جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی و یکم/شماره ۲۵۳/هفته سوم آبان ماه ۱۳۹۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۴/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۷/۱۸

اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف از گونه‌ی Taxus baccata L. موجود در ایران بر روی ۳ رده‌ی سلولی سرطانی MDA–MB–468، Hela و K562

دکتر حجت صادقی علی‌آبادی[۱]، مهشید علوی[۲]، دکتر غلامرضا اصغری[۳]، مینا میریان[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: Taxus baccata L به عنوان منبعی برای داروی ضد سرطان تاکسول به شمار می‌رود. مطالعه‌ی حاضر با هدف بررسی هم‌خوانی نتایج حاصله از معرفی یک سیستم بهینه‌ی حلال جهت استخراج تاکسان‌ها از گونه‌ی Taxus baccata با مطالعات بیولوژیک انجام گرفت.

روش‌ها: سه رده‌ی سلولی MDA-MB-468، Hela و K562 در محیط RPMI-1640 با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی کشت داده شدند. پودر سر شاخه‌های گیاه T. baccata L. با استفاده از ۸ سیستم حلال به روش ماسراسیون عصاره‌گیری شد. جهت استانداردسازی عصاره‌ها از روش HPTLC (High performance thin layer chromatography) استفاده شد. سمیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (استون ۱۰۰، ۵۰ و ۲۰ درصد و اتانول ۹۶، ۵۰ و ۲۰ درصد و استون–دی کلرومتان ۱ به ۱ و متانول خالص) بر روی سلول‌های کشت داده‌شده با استفاده از روش MTT بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج تست MTT نشان داد که عصاره‌ی استون– دی کلرومتان و سپس استون خالص بیشترین سمیت سلولی را داشتند. به علاوه در بین ۳ رده‌ی سلولی مورد آزمایش، بیشترین اثر سیتوتوکسیک این عصاره‌ها روی رده‌ی سلولی K562 مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که در بین عصارهای مورد مطالعه، اثر سیتوتوکسیک، بیشتر از عصاره‌ی استون– دی کلرومتان و سپس عصاره‌ی استون خالص دیده می‌شود، همان گونه که آنالیز ترکیبات توسط TLC Scanner و HPLC بیشترین میزان تاکسان‌ها را در عصاره‌های مذکور(استون– دی کلرومتان و استون خالص) نشان می‌دهد، می‌توان نتیجه گرفت که ارتباط مستقیمی بین میزان تاکسان‌ها و اثر سیتوتوکسیک وجود دارد.

واژگان کلیدی: سمیت سلولی، آزمون رنگ سنجی MTT، عصاره‌گیری، تاکسول، TLC Scanner، Taxus baccata L.

ارجاع: صادقی علی‌آبادی حجت، علوی مهشید، اصغری غلامرضا، میریان مینا. **اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف از گونه‌ی Taxus baccata L. موجود در ایران بر روی ۳ رده‌ی سلولی سرطانی MDA–MB–468، Hela و K562.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۲؛ ۳۱ (۲۵۳): ۱۵۱۷-۱۵۰۸

مقدمه

گیاه Taxus baccata L. با نام‌های عمومی سرخ‌دار انگلیسی، سرخ‌دار اروپایی و سرخ‌دار معمولی در نوار شمالی کره‌ی زمین در محدوده‌ی بین انگلستان تا شمال ایران گسترش دارد. به علاوه در شمال امریکا نیز جنگل‌های وسیعی از آن مشاهده می‌شود. در

*این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۳۹۱۴۱۰ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استاد، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- دانشجوی داروسازی، گروه شیمی دارویی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی ایران، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- کارشناس ارشد، گروه بیوتکنولوژی، دانشکده‌ی داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر حجت صادقی علی‌آبادی
Email: sadeghi@pharm.mui.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

رده‌بندی گیاهی، سرخدار اغلب در خانواده‌ی Taxaceae قرار می‌گیرد. البته در بین محققین در مورد تعیین خانواده‌ی سرخدار اختلاف نظر وجود دارد (۱).

تاکسول یکی از مهم‌ترین ترکیبات طبیعی ضد سرطان است که از پوست و یا برگ‌ها و سر شاخه‌های گیاهان خانواده‌ی سرخدار از جمله Taxus brevifolia و T. baccata L. استخراج شده است. طی تحقیقات انجام‌شده در سال‌های اخیر، علاوه بر اثرات ضد سرطانی تاکسول خواص دیگری هم از این دارو کشف شده است. از جمله می‌توان به تأثیر آن در درمان آرتریت روماتویید، مولتیپل اسکلروز، پسوریازیس، چسبندگی ناشی از جراحی، بیماری التهابی روده و بیماری نورواسکولار چشم اشاره نمود (۲). تاکسول دارای ساختمان پیچیده‌ای است و متشکل از یک اسکلت کربنی، یک بخش زنجیر جانبی با مجموعه‌ای از یازده مرکز فضایی (Stereocenter) می‌باشد (۳). تاکسول بسیار لیپوفیل است (۴) و وجود تعداد زیاد اتم‌های کربن نامتقارن سنتز کامل آن را مشکل کرده است (۵)، بنابراین بیشتر به صورت نیمه صناعی تهیه می‌شود.

به دلیل رشد کند درخت سرخدار و درصد کم ماده‌ی مؤثره‌ی تاکسول در پوست گیاه، استخراج مقدار زیادی از تاکسول که بتواند جواب‌گوی نیاز جامعه‌ی بشری باشد، معادل با از دست دادن ذخایر با ارزش سرخدار خواهد بود. به همین علت در مطالعه‌ی قبلی که توسط همین گروه انجام شد (۶) تصمیم گرفته شد تا از سرشاخه‌های گیاه T. baccata که گونه‌ی غالب در جنگل‌های شمال ایران است و یک منبع تجدیدپذیر می‌باشد جهت استخراج تاکسول و سایر تاکسان‌ها استفاده شود. از طرف دیگر معرفی روش‌هایی که بتواند بیشترین مقدار تاکسان‌ها را با کمترین هزینه استخراج کند، مد نظر محققان است و مطالعات زیادی در این خصوص صورت گرفته است (۸-۷). صادقی و همکاران با بررسی سیستم‌های حلال از جمله آب، اتانول و استون به روش HPLC (High-performance liquid chromatography) به این نتیجه رسیدند که عصاره‌ی استخراج‌شده توسط سیستم حلال استون ۱۰۰ درصد حاوی بیشترین مقدار تاکسول و سایر تاکسان‌ها می‌باشد. بنابراین با به کارگیری یک سیستم بهینه‌ی حلال می‌توان از برگ‌ها و سر شاخه‌های گیاه T. baccata بیشترین میزان تاکسان‌ها را استخراج کرد. به دلیل تنوع حلال‌های مختلف که برای استخراج تاکسول استفاده شد، ضرورت داشت نتایج حاصله از مطالعات قبلی توسط روش‌های دیگر نیز راستی‌سنجی شود. از این رو جهت تأیید این که اگر استون ۱۰۰ درصد بیشترین مقدار تاکسان‌ها را استخراج کند و به عنوان حلال بهینه معرفی شود، باید بیشترین سمیت سلولی را نیز از خود نشان دهد، در این مطالعه عصاره‌های مختلف اتانولی و استونی بر روی ۳ رده‌ی سلولی سرطانی MDA-MB-468، Hela و K562 با استفاده از MTT بررسی شد و هم‌خوانی نتایج مورد بحث قرار گرفت.

روش‌ها

تهیه‌ی پودر سر شاخه و عصاره

در این مطالعه، گیاه T. baccata L. از منطقه‌ی گرگان در شمال ایران جمع‌آوری شد و جنس و گونه‌ی آن توسط کارشناسان مرکز جهاد کشاورزی استان گلستان تأیید گردید. سر شاخه‌های گیاه توسط آسیاب خرد شد و ۲۰ گرم از پودر آن در

www.mui.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۱۰۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌ها به روش ماسراسیون عصاره‌گیری گردید. حلال‌های مورد استفاده عبارت بودند از: اتانول با درصدهای ۲۰، ۵۰ و ۹۶، استون با درصدهای ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰، مخلوط استون و دی کلرومتان به نسبت ۱ به ۱ و متانول ۱۰۰ درصد.

استانداردسازی عصاره‌ی گیاه T. baccata با روش HPTLC (High performance thin layer chromatography):

تاکسول یکی از اجزای اصلی گیاه T. baccata L. و مسؤول فعالیت‌های بیولوژیکی آن معرفی شده است. یروش کروماتوگرافی لایه‌ی نازک با عملکرد بالای قابل تکرار و دقیق با کمک TLC scaner بر روی عصاره‌ی T. baccata برای معرفی تاکسول انجام شد. به طور خلاصه، از برگ‌های سوزنی شکل گیاه T. baccata خشک‌شده ۵ گرم وزن و با ۲۰ میلی‌لیتر استون- دی کلرومتان (۱ به ۱) عصاره‌گیری شد (۳ مرتبه).

عصاره‌های T. baccata با یکدیگر مخلوط شد و حلال آن تبخیر گردید. عصاره‌ی خشک‌شده به وسیله‌ی کارتریج (Sep-pak) با ۲۰ میلی‌لیتر حلال اتانول- آب با نسبت ۶۰ به ۴۰ فیلتر گردید و شسته شد و با استفاده از خلأ تغلیظ شد تا ۱۳۳ میلی‌گرم ماده‌ی خشک حاصل شود.

این عصاره‌ی حاوی دی ترین‌های تاکسویید، در ۱ میلی‌لیتر اتیل استات حل شد. نمونه‌ی عصاره با دستگاه TLC-scaner آنالیز گردید (۹).

تهیه‌ی محلول استوک

همه‌ی عصاره‌ها به وسیله‌ی روتاری در دمای پایین، عاری از حلال شدند و عصاره‌ی خشک با غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر در DMSO (Dimethyl sulfoxide) حل شد. این محلول به عنوان استوک منظور گردید. غلظت‌های ۰/۸، ۰/۶، ۰/۴ و ۰/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از هر عصاره با رقیق کردن محلول استوک در محیط کشت PRMI تهیه گردید (غلظت‌سازی به گونه‌ای بود که میزان DMSO در مجاورت سلول کمتر از ۱ درصد باشد).

کشت سلول

رده‌های سلولی مورد نیاز شامل MDA-MB-468 از سرطان پستان انسان، K562 از سرطان خون و Hela از سرطان رحم از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری گردید. سلول‌ها در محیط کشت (Gibco) RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و در حضور L-گلوتامین (۲ میلی‌مول) و محلول پنی‌سیلین- استرپتومایسین (۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، کشت داده شدند و در انکوباتور CO_2 (Napco) و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در محیطی شامل ۵ درصد CO_2 و ۹۵ درصد هوا انکوبه گردید. تعویض محیط کشت هر ۲ روز یک بار انجام گرفت. سلول‌ها بر حسب اشغال ۸۰ درصد از فضای کف فلاسک در زمان‌های مناسب واکشت داده شدند.

بررسی اثر سیتوتوکسیسیتی با روش MTT

اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های تهیه‌شده بر روی سلول‌های سرطانی ذکرشده با روش رنگ‌سنجی، با استفاده از رنگ تترازولیوم با نام شیمیایی 3 - (4,5 - dimethylthiazol - 2yl) -2,5 - dipheny Tetrazolium bromide که به اختصار MTT نامیده می‌شود، در مقایسه با گروه‌های شاهد بررسی شد (۱۰).

این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که طی آن محلول زرد رنگ MTT تحت تأثیر

www.mui.ac.ir

این آنزیم به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود، جذب این کریستال‌ها بعد از حل کردن در DMSO با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر بر اساس آن چه پیش از این گزارش شده است، خوانده شد (۱۱). به طور خلاصه ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (۲×۱۰^{۴} سلول در هر میلی‌لیتر) در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر غلظت‌های مختلف تهیه‌شده از عصاره‌ها به چاهک‌های حاوی سلول اضافه شد. دوکسوروبیسین با غلظت ۰/۱ میلی‌مولار به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. برای شاهد منفی از محیط کشت حاوی یک درصد DMSO استفاده گردید. میکروپلیت‌های حاوی سلول و عصاره به مدت ۴۸ ساعت در شرایط یکسان انکوبه شدند. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. آن گاه ۱۵۰ میکرولیتر DMSO جایگزین محیط کشت رویی سلول‌های انکوبه‌شده با MTT شد و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به آرامی پیپتاژ گردید. جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه ELISA reader (Awareness) سنجیده شد. درصد بقای سلولی در گروه شاهد منفی ۱۰۰ منظور گردید و درصد بقای سلول‌هایی که تحت تأثیر غلظت خاص از عصاره قرار گرفتند با تقسیم جذب چاهک‌های تیمارشده به جذب شاهد منفی ضرب در ۱۰۰ محاسبه گردید. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد، به عنوان IC_{50} در نظر گرفته شد. این مقدار از روی نمودار با استفاده از نرم‌افزار Excel تعیین گشت.

برای انجام آنالیز اطلاعات گروه‌های آزمایشی مختلف از نرم‌افزار SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL) استفاده گردید. نتایج گروه‌های مختلف با استفاده از One way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت از این آزمون برای به دست آوردن واریانس داده‌ها جهت تعیین معنی‌دار بودن یا نبودن استفاده گردید. سطح معنی‌دار بودن اختلاف $P < ۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

استانداردسازی عصاره‌ی T. baccata با استفاده از HPTLC

میزان RF (Retardation factor) برای تاکسول خالص ۰/۰۰۶ ± ۰/۴۱۴ به دست آمد. با کمک Camag TLC اسکنر و نرم‌افزار Wincats، منحنی کالیبراسیون به وسیله‌ی ضریب همبستگی خطی در محدوده‌ی ۳۲۰-۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. معادله‌ی Regression به صورت $y = ۷/۷۳۹x + ۱۰۰/۱۷۴$ به دست آمد که در آن x غلظت تاکسول در نمونه بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر است ($R^2 = ۰/۹۹۹۲$).

سپس نمونه‌ی به دست‌آمده از عصاره‌ی T. baccata مورد استفاده قرار گرفت و غلظت آن از طریق منحنی کالیبراسیون تاکسول تعیین شد.

عصاره‌ی استون- دی کلرومتان (۱ به ۱) خشک‌شده از T. baccata، که استاندارد شده بود، حاوی ۰/۰۲۴ ± ۰/۲۲۷ درصد تاکسول بود.

مطالعات بیولوژیک

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف بر روی سلول MDA-MB-468: نتایج حاصل از بررسی اثر

سیتوتوکسیسیتی ۸ عصاره‌ی قطبی و غیر قطبی در ۵ غلظت مختلف از سر شاخه‌های گیاه T. baccata به ترتیب زیر به دست آمد:

استون– دی کلرومتان (۱–۱) > استون ۱۰۰ درصد > اتانول ۹۶ درصد > متانول ۱۰۰ درصد > اتانول ۵۰ درصد > استون ۵۰ درصد > استون ۲۰ درصد > اتانول ۲۰ درصد.

اثر عصاره‌ی استون ۱۰۰ درصد از غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به بالا و اتانول ۹۶ درصد از غلظت ۴۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به بالا وابسته به غلظت بودند.

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف بر روی سلول Hela: نتایج حاصل از بررسی سیتوتوکسیسیتی ۸ عصاره‌ی مورد مطالعه بر روی سلول‌های Hela به ترتیب زیر به دست آمد:

استون– دی کلرومتان (۱–۱) > استون ۱۰۰ درصد > متانول ۱۰۰ درصد > اتانول ۹۶ درصد > استون ۵۰ درصد > اتانول ۵۰ درصد > استون ۲۰ درصد > اتانول ۲۰ درصد.

اثر عصاره استون ۵۰ درصد و اتانول ۵۰ درصد و استون– دی کلرومتان (۱–۱) از غلظت ۸۰ µg/ml به بالا و عصاره متانولی از غلظت ۶۰ µg/ml به بالا وابسته به غلظت بودند. به طوری که هر چه غلظت عصاره افزایش یافت اثر سایتوتوکسیک بیشتر مشاهده گردید.

بررسی اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف بر روی سلول K562: نتایج نشان داد که عصاره‌های مختلف بر روی این رده‌ی سلولی نیز دارای اثر سیتوتوکسیک بارزی می‌باشد، ترتیب اثربخشی بدین شرح بود:

استون– دی کلرومتان (۱–۱) > متانول ۱۰۰ درصد > استون ۱۰۰ درصد > استون ۵۰ درصد > اتانول ۹۶ درصد > اتانول ۵۰ درصد > استون ۲۰ درصد > اتانول ۲۰ درصد.

در این رده‌ی سلولی نتایج نشان داد که اثر عصاره‌های استون ۵۰ و ۱۰۰ درصد و اتانول ۵۰ درصد از غلظت ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر به بالا وابسته به غلظت بودند.

در این بررسی نمونه‌هایی که باعث حداقل مهار رشدی معادل ۵۰ درصد در محدوده‌ی غلظت‌های مورد نظر شدند، به عنوان نمونه‌های سیتوتوکسیک در نظر گرفته شدند. در نهایت IC_{50} عصاره‌های مختلف با استفاده از نمودار به صورت تقریبی برآورد گردید که این نتایج در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱. C_{50} تقریبی عصاره‌های مختلف Taxus baccata بر حسب میکروگرم در میلی‌لیتر روی رده‌های سلولی Hela، MDA-MB-468 و K562

عصاره	Hela	MDA-MB-468	K562
استون ۲۰ درصد	> ۱۰۰	> ۱۰۰	< ۲۰
استون ۵۰ درصد	# ۹۰	> ۱۰۰	< ۲۰
استون ۱۰۰ درصد	# ۵۵	# ۱۰۰	< ۲۰
اتانول ۲۰ درصد	> ۱۰۰	> ۱۰۰	< ۲۰
اتانول ۵۰ درصد	> ۱۰۰	> ۱۰۰	< ۲۰
اتانول ۹۶ درصد	# ۷۵	> ۱۰۰	< ۲۰
متانول ۱۰۰ درصد	# ۷۰	> ۱۰۰	< ۲۰
استون– دی کلرومتان (۱–۱)	# ۵۰	# ۸۵	< ۲۰

علامت # معرف گرد شدن اعداد است.

محدوده‌ی غلظت‌های مورد بررسی (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) عصاره‌ها به شدت سیتوتوکسیک بودند، در حالی که این عصاره‌ها بر روی رده‌ی سلولی Hela دارای اثری متوسط و بر روی رده‌ی سلولی MDA-MB-468 کمترین اثر را نشان دادند.

در تمام رده‌های سلولی، عصاره‌های غیر قطبی اثر سیتوتوکسیک بیشتری نسبت به عصاره‌های قطبی از خود نشان دادند به طوری که هر چه عصاره‌ها قطبی‌تر شدند، اثر سیتوتوکسیک کاهش یافت ($P < ۰/۰۵$). در اثربخشی عصاره‌هایی با قطبیت بالا اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. نتایج حاصل از تأثیر ۸ عصاره‌ی تهیه‌شده بر روی رده‌های سلولی سرطانی مورد مطالعه در شکل ۱ آمده است.

بحث

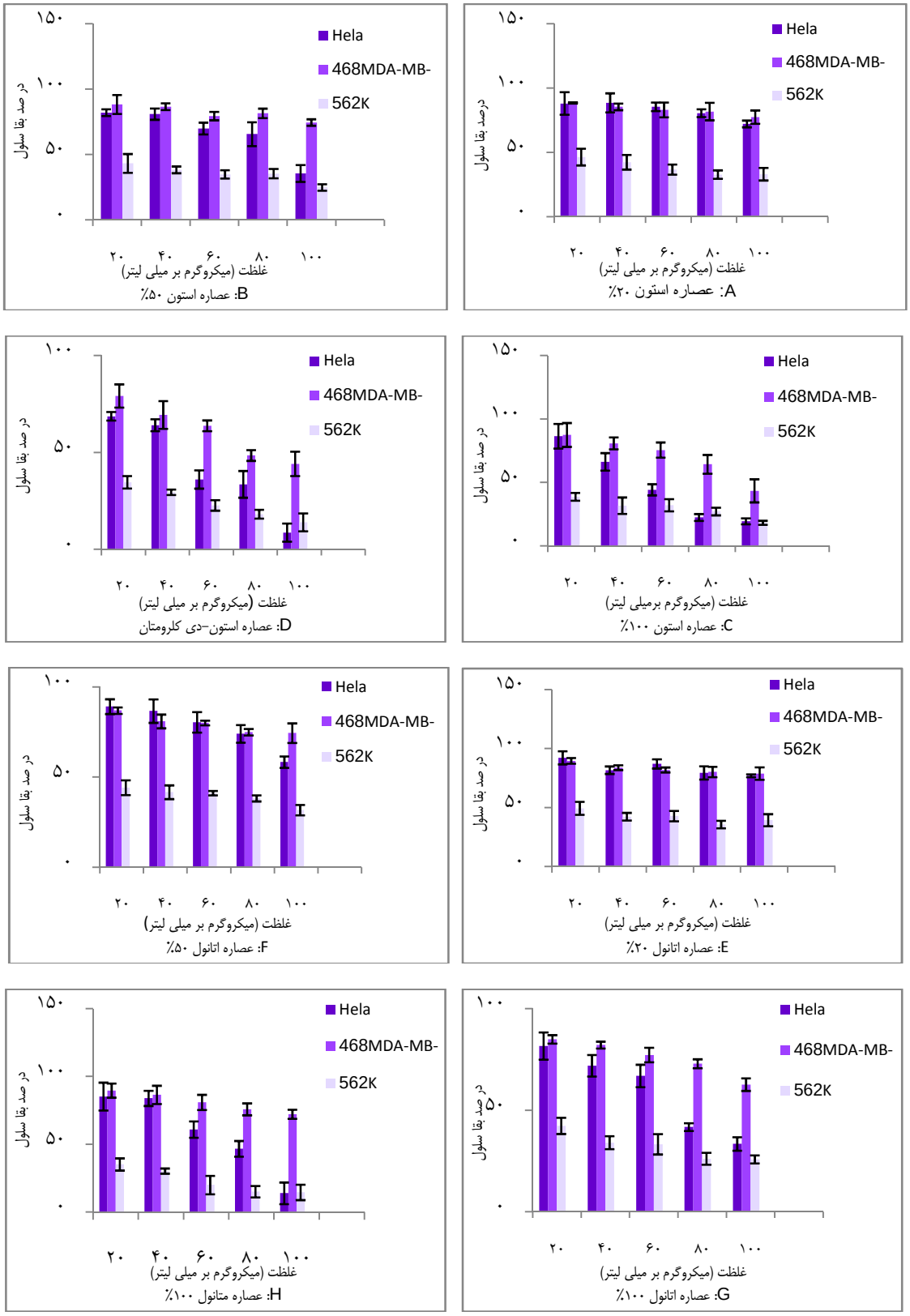
تاکسول (Taxol) بهترین داروی طبیعی ضد سرطان است که طی ۱۵ سال اخیر شناخته شده است (۱۲). گسترش و استفاده‌ی بیشتر از این داروی مفید وابسته به تولید آن به یک روش مؤثر، اقتصادی و آسان است؛ اما تنها منبع فعلی تاکسول پوست درخت سرخ‌دار می‌باشد و سایر روش‌های تهیه و تولید آن هنوز اقتصادی نیست. بنابراین دورنمای استفاده از این داروی پر ارزش به دلیل محدودیت منابع آن نگران‌کننده به نظر می‌رسد (۱۳). بنابراین ارائه‌ی روشی که بتواند حداکثر تاکسول را از کمترین مقدار گیاه استخراج کند ضروری به نظر می‌رسد.

در مطالعه‌ای که پیش از این به منظور بهینه‌سازی استخراج تاکسول از گیاه T. baccata به وسیله‌ی سیستم‌های مختلف حلال توسط همین گروه انجام گرفت، ۶ عصاره‌ی استون ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ درصد و اتانول ۲۰، ۵۰ و ۹۶ درصد مورد آزمایش قرار گرفت (۶). در مطالعه‌ی حاضر همه‌ی عصاره‌های فوق‌الذکر به همراه یک عصاره‌ی استون- دی کلرومتان (۱-۱) و یک عصاره‌ی متانول ۱۰۰ درصد که با استفاده از دستگاه سونیکاتور عصاره‌گیری شده بود، مورد آزمایش قرار گرفت، تا نتایج این دو مطالعه مورد مقایسه قرار گیرد. در مطالعه‌ی قبلی این گروه بازدهی ۶ سیستم حلال مختلف در استخراج تاکسان‌ها و از جمله خود تاکسول بدین صورت ردیف شده است (۶):

استون ۱۰۰ درصد > استون ۵۰ درصد > اتانول ۵۰ درصد > اتانول ۹۶ درصد > استون ۲۰ درصد > اتانول ۲۰ درصد

مطالعه‌ی حاضر از طریق بررسی اثرات بیولوژیک عصاره‌های استخراج‌شده قصد داشت نتایج مطالعه‌ی قبلی را تأیید نماید. نتایج حاصله از این مطالعه نشان داد که بیشترین اثر سیتوتوکسیک مربوط به عصاره‌ی استخراج‌شده به وسیله‌ی سیستم استون- دی کلرومتان (۱ به ۱) بود. این سیستم حلال در مطالعه‌ی صادقی و همکاران به کار نرفته بود، ولی بعد از آن عصاره‌ی استون ۱۰۰ درصد بیشترین اثر سیتوتوکسیک را روی هر ۳ رده‌ی سلولی مورد آزمایش نشان داد. این نتایج با مطالعه‌ی قبلی همین گروه که نشان داد استون ۱۰۰ درصد بیشترین مقدار تاکسان‌ها را استخراج کرده است (۶)، هم‌خوانی دارد.

طبق نتایج مطالعه‌ی صادقی و همکاران افزایش قطبیت در حلال‌های استونی و اتانولی باعث کاهش استخراج تاکسول شده است و این گونه استدلال شده است که تأثیر حلال مرتبط با ماهیت حلال و ساختمان شیمیایی ترکیب هدف و گروه‌های عاملی



شکل ۱. نمودار اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف بر روی ۳ رده‌ی سلولی مورد آزمایش. سلول‌ها در مجاورت غلظت‌های مختلفی از عصاره همان گونه که در شکل‌های A تا H دیده می‌شود قرار گرفتند و درصد بقای آن‌ها بعد از ۴۸ ساعت مجاورت با عصاره‌ی اندازه‌گیری شد. نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین حاصل از ۳ بار تکرار، بیان شده است.

موجود در ترکیب می‌باشد (۶). نتایج مطالعه‌ی حاضر در راستای نتایج قبلی نشان می‌دهد که با افزایش قطبیت در حلال‌های استونی و اتانولی اثر سایتوتوکسیک در هر ۳ رده‌ی سلولی کاهش یافت.

در مطالعات قبلی که توسط سایر محققین در این زمینه صورت گرفت، برای استخراج تاکسول از گیاه و یا از محیط کشت از حلال‌هایی چون اتانول و یا متانول استفاده شده است (۱۵-۱۴). نتیجه‌ی یکی از این مطالعات نشان می‌دهد که به کمک استون و یا متانول نزدیک به ۹۰ درصد تاکسول از گیاه و یا محیط کشت استخراج شده است (۱۶). اما در این مطالعه با توجه به سمیت بالاتر متانول نسبت به استون، استفاده از استون به عنوان یکی از حلال‌های مورد بررسی جهت استخراج مد نظر قرار گرفت. تأثیر قطبیت سیستم‌های مختلف حلال بر روی استخراج بیشتر تاکسوییدها با مخلوط کردن هر یک از حلال‌ها با آب مورد بررسی قرار گرفت که در هر دو مورد استون و اتانول با افزایش قطبیت اثر سیتوتوکسیک کاهش پیدا کرد. بعضی از محققین نیز از اتانول به عنوان حلال استخراج نام برده‌اند (۱۷).

با توجه به تطابق نتیجه‌گیری در پژوهش حاضر و پژوهش قبلی (۶) می‌توان به این نتیجه برسیم که عصاره‌ی استخراج‌شده با استون ۱۰۰ درصد، بیشترین تأثیر سیتوتوکسیک را در بین ۶ عصاره‌ی مشترک در هر دو آزمایش دارد. به هر حال حلال‌های حاوی استون نتیجه‌ی بهتری نسبت به حلال‌های حاوی اتانول در استخراج تاکسول داشتند. طبق مطالعات قبلی بیشترین استخراج تاکسول از پوست گونه‌ی T. brevifolia به دست آمد، که این اقدام منجر به نابودی درخت می‌گردد (۱۴). اما طبق مطالعه‌ی حاضر و مطالعه‌ی صادقی و همکاران (۶) می‌توان از برگ‌ها و سر شاخه‌های گونه‌ی گیاه T. baccata که منبعی تجدیدپذیر هستند جهت استخراج تاکسول و سایر ترکیبات سیتوتوکسیک احتمالی استفاده کرد. بر اساس نتایج حاصله از مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌های مورد آزمایش بیشترین اثر سیتوتوکسیک را روی رده‌ی سلولی K562 که یک رده‌ی سلول سرطانی خونی است، نشان دادند. این مسأله می‌تواند مؤید دو نظریه باشد اول این که حساسیت رده‌های سلولی در برابر ترکیبات طبیعی سنتتیک سیتوتوکسیک متفاوت می‌باشد (۱۸) و دوم این که ممکن است مواد متشکله‌ی موجود در عصاره‌های حاصل از گیاه T. baccata به عنوان کاندیداهای خوبی برای اثر بر سرطان خون معرفی گردند. جهت اثبات این نظریه نیاز به مطالعات بیشتری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان که هزینه‌های این پروژه را تأمین کردند و همچنین از مرکز جهاد کشاورزی استان گلستان جهت تهیه‌ی گیاه، قدردانی می‌نمایند.

References

1. Zamani S, Abbasian Z, Khaksar G, Movahedi S, Talebi M, Tabatabaei BES. Genomic diversity among yew (Taxus baccata) genotypes of Iran revealed by random amplified polymorphism DNA markers. International Journal of Agriculture and Biology 2008; 10(6): 648-52.
2. Khazir J, Mir BA, Mir SA, Cowan D. Natural products as lead compounds in drug discovery. J

Asian Nat Prod Res 2013; 15(7): 764-88.
3. Farina V. The Chemistry and Pharmacology of Taxol and Its Derivatives. Vol. 22. Amsterdam, The Netherland: Elsevier Science Limited; 1995. p. 55-102.
4. Wada M, Jinno H, Ueda M, Ikeda T, Kitajima M, Konno T, et al. Efficacy of an MPC-BMA co-polymer as a nanotransporter for paclitaxel. Anticancer Res 2007; 27(3B): 1431-5.
5. DeFuria MD, Horovitz Z. Taxol commercial supply strategy. J Natl Cancer Inst Monogr 1993; (15): 195-8.
6. Sadeghi-aliabadi H, Asghari G, Mostafavi SA, Esmaeili A. Solvent optimization on Taxol extraction from Taxus baccata L., using HPLC and LC-MS. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences 2009; 17(3): 192-8.
7. Talebi M, Ghassempour A, Talebpour Z, Rassouli A, Dolatyari L. Optimization of the extraction of paclitaxel from Taxus baccata L. by the use of microwave energy. J Sep Sci 2004; 27(13): 1130-6.
8. Ciccolini J, Catalin J, Blachon MF, Durand A. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of docetaxel (Taxotere) in plasma using liquid-liquid extraction. J Chromatogr B Biomed Sci Appl 2001; 759(2): 299-306.
9. Gangadevi V, Muthumary J. A simple and rapid method for the determination of taxol produced by fungal endophytes from medicinal plants using high performance thin layer chromatography. Se Pu 2008; 26(1): 50-5.
10. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 1983; 65(1-2): 55-63.
11. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res 1987; 47(4): 936-42.
12. Reichman BS, Seidman AD, Crown JP, Heelan R, Yao TJ, Hakes TB, et al. Taxol and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, an active regimen as initial therapy for metastatic breast cancer. A preliminary report. Ann N Y Acad Sci 1993; 698: 398-402.
13. Hezari M, Croteau R. Taxol biosynthesis: an update. Planta Med 1997; 63(4): 291-5.
14. Banskota AH, Usia T, Tezuka Y, Kouda K, Nguyen NT, Kadota S. Three new C-14 oxygenated taxanes from the wood of Taxus yunnanensis. J Nat Prod 2002; 65(11): 1700-2.
15. Bai J, Kitabatake M, Toyoizumi K, Fu L, Zhang S, Dai J, et al. Production of biologically active taxoids by a callus culture of Taxus cuspidata. J Nat Prod 2004; 67(1): 58-63.
16. Gabetta B, Fuzzati N, Orsini P, Peterlongo F, Appendino G, Vander Velde DG. Paclitaxel analogues from Taxus x media cv. Hicksii. J Nat Prod 1999; 62(2): 219-23.
17. Chen R, Kingston DG. Isolation and structure elucidation of new taxoids from Taxus brevifolia. J Nat Prod 1994; 57(7): 1017-21.
18. Javidnia K, Miri R, Amirghofran Z, Jafari A, Amoozegar Z. Cytotoxicity and antimicrobial assessment of Euphorbia hebecarpa. Iran j Pharm Res 2004; 3(2): 75-82.

Journal of Isfahan Medical School Received: 06.07.2013

Vol. 31, No. 253, 3rd Week, November 2013 Accepted: 10.10.2013

Cytotoxic Evaluation of Different Extracts of *Taxus Baccata* against MDA–MB–468, HeLa and K562 Cancer Cell Lines

Hojjat Sadeghi-Aliabadi PhD[1], Mahshid Alavi[2], Gholamreza Asghari PhD[3], Mina Mirian[3]

Original Article

Abstract

Background: Taxus baccata is known as a source of anticancer drug called taxol. This study was performed to confirm the consistency of results obtained by extraction of Taxanes by optimal solvent system using biological assessment.

Methods: Three cell lines including MDA-MB-468, Hela and K562 were cultured in PRMI-1640 medium with 10% fetal bovine serum. Powder of aerial parts of Taxus baccata was extracted using 8 different solvent by maceration method. High performance thin layer chromatography (HPTLC) was used to standardize the extracts according to taxol content. Cytotoxicity of different concentrations of extracts (acetone 20, 50 and 100 %, ethanol 20, 50 and 100%, acetone dichloromethane (1-1), and pure methanol) was evaluated against cultured cells, using MTT assay.

Findings: Acetone-dichloromrthane (1-1) then pure acetone extract were the most cytotoxic extracts. Meanwhile, between the three cell lines tested, the highest cytotoxic effect of the extracts was observed on K562 cells.

Conclusion: The results of this study showed that among evaluated extracts, more cytotoxic effect wsa in acetone-dichloromethane (1-1) followed by pure acetone extract. Analysis of extracts showed that the highest amount of taxans has been extracted by acetone-dichloromethane or pure acetone solvent system. We can conclude that there is a direct correlation between the cytotoxic effect and amount of taxans.

Keywords: Cytotoxicity, MTT assay, Extraction, Taxol, Thin layer chromatography (TLC) Scanner, Taxus baccata

Citation: Sadeghi-Aliabadi H, Alavi M, Asghari Gh, Mirian M. **Cytotoxic Evaluation of Different Extracts of *Taxus Baccata* against MDA–MB–468, HeLa and K562 Cancer Cell Lines.** J Isfahan Med Sch 2013; 31(253): 1508-17

* This paper is derived from a Pharm D doctorate thesis No. 391410 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Professor, Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Student of Pharmacy, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Isfahan Pharmaceutical Sciences Center, School of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- PhD Student, Department of Medical Biology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Hojjat Sadeghi–Aliabadi PhD, Email: sadeghi@pharm.mui.ac.ir