‌ها در هر سه اندام بود. بجز عصاره آبی، سایر عصاره‌های حاصل از اندام‌های مختلف گیاه بر رده سلولی A549 بطور معنی‌داری اثر سمیت سلولی بیشتری نسبت به رده سلولی RAJI نشان دادند. در مورد رده A549 نیز تفاوت معنی‌داری از نظر سمیت سلولی هر یک از عصاره‌های به دست آمده از اندام‌های مختلف مشاهده نشد.

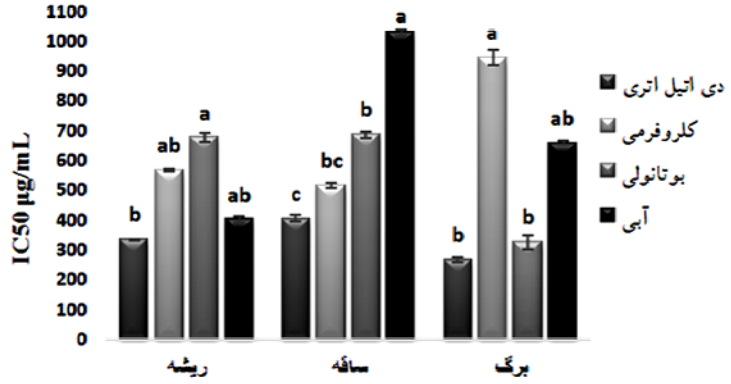
بر اساس تقسیم بندی انجام شده توسط Kuete و Efferth بجز عصاره دی‌اتیل‌اتری برگ (IC_{50}=270.22)، هیچیک از عصاره‌های مورد بررسی نسبت به سلول‌های لنفوسیت سالم خون سمیت سلولی نداشتند (شکل ۴). بر اساس این تقسیم بندی در مورد سلول‌های سالم، IC_{50} بیش از ۳۰۰ عصاره‌های گیاهی نشانه عدم سمیت سلولی است (۱۹).



شکل ۲- مقایسه مقادیر IC_{50} اجزای عصاره متانولی حاصل از اندام‌های مختلف (برگ، ساقه و ریشه) گیاه سدابی جنوبی بر رده سلولی سرطانی RAJI (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است).



شکل۳- مقایسه مقادیر IC_{50} اجزای عصاره متانولی حاصل از اندام‌های مختلف (برگ، ساقه و ریشه) گیاه سدابی جنوبی بر رده سلولی سرطانی A549 (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است).



شکل۴- مقایسه مقادیر IC_{50} اجزای عصاره متانولی حاصل از اندام‌های مختلف (برگ، ساقه و ریشه) گیاه سدابی جنوبی بر روی لنفوسیت‌های سالم خون انسان (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p \leq 0.05$ است).

در این بررسی، بیشترین سمیت سلولی مشاهده شده مربوط به عصاره دی‌اتیل‌اتری برگ با IC_{50} معادل ۲۷۰/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کمترین سمیت سلولی مشاهده شده مربوط به عصاره آبی ساقه با IC_{50} معادل ۱۰۳۱/۰۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد.

بحث

آلکالوئیدها، ترکیبات شیمیایی هتروسیکلی هستند که حداقل دارای یک اتم نیتروژن و دارای آثار فارماکولوژیکی می‌باشند. گیاهان یکی از مهمترین منابع آلکالوئیدها محسوب می‌شوند و از نظر تاریخی استفاده از آلکالوئیدهای عصاره‌های گیاهی در معجون‌ها، داروها و سموم، قدمتی معادل تشکیل جوامع بشری دارد. انباشتگی رونوشت ژن‌های کلیدی مسیر بیوسنتزی آلکالوئیدها در گیاه پروانش هم در ریشه و هم در برگ و در مواردی در گل هم مشاهده شده است. در گونه‌های تیره سیب-زمینی بررسی‌ها انباشتگی رونوشت ژن هیوسیامین-بتا-۶-هیدروکسیلاز را در سلول‌های لایه دایره محیطیه ریشه ثبت کرده‌اند ولی انباشتگی ژن‌های کلیدی بیوسنتز نیکوتین در ریشه، ساقه و برگ گونه‌های مختلف تنباکو مشاهده شده است (۲۰). بنابراین به نظر می‌رسد بیوسنتز آلکالوئیدها در گونه‌های مختلف گیاهی می‌تواند در اندام‌های مختلف تمرکز داشته باشد. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، آلکالوئیدها دراندام هوایی گیاه سدابی جنوبی بیش از ریشه انباشته می‌شوند. با وجود مطالعات زیادی که بر روی شناسایی آلکالوئیدهای گونه‌های سدابی صورت گرفته، مطالعه چندانی در مورد مسیرهای بیوسنتزی آنها انجام نشده است. این بررسی بطور غیرمستقیم این احتمال را

ایجاد می‌کند که ممکن است بیوسنتز آلکالوئید در برگ گونه سدابی جنوبی بیشتر از سایر اندام‌ها صورت گیرد.

محتویات فنلی گیاه مجموعه مهمی از ترکیبات هستند که دارای فعالیت پاداکسیدانی و خاصیت تخریب کنندگی رادیکال‌های آزاد می‌باشند (۱۰). ترکیبات فنلی با داشتن حداقل یک حلقه شش کربنی (C6) که یک یا بیش از یک گروه هیدروکسیل به آن متصل است، شناخته می‌شوند. این ترکیبات از سینامیک‌اسید مشتق می‌شوند که خود در اثر فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز (PAL) از فنیل‌آلانین مشتق شده است. فعالیت این آنزیم، محل جدا شدن متابولیسم اولیه (مسیر شیکیمات)، از متابولیسم ثانویه (مسیر فنیل‌پروپانوئید) است. تحت شرایط طبیعی رویش، ۲۰٪ از کربن تثبیت شده توسط گیاه، وارد متابولیسم فنیل‌پروپانوئیدی می‌شود. فنل‌ها بر اساس تعداد کربن متصل شده به اسکلت ساختمانی، به چندین گروه نظیر فنل‌های ساده، بنزوئیک اسیدها، فنیل‌پروپانوئیدها و فلاونوئیدها تقسیم می‌شوند. ترکیبات فنلی در گیاه نقش‌های متعدد داشته و تحت شرایط محیطی مختلف، بیوسنتز آن‌ها تحریک می‌شود. خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی به دلیل میل بالای آن‌ها به هم‌بند شدن با عناصر فلزی است (۲۳). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی با توجه به تنوع و عملکرد وسیع خود می‌توانند در اندام‌های مختلف گیاهی سنتز شوند. بر اساس نتایج بدست آمده در این پژوهش، تجمع فنل‌ها درساقه بیش از سایر بافت‌ها و حدود دو برابر مقدار آن در برگ می‌باشد. در مورد محتوای فلاونوئید کل این نسبت معکوس شده و در برگ بیشترین تجمع این ترکیبات مشاهده می‌شود.

در این پژوهش فعالیت سمیت سلولی چهار بخش استخراج شده (دی‌اتیل‌اتری، کلروفرمی، بوتانولی و آبی) از عصاره متانولی اندام‌هوایی، برگ، ساقه و ریشه علیه دو رده سلول سرطانی مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج خاصیت پادسرطانی متوسطی از عصاره‌های بررسی شده علیه رده‌های سلولی مورد بررسی نشان داد که ثابت می‌کند این گیاه پتانسیل بررسی‌های بیشتر بعنوان منبع تولید دارو برای شیمی‌درمانی حداقل در مورد دو نوع سرطان شامل سرطان‌های خون و ریه را دارد. بر اساس تقسیم بندی انجام شده توسط Kuete و Efferth مقادیر IC_{50} بالاتر از ۲۰۰ µg/mL برای عصاره‌های گیاهی بر روی سلول سرطانی، فاقد سمیت سلولی لازم برای خالص سازی عصاره در نظر گرفته می‌شود (۱۹). با توجه به اینکه IC_{50} عصاره اتیل-استاتی اندام‌های برگ، ریشه و ساقه گیاه سدابی جنوبی بر رده سلولی A549 کمتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است و از سوی دیگر میزان IC_{50} عصاره اتیل‌استاتی هر سه اندام نسبت به رده سلولی RAJI نیز بیشترین سمیت سلولی را نسبت به سایر عصاره‌ها نشان داد، می‌توان نتیجه گرفت که بخش سازی بیشتر عصاره اتیل‌استاتی اندام‌های مختلف این گیاه (بخصوص برگ)، با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، احتمال دستیابی به بخش-هایی با آثار سمیت سلولی قوی‌تر را افزایش می‌دهد. در سال ۲۰۰۷ Varamini و همکارانش با بررسی عصاره اتانلی گیاه سدابی جنوبی بر رده سلولی A549 مقدار IC_{50} را معادل ۴۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آورده‌اند (۳۶). مقایسه نتایج آن‌ها با نتایج این پژوهش، موثرتر بودن روش عصاره‌گیری در پژوهش حاضر را نشان داده و لزوم بررسی بیشتر در مورد شرایط بخش‌سازی عصاره‌ها را بیشتر آشکار می‌سازد. نکته قابل توجه، عدم سمیت سلولی عصاره ها نسبت به سلول‌های سالم خون انسان است که می‌تواند نویدبخش اثر اختصاصی محتویات عصاره‌ها بر سلول‌های سرطانی باشد. بعلاوه تاثیر متفاوت این عصاره‌ها بر دو رده مختلف سلول سرطانی می‌تواند نشان‌دهنده تاثیر اختصاصی ترکیبات این گیاه بر سرطان‌های مختلف باشد. این نتایج می‌تواند پتانسیل مناسبی برای استفاده از ترکیبات خالص شده این گیاه در صنعت داروسازی فراهم آورد.

در سال ۲۰۱۷ Al-Muniri و Hossain نیز سمیت عصاره‌های بخش‌سازی شده مختلف حاصل از عصاره متانولی گیاه سدابی جنوبی بومی کشور عمان را بر میگوی آب شور مورد بررسی قرار داده و بیشترین سمیت را در عصاره‌های کلروفرمی و اتیل-استاتی با IC_{50} معادل ۵۰۰µg/mL مشاهده نمودند (۷). این نتایج در تائید نتایج حاصل از پژوهش حاضر می‌باشد و لزوم مطالعات بیشتر بر روی این گیاه و بخش‌سازی عصاره‌ها را مورد تائید قرار می‌دهد. لازم به ذکر است که بررسی‌های انجام شده در این پژوهش برای اولین بار بر روی سدابی جنوبی ایران صورت پذیرفته است.

منابع

۱- صادقی ا، بهمنش م، شریفی م، محمدسلطانی ب و احمدیان چاشمی ن (۱۳۹۳) القای آپوپتوز رده سلولی کارسینومای مثانه 5637در اثر تیمار با پودوفیلوتوکسین، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) جلد ۲۷، شماره ۳، صفحات ۳۹۹-۴۰۵

۲- میمندی ک و یعقوبی م م (۱۳۹۴) اثرات عصاره آبی و اتانولی گل محمدی (*Rosa damascena mill* L.) بر علیه سلول‌های سرطانی معده انسان، مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران) جلد ۲۸، شماره ۲، صفحات ۲۹۹-۳۰۹

۳- قهرمان، احمد (۱۳۷۳) کورموفیت‌های ایران (سیستماتیک گیاهی)، چاپ اول، مرکز نشر دانشگاهی، تهران

۴- مظفریان، ولی الله (۱۳۹۲) فرهنگ نام‌های گیاهان ایران، چاپ هفتم، نشر فرهنگ معاصر، تهران

5- Agbor G A, Vinson A and Donnelly P E (2014), Folin-Ciocalteau Reagent for Polyphenolic Assay. *Int J Food Sci Nutr Diet.* 3: 147-156

6- Al-Burtamani S. K. S., Fatope M. O., Marwah R. G. , Onifade A. K. and Al-Saidi S. H. (2005) Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman, Journal of Ethnopharmacology, 96: 107-112

7- Al-Muniri R M S and Hossain M A (2017) Evaluation of antioxidant and cytotoxic activities of different extracts of folk medicinal plant *Hapllophyllum tuberculatum*, Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 4: 101–106

8- Beketov E, Pakhomov V, and Nesterova O (2005) Improved Method of Flavonoid Extraction from Bird Cherry Fruits, Pharmaceutical Chemistry Journal, 39: 316-318.

9- Bezivin, S. Tomasi, F. Lohezic-Le Devehat, and J. Boustie (2003) Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines, Phytomedicine, 10: 499–503

10- Diwan R, Shinde A and Malpathak N (2012) Phytochemical Composition and Antioxidant Potential of *Ruta graveolens* L. In Vitro Culture Lines, Journal of Botany, 2012: 1-6

11- El-Menshawi B, Fayad W, Mahmoud K, El-Hallouty S M, El-Manawaty M, Olofsson M H and Linder S (2010) Screening of natural products for therapeutic activity against solid tumors, Indian Journal of Experimental Biology, 48:258-264

12- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H and Parks WP (1973) In vitro cultivation of human tumors: Establishment of cell lines derived from a series of solid tumors, Journal of the National Cancer Institute, 51: 1417–1423

13- Hadjadj H, Bayoussef Z, El Hadj-Khelil, Beggat H, Boukaka Y, Khaldi I A, Mimouni S, Sayah F and Tey M (2015) Ethnobotanical study and phytochemical screening of six medicinal plants used in traditional medicine in Northern Sahara of Algeria, Journal of Medicinal Plant research, 41: 1049-1059

14- Helgason CD (2005) Basic cell culture protocols In: Methods in molecular biology, J.M. Walker (SERIES EDITOR) Springer

15- Ionkova I (2011) Anticancer Lignans - from Discovery to Biotechnology, Medicinal Chemistry, 11: 843-856

16- Jasen O, Akhmedjanova V, Angenol L, Balansard G, Chariol A, Oliver E, Tits M and Frederich M (2006) Screening of 14 alkaloids isolated from *Haplophyllum* A. Juss. for their cytotoxic properties. Journal of Ethnopharmacology 105: 241–245

17- Kamada H, Okamura N, Satake M, Harada H and Shimomura K (1986) Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*, Plant Cell Reports, 5: 239-242.

18- Kuete V, Wiench B, Alsaid M S, Alyahya M A, Fankam A G, Shahat A A and Efferth T (2013) Cytotoxicity, mode of action and antibacterial activities of selected Saudi Arabian medicinal plants, BMC Complementary and Alternative Medicine, 13: 354-365

19- Kuete and Efferth (2015) African Flora Has the Potential to Fight Multidrug Resistance of Cancer, BioMed Research International, 2015: 1-24

20- Kutchan T M (1995) Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants, The Plant Cell, 7: 1059-1070

21- Lautie E, Fliniaux M A and Villarreal M L (2010) Updated biotechnological approaches developed for 2,7_-cyclolignan production, Biotechnol. Appl. Biochem. (2010) 55, 139–153

22- MacLeod RA and Drexler HG (2005) Cytogenetic Analysis of Cell Lines In: Methods in molecular biology, J.M. Walker (SERIES EDITOR) Springer

23- Michalak A (2006) Phenolic Compounds and Their Antioxidant Activity in Plants Growing

under Heavy Metal Stress, Polish J. of Environ. Stud.,15: 523-530

24- Raissi A, Arbabi M, Roustakhiz J and Hosseini M (2016) *Haplophyllum tuberculatum*: An overview, Journal of Herbal Mededicine Pharmacology 5: 125-130

25- Rechinger K H (ed.), Flora Iranica, Fasc. 111-162 (1975-1987) Wiley Online Library.

26- Ruffa M J, Ferraro G, Wagner M L, Calcagno M L, Campos R H and Cavallaro L (2002) Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line, Journal of Ethnopharmacology 79: 335–339

27- Sabry O M M, El Sayed L M and Alshalmani S K (2016) GC/MS Analysis and Potential Cytotoxic Activity of *Haplophyllum tuberculatum* Essential Oils Against Lung and Liver Cancer Cells, Pharmacognosy Journal, 8: 66-69

28- Setterblad N, Becart S, Charron D and Moony N (2001) Signaling via MHC class II molecules modifies the composition of GEMs in APC, Scandinavian Journal of Immunology, 54: 87-92

29- Sheriha G M, Abou Amer K M, Elshtaiwi B Z, Ashour A S, Abed F A and Alhallaq H (1987) Quinoline alkaloids and cytotoxic lignans from *Haplophyllum tuberculatum*, Phytochemistry, 26: 3339-3341

30- Sheriha G M and Abou Amer K M (1984) Lignans of *haplophyllum tuberculatum* Phytochemistry, 23: 151-153

31- Soltani M, and Khosravi AR (2005) A new species of *Haplophyllum* (Rutaceae) from SW Iran. Willdenowia, 293-298

32- Stanković, MS (2011) Total phenolic content, flavonoid concentration and antioxidant activity of Marrubium peregrinum L. extracts. Kragujevac Journal of Science, 33: p. 63-72

33- Thirupathi K, Krishna D R, Mohan G K, Mallaiah G K (2013) Anticancer Activity of *Cleistanthus collinus*, BioMedRx.,1: 392-396

34- Ulubelen A and Öztürk M (2008) Alkaloids, Coumarins and Lignans from *Haplophyllum* Species, Records 0f Natural products, 2: 54-69

35- Ünver-Somer N, Kaya G I, Sarıkaya B, Önür M A, Özdemir C, Demirci B and Can-Bas (2012) Composition of the Essential oil of Endemic *Haplophyllum megalanthum* Bornm. from Turkey, Records of Natural Products, 6:80-83

36- Varamini P, Doroudchi M, Mohagheghzadeh A, Soltani M and Ghaderi A (2007) Cytotoxic Evaluation of Four Haplophyllum Species with Various Tumor Cell Lines, Pharmaceutical Biology, 45: 299-302

37- Yari M., Masoudi sh. and Rustaiyan A. (2000) Essential Oil of *Haplophyllum tuberculatum* (Forssk.) A. Juss. Grown Wild in Iran**,** Journal of Essential oil Research, 12: 69-70.

38- Youssef D T A (2005) Lignans of aerial parts of *Haplophyllum tuberculatum* (FORSSK) A. JUSS, Bull. Pharm. Sci., Assiut University, 28: 261-267

Cytotoxic evaluations of metanolic extract fractions from *Haplophyllum tuberculatum* against RAJI and A549 cancerous cell lines

Dastranj F., Karimi F. and Rahmani N.

Biology Dept., Faculty of Basic Sciences, Shahed University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Haplophyllum tuberculatum (Forssk.) A. Juss., is a perennial plant from Rutaceae which is a valuable folk medicinal plant. The leaves, stem and root samples of shadow dried plants gathered from Hormozgan province-IRAN, were extracted with methanol and total phenolics, flavonoids and alkaloids contents were determined by spectrophotometer. Then the methanolic extract was fractionated by di-ethyl-ether, chloroform, butanol, and water respectively. The cytotoxic effects of fractionated extracts were evaluated against RAJI and A549 cancerous cell lines and intact blood lymphocyte cells by MTT assay. Results showed that the most phenolics were accumulated in stems and the most alkaloids and flavonoids contents were observed in the plant leaves. Di-ethyl-ether extract from all three plant organs had moderate cytotoxic effect (IC_{50} < 200 µg/mL) against A549 cell line. Overall cytotoxic effects against A549 were more than RAJI cell line. None of the extracts had cytotoxicity against intact blood lymphocyte cells. It seems that the plant chemicals while have no cytotoxic effects on intact cells, have specific effects on different cancerous cell lines. The results suggest that the purified chemicals of the plant may be benefit for pharmaceutical uses. The present study is the first report on evaluation of cytotoxic activities of fractions with different polarities obtained from methanolic extract of Iranian *H. tuberculatum* species against A549 and RAJI cell lines.

Key words: Cytotoxic effect, *Haplophyllum tuberculatum*, Methanolic Extract