مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۸، شماره ۴، مهر و آبان ۱۴۰۲(شماره پی در پی ۱۵۹)

تأثیر عصاره جفت بلوط(*Quercus brantii*) و ترکیب آن با سیس پلاتین بر روی رده سلولیAGS سرطان معده

سالار اندرزی[۱]، هیبت‌الله صادقی[۲]، سید منصور سید نژاد[۱]، محمدرضا حجاری[۱*]

[۱]گروه زیست‌شناسی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، [۲]مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ وصول: ۱۴۰۱/۱۱/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: عصاره جفت بلوط دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد تکثیری ، ضد سرطانی قوی و سایر خواص درمانی می‌باشند، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر عصاره جفت بلوط(*Quercus brantii*) و ترکیب آن با سیس پلاتین بر روی رده سلولی(AGS) سرطان معده بود.

روش بررسی: این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در سال ۱۴۰۱ در دانشگاه شهید چمران اهواز، رده سلولی AGS در محیط RPMI-1640 کشت، با عصاره جفت و سیس پلاتین تیمار شد. بقای سلولی و شاخص ترکیبی به ترتیب با استفاده از آزمون MTT و نرم افزار Compucyn اندازه گیری شد. علاوه بر این، بیان ژن *CDK2* به عنوان یک ژن مهم درگیر در چرخه سلولی توسط Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم افزار Graph Pad Prism 6 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌های مطالعه حاضر نشان داد که عصاره جفت و سیس پلاتین سبب کاهش حیات سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شوند($p<۰/۰۰۰۱$). آنالیز داده‌های Compusyn نشان داد که این دو ماده روی هم خاصیت سینرژیسم در کشندگی سلول‌های سرطانی دارند($CI<1$) و بنابرین استفاده هم‌زمان عصاره جفت سبب افزایش سمیت سلولی داروی سیس پلاتین می‌شود. در درمان هم‌زمان مشاهد شد که بیان *CDK2* کاهش یافت و منجر به افزایش اثر ضدسرطانی سیس پلاتین شد($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه‌گیری: مطالعه حاضر نشان می‌دهد که عصاره جفت دارای خاصیت ضد تکثیری و سرطانی است. با توجه به اثرات سینرژیسم این دو دارو که می‌تواند بیان ژنی *CDK2* در چرخه سلولی را تغیر دهد و یک رویکرد ممکن برای درمان سرطان معده با قدرت بیشتر و مقدار کمتر سیس پلاتین تجویز شده برای القای سمیت سلولی را پیشنهاد می‌کند. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره جفت انتخاب مناسبی برای حساس کردن سلول های سرطانی به سیس پلاتین است.

واژه‌های کلیدی : عصاره جفت، سیس پلاتین، آدنوکارسینوما، رده سلولی AGS ، *CDK2*

[*]**نویسنده مسئول: محمدرضا حجاری،** اهواز، دانشگاه شهید چمران اهواز، گروه زیست‌شناسی

Email: Mohamad.hajari@gmail.com

مقدمه

سرطان معده(Gastric Cancer, GS)، پنجمین نوع سرطان شایع و سومین علت اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در سراسر جهان است. سرطان معده اولین سرطان شایع در آقایان و سومین سرطان شایع خانم‌ها است، هم‌چنین سرطان معده اولین عامل مرگ ناشی از سرطان‌ها می‌باشد. در سال ۱۳۹۱ سرطان معده ۱۱ درصد از کل موارد سرطان‌های ایران را تشکیل می‌داد و دومین سرطان شایع در ایران بوده است.

ترکیبی از عوامل محیطی و تجمع تغییرات ژنتیکی اختصاصی سبب بروزسرطان معده می‌شود، با وجود روند کاهشی این سرطان در سراسر جهان، پیشگیری از GC باید در اولویت باقی بماند(۱). در حال حاضر شیمی درمانی از رایج‌ترین درمان‌های سرطان می‌باشد که جهت بالا بردن طول عمر بیماران انجام می‌شود. در روش‌های شیمی درمانی مرسوم از مواد شیمیایی که هدف آنها RNA، DNA و یا پروتئین‌های سلولی است، جهت متوقف کردن تقسیم سلولی در سلول‌های سرطانی و مرگ آن‌ها استفاده می‌شود(۲). سیس پلاتین از طریق واکنش با DNA، ویژگی‌های سمیت سلولی خود را انجام می‌دهد که در نهایت منجر به آپوپتوز غیرقابل برگشت می‌شود. سپس پلاتین با جایگاه‌های N7 پورین در DNA ارتباط برقرار می‌کند و ارتباطات بین رشته‌ای و درون رشته‌ای به ویژه ApG و GpG در DNA-DNA را ایجاد می‌کند. این ترکیبات از همانندسازی و رونویسی DNA جلوگیری می‌کنند. تشکیل این ترکیبات در DNA منجر به شناسایی آسیب DNA توسط بیش از ۲۰ پروتئین از جمله(MMR) hMSH2، گروههای پروتئینی با تحرک بالا کروموزومی غیرهستونی(۱ و ۲ HMG) و فاکتور رونویسی(TBP) می‌شود. این پروتئین‌ها با شناسایی آسیب DNA ،سیگنال های ابشاری آسیب به DNA که در پایین دست مسیرهای p53، MAPK و p73 وجود دارند را فعال کرده و در نهایت منجر به آپوپتوز می‌شوند. از طرفی آسیب DNA ناشی از سیس پلاتین باعث توقف اولیه فاز S می‌شود که به دنبال آن مهار Cdc2–cyclin A یا B منجر به یک توقف مداوم G2 / M میگردد(۳و۲).

وحید لسان و همکاران با بررسی اثرات آنتاگونیستی متفورمین با سیس پلاتین در سلول‌های سرطانی معده نشان داده‌اند که استفاده از تیمار متفورمین یا سیس پلاتین به تنهایی می‌تواند از تکثیر سلول جلوگیری کرده و منجر به آپوپتوز گردد، اما در صورت استفاده هم‌زمان، اثرات ضدپرولیفراتیو آنها کاهش می‌یابد. نتایج آنها نشان داد که تیمار سلول‌های MKN-45 با متفورمین و سیس پلاتین میزان زنده مانی و بیان mTOR را افزایش می‌دهد. آنها بیان کردند اثر آنتاگونیستی متفورمین بر روی سیس پلاتین می‌تواند به واسطه مسیرهای سیگنالینگ Survivin ، mTOR و تنظیم مسیرAkt(مسیر تنظیمی مقاومت به داروی سیس پلاتین) القا گردد(۴). نجفی و همکاران اثر رتینوییک اسید ترانس و سیس پلاتین را بر روی بقای رده سلولی سرطان معده(AGS)، بررسی کرده و نشان

دادند که رتینوئیک اسید ترانس با کاهش سطح سیکلینD1 و توقف چرخه سلولی در مرحله G0/G1 و همچنین از طریق افزایش سطح پروتئین P21 و افزایش آپوپتوز، اثرات ضد پرولیفراتیو خود را اعمال می‌کنند. به این ترتیب پیشنهاد کردند که استفاده همزمان رتینوییک اسید و سیس پلاتین می‌تواند به عنوان ترکیبی مؤثر در درمان سرطان‌های دستگاه گوارش(سرطان معده)مؤثر واقع گردد(۵).

با وجود اثرات مفید بالینی سیس‌پلاتین در درمان سرطان معده، این دارو دارای اثرات جانبی توکسیک متعددی نظیر اثرات نفروتوکسیک، نوروتوکسیک و توکسیک سیستم شنوایی می‌باشد. اثرات توکسیک سیس‌پلاتین بسیار جدی بوده و استفاده از آن را محدود به دوز می‌نماید، به طوری که این اثرات، مصرف دارو را برای بیماران محدود می‌کند(۶). ترکیبات موجود در گیاهان می‌توانند با تأثیر بر مسیرهای مختلف بیولوژیک از جمله مسیر سیگنالینگ، مسیرهای آپوپتیک و یا مسیرهای رشد و متاستاز، چرخه سلولی را مهار کنند(۷).

بلوط ایرانی[1] درختانی بزرگ به ارتفاع ۲۰ متر با تاج کروی بزرگ و از خانواده فاگاسه[2] می‌باشد. این گونه در ایران مختص رویشگاه زاگرس جنوبی از جمله؛ استان‌های ایلام، خوزستان، کهگیلویه و بویراحمد، فارس، اصفهان و چهارمحال و بختیاری است، با این وجود از شمال غربی تا جنوب شرقی رشته کوه‌های زاگرس دیده می‌شود. بلوط ایرانی درختی بزرگ با ارتفاع متوسط حدود ۸ متر(گاهی ارتفاع آن به ۲۰ متر نیز می‌رسد) با برگ‌هایی یکنواخت و تخم مرغی با حاشیه دندانه‌ای شکل می‌باشد. میوه بلوط به طور سنتی در درمان اسهال، خونریزی‌های گوناگون، زخم معده، بواسیر و رفع التهاب لوزه استفاده می‌گردد. این میوه به واسطه دارا بودن فلاونوئیدهای فراوان دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی بوده و مانع تکثیر سلول‌های سرطانی در شرایط آزمایشگاهی می‌گردد(۸). آنالیز ترکیبات شیمیایی جفت نشان داده است که فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، تانن‌ها، ترکیبات فنلی، رزین‌ها، ساپونین‌ها، ترپن‌ها و استروئیدها از اجزاء اصلی گونه بلوط هستند(۹و۸). [10]

حزوانی و همکاران خاصیت آنتی‌اکسیدانی قوی عصاره گیاه دارمازو(QI)[3] را به حضور ترکیبات تانن، گالیک اسید و الاژیک اسید نسبت دادند. نتایج به دست آمده از پژوهش‌های آنها نشان داد که بیان پروتئین‌های ویروسی E6 وE7 در سلول‌های HeLa تیمار شده با QI کرم واژینال به شدت سرکوب گردیده است. پروتئین‌های ویروسی E6 و E7 از طریق غیرفعال ساختن پروتئین‌های p53 و pRb، که مسئول تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوز می‌باشند، نقش مهمی در چرخه زندگی HPV ایفا می‌کنند(۱۰). آنها در مطالعه دیگری نشان دادند که عصاره QIA به تنهایی قادر به ایجاد آپوپتوز از طریق مسیر وابسته به p53 می‌باشد

1-Quercus Prsica or Quercus Brantii
2-Fagaceae
3-Quercus Infectoria(QI)

و در مقایسه با ترکیبات گیاهی مختلف مانند؛ کورکومین، به طور مؤثری، آنتی ژن تبدیل کننده E6 و بیان پروتئین EGFR را مهار و منجر به القای بیان p53 می‌گردد. به این ترتیب پیشنهاد کردند که کرم واژینال حاوی عصاره QI قادر به سرکوب بیان پروتئین‌های E6 و E7 در سلول‌های HeLa می‌باشد و ترانسفورماسیون وابسته به HPV سلول‌های سرطانی سرویکس را متوقف می‌سازد(۹).

یارانی و همکاران با مطالعه پوست میوه بلوط بر سلول‌های اندوتلیالیHUVEC و ارزیابی فعالیت آنزیمی MMP2، MMP9 و VEGF، کاهش قابل توجهی در تکثیر سلول‌های اندوتلیال و آنژیوژنز مشاهده کردند و نشان دادند که غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره جفت، فعالیت MMP-9 و MMP-2 را مهار می‌کند. هم‌چنین نشان دادند که افزایش غلظت عصاره از ۵ به ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر منجر به کاهش ترشح VEGF می‌گردد(۱۰).

مرادی و همکاران عصاره خام اتانولی میوه بلوط بر زنده مانی سلول‌های AGS، Hela (سرطانی) HDFs(نرمال)در غلظت‌های مختلف را بررسی کردند و پس از ارزیابی‌های MTT و فلوسایتومتری، بیان کردند که عصاره خام اتانولی میوه بلوط قادر به مهار تکثیر سلول‌های سرطانی از طریق القا آپوپتوز اولیه می‌باشند(۱۱). با توجه به عوارض جانبی فراوان داروهای شیمیایی در دسترس، جهت درمان انواع مختلف سرطان، پژوهش‌های بسیاری در مورد خواص درمانی گیاهان به منظور ایجاد روش‌های درمانی ایمن با کمترین عوارض جانبی انجام گرفته است.

پژوهش‌های متعددی به نقش سیس پلاتین در درمان سرطان معده و کاربرد عصاره جفت به عنوان ترمیم کننده زخم‌های معده پرداخته‌اند، اما با توجه به عدم بررسی اثر تجویز هم‌زمان این دو ترکیب در سرطان معده، این سوال مطرح می‌شود که آیا عصاره جفت می‌تواند به عنوان یک مکمل داروی سیپلاتین یا تداخل دارویی در افراد مبتلا به سرطان معده نیز استفاده گردد. از این رو، این مطالعه به بررسی اثر ضد سرطانی عصاره میوه بلوط به تنهایی و یا هم‌زمان با سیس پلاتین و مقایسه آن با داروی سیس پلاتین پرداخته و چگونگی تنظیم اثرات ضدرشد آنها را مشخص می‌کند. هم‌چنین دیدگاه مناسبی از تفاوت احتمالی اثربخشی آنها جهت به کارگیری در استراتژی‌های درمانی جدید علیه تومور را ارایه می‌دهد، لذا هدف از این مطالعه تعیین و بررسی تأثیر عصاره جفت بلوط(Quercus brantii) و ترکیب آن با سیس پلاتین بر روی رده سلولی سرطان معده(AGS) بود.

روش بررسی

این یک مطالعه تجربی می‌باشد که در دانشگاه شهید چمران اهواز در سال ۱۴۰۱ انجام شد، تریپسین-EDTA، محیط کشت RPMI164، آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین ـ استرپتومایسین(Pen-Strep)، سرم جنینی گاو(FBS) از کمپانی ایده زیست خریداری شدند. رنگ

(atocel)MTT (3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)، تریپـــان بلـــو(BIO-IDEA)، دی‌متیـــل سولفوکســـاید (DMSO-Merk) ایده زیست، DMF(دی متیل فرمالیـد)، از شـــرکت ســـیگما، ســـیس پلاتـــین(abcam)، RNX-Plus (ســـیناکلون)، کلروفـــرم(DR.mojallali)، اتانول(هـــامون طب) تهیه شدند.

بـــرای تهیـــه عصـــاره جفـــت بلـــوط، پـــس از جمـــع‌آوری میـــوه بلـــوط از شـــهر یاســـوج و ســـپس جداسازی پوسـته، آن را پـودر کـرده و بـرای گـرفتن عصاره از روش سوکسله استفاده شـد. در ایـن روش با استفاده از روش مرادی و همکاران با کمی تغییر به ازای هر ۱۰ گرم از پـودر جفـت بلـوط، ۲۰۰ میلی‌لیتـر حلال که شامل آب و اتانول است اضافه و در دسـتگاه سوکسله ریخته شد. حلال از عصـاره‌ها جـدا گردیـدو ســـپس محلـــول را بـــه کمـــک دســـتگاه Rotavapor از عصاره‌ها تفکیک نموده و محلول را پس از ۴۸ سـاعت صـــاف کـــرده و در دمـــای حـــدود ۴۰-۳۵ درجـــه سانتی‌گراد قرار داده تا آب و الکل آن تبخیر شود. پس از تغلـیظ، مـایع اسـتخراج شـده در یخچـال نگهـداری شد(۱۱).

رده سلولی AGS سرطان معده از بانک سلولی مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شد. رده سلولی AGS از بافـت معـده یـک بیمـار زن ۵۴ سـاله مبـتلا بـه آدنوکارسینوم معـده گرفتـه شـده اسـت. سـلول‌ها در محیط RPMI1640 غنی شده با FBS10% و Pen-strep1% در انکوباتورMemert(ساخت آلمان) با شرایط دمـایی ۳۷ درجه سـانی‌گراد و ۵ درصـد CO_2 در فلاسـک T25 کشت داده شدند. زمانی که سلول‌ها حداقل به ۷۰ تـا ۸۰ درصد رشد سلولی رسیدند از ته فلاسـک بـه وسـیله تریپسن - EDTA، جدا شده و در دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۶ دقیقـه سـانتریفیوژ شـدند. رسـوب سـلولی در یـک سی‌سی محیط کشت به حالت سوسپانسیون تهیه شـد و شمارش سلول‌ها با مخلوط شدن نسبت مسـاوی از تریپان بلو با استفاده از لام هموسایتومتر و بررسی با میکروسکوپ معکوس تعیین شد.

آزمون MTT جهت ارزیابی اثر مهاری عصـاره جفت و سیس پلاتین روی حیـات(Viability) سـلول‌های AGS انجام پذیرفت، به این صورت که درهـر پلیـت ۹۶ خانه، ۱۰۰ میکرولیتـر از محـیط RPMI بـا تـراکم ۵۰۰۰ سـلول در هـر خانـه کشـت شـد و پـس از ۲۴ سـاعت انکوباسیون، غلظت‌های مختلفی از عصاره هیـدروالکی جفت(۳۲۰،۱۶۰،۸۰،۴۰،۲۰،۱۰) میکروگرم بـر میلی‌لیتـر حـــل شـــده در DMSO و ســـیس پلاتـــین بـــا غلظت‌های(۹۶،۴۸،۲۴،۱۲،۶،۳) میکرومول بـر میلی‌لیتـر حل شـده در DMF بـه مـدت ۴۸ سـاعت تیمـار شـدند. سـپس بـه هـر چاهـک ۳۰ میکرولیتـر محلـول MTT(۵/ میلی‌گرم در PBS) اضـافه شـد. بعـد از چهـار سـاعت انکوباسـیون در تـاریکی در انکوبـاتور، محلـول MTT با۱۲۰ میکرولیتـر DMSO جـایگزین شـد و پـس از ۳۰ دقیقه در نهایت جذب نوری محلول در طول مـوج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و درصـــد ســـلول‌های زنـــده بـــا فرمـــول ۱۰۰×(ODexp/ODcon)=(درصـد) محاسـبه گردیـدد، بـه ترتیب ODcon و ODexp مربوط به جذب نـوری گـروه کنترل و تیمار شده است.

آزمون شاخص ترکیبی[۲] سلول‌های تیمار شده با عصاره جفت و سیس پلاتین، ترکیبی از دو ماده در غلظت‌های مختلفی از عصاره جفت (۲۰،۴۰،۸۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر حل شده در DMSO) و محلول سیس پلاتین(۶ ، ۱۲ و ۲۴ میکرومول بر میلی‌لیتر حل شده در DMF) تهیه شد و جذب نوری آنها نیز به روش MTT مورد سنجش قرار گرفت و اثرات سینژیسم و آنتاگونیسم داروها با نرم‌افزار compusyn بررسی و محاسبه گردید(۱۲).

طراحی پرایمرها با نرم‌افزار Oligo Analysis و با سایت NCBI Primer Blast طراحی شدند و به وسیله شرکت پیشگام سنتز شد. برایReal-Time PCR با استفاده از RNX(سیناکلون) به روش دستی از سلول‌های کشت شده، RNA استخراج گردید و کمیت آن با نانودراپ ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington Delaware) اندازه‌گیری شد. با استفاده از کیت سنتز cDNA(یکتا تجهیز آزما) میزان یک میکروگرم از هر نمونه RNA، رونوشت برداری معکوس صورت گرفت. مرحله Real-Time PCR به وسیله دستگاه RunMei Q200 (RunMei، چین) و کیت تجاری Stem Gene Realtime AvinStemGene) mix (+ROX) SYBR Green 2x Master، ایران) بر پایه رنگ SyberGreen به‌منظور ارزیابی بیان ژن *CDK2* مورد مطالعه، استفاده شد و از ژن *GAPDH* به عنوان ژن خانه دار (Housekeeping) استفاده شد. در این مرحله ۶/۲۵ میکرولیتر سایبرگرین مستر میکس، ۰/۲۵ میکرولیتر از هر پرایمر با غلظت ۱۰ میکرومولار، ۲/۷۵ میکرولیتر آب عاری از نوکلئاز و ۳ میکرولیتر از cDNA در و اکنش در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر انجام شد. شرایط سیکل دمایی شامل یک مرحله فعال‌سازی اولیه به مدت ۵ دقیقه و دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد دنبال می‌شود و با ۵۰ سیکل، مرحله واسرشت به مدت ۱۵ ثانیه دمای۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر مدت ۱۵ ثانیه و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و طویل‌سازی مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت مرحله طویل شدن نهایی به مدت یک دقیقه و دمای۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. منحنی‌های ذوب جهت اعتبار بخشی محصول منفرد هر پرایمر، آنالیز شد. توالی پرایمرها در جدول ۱ آمده است.[۲]

آنالیز داده‌های MMT assay با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism 6 و برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف استفاده گردید و سپس به روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه و سطح معنی‌دار بودن داده‌ها در سطح ۹۵ درصد مشخص گردید($p<0/05$)، برای نمونه‌ها به عنوان اختلاف معنی‌داری در نظر گرفته – شد. آنالیز داده‌های تأثیر متقابل دو دارو به وسیله نرم‌افزار compusyn و هم‌چنین برای آنالیز داده‌های حاصل از Real time PCR روش مقایسه‌ای ΔΔCt مورد ارزیابی قرار گرفت. از ژن GAPDH به عنوان کالیبراتور استفاده گردید. نتایج بر اساس فرمول عمومی $۲^{-\Delta\Delta Ct}$ گزارش شد و در نهایت روش آنالیز واریانس یک طرفه جهت مقایسه بین نمونه‌ها مورد استفاده واقع شد.

1-Combaination Index CI

جدول ۱ : توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

Gene	Annealing temperature		Primer sequence	Size	GC	PCR product length
CDK2	۶۰/۸۱	F	5- ATGGACGGAGCTTGTTATCGC -3'	۲۱	۵۲/۳۸	۱۰۵
	۶۰/۶۸	R	5'- CTGGCTTGGTCACATCCTGG -3'	۲۰	۶۰	
GAPDH	۵۸/۸۲	F	5'- CAGCCTCAAGATCATCAGCAATG-3'	۲۰	۵۵	۱۰۰
	۵۸/۱۴	R	5-CATGAGTCCTTCCACGATACCA -3'	۲۰	۵۵	

یافته‌ها

تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های متفاوت ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ میکرومولار سیس پلاتین به مدت ۴۸ ساعت باعث کاهش بقای سلول‌ها شد. تیمار این سلول‌ها با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره جفت بلوط نیز سبب کاهش بقای سلول‌ها شد(شکل ۱و ۲). بر اساس نتایج GraphPad Prism 6 میزان IC_{50} برای سیسپلاتین ۱۲/۱ میکرومولار و برای عصاره جفت ۳۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. هم‌چنین مقایسه زنده مانی در بین تیمارهای مختلف در غلظت‌های IC_{50} داروها نشان می‌دهد علاوه بر اثر سمیت داروها، استفاده از داروها در هنگام ترکیب با کاهش بیشتر زنده مانی همراه است که نشان دهنده سیرژنیسم داروها می‌باشد و هم‌چنین نتایج نشان می‌دهد، هنگامی که از غلظت ۶ میکرومولار سیس پلاتین همراه با غلظت ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره جفت استفاده می‌شود، زنده مانی سلول نسب به غلظت ۱۲ میکرو مولار سیس پلاتین کاهش بیشتری را نشان می‌دهند(شکل۱ و جدول ۲) .

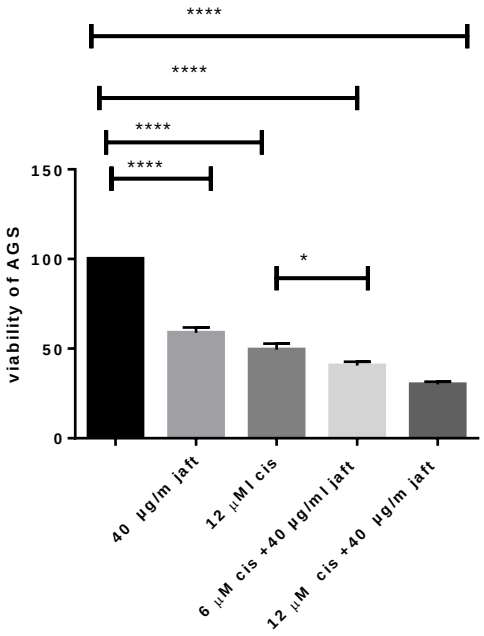
نتایج آزمون چندگانه آنالیز واریانس یک طرفه سمیت سلولی و زنده مانی در بین گروههای مختلف نشان می‌دهد که غلظت داروها مورد استفاده چه به صورت تنهایی و چه تجویز هم‌زمان نسبت به گروه کنترل دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند($p<0/0001$). مقایسه زنده مانی بین دو دارو در حالت منفرد نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری وجود دارد($p<0/01$)(جدول ۲).[۳]

مطالعه حاضر ازمون شاخص ترکیبی (CI) با استفاده از نرم‌افزار compusyn نشان می‌دهد که CI کمتر از یک است و بیانگر اثر سیرژیسم دو دارو می‌باشد که بیانگر کاهش زنده مانی می‌باشد، هم‌چنین شاخص کاهش دوز(DRI)[۱] یک معیاری برای مقایسه، ارزیابی و تأثیر داروها روی همدیگر می‌باشد و هنگامی که بزرگتر ار یک باشد بیان می‌کند که غلظت کمتری از داروها در تجویز هم‌زمان برای ایجاد سمیت سلولی نسبت به بروز همان سمیت سلولی در هنگامی که به صورت منفرد است، استفاده می‌شوند(۱۰). در این مطالعه DRI دو دارو بزرگتر از یک می‌باشد که بیان گر کاهش دوز دارو در حالت ترکیبی برای Fa=/05 می‌باشد.

1- Dose-Reduction Index(DRI)

نتایج حاصل از بیان ژن *CDK2* در ۴۸ ساعت پس از تیمار با دارو سیس پلاتین و عصاره جفت و تیمار هم‌زمان با کاهش بیان همراه است که خود می‌تواند دلیلی دیگر بر سیرژیسم بودن دو دارو باشد و Fold change داده‌های Real-time PCR نشان از اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مختلف است($p<۰/۰۰۱$)(شکل ۳).

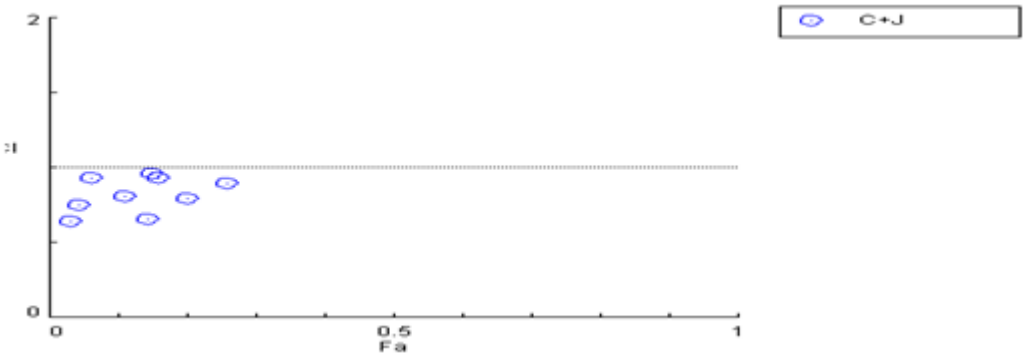
همان طور که در جدول ۳ آمده است نتایج تأثیر و مقایسه دوزهای عصاره جفت و سیس پلاتین به صورت منفرد و حالت ترکیبی در Fa(فراونی جذب) برابر با ۵۰ درصد سلول‌ها ذکر شده است، برای کشندگی ۵۰ درصد سلول‌ها به ۳۸/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۲ میکرومولار از سیس پلاتین در حالت منفرد به کار می‌رود در حالی که برای کشندگی ۵۰ درصد سلول‌ها در حالت ترکیبی به ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره جفت و ۶/۰۲ میکرومولار سیس پلاتین به کار رفته است که حالت ترکیبی بیانگر کاهش شاخص دوز ترکیبی است. در جدول ۴ تأثیر دو دارو بررسی شد که اثر هر دو دارو سبب کاهش زنده مانی سلول‌ها می‌شود به طوری که در غلظت IC_{50} دو دارو مقدار فراوانی جذب ۰/۳۰۸ گردید و از طرفی شاخص ترکیبی با افزایش غلظت داروها کاهش می‌یابد که نشان دهند سینرژیسم بودن دو دارو می‌باشد.



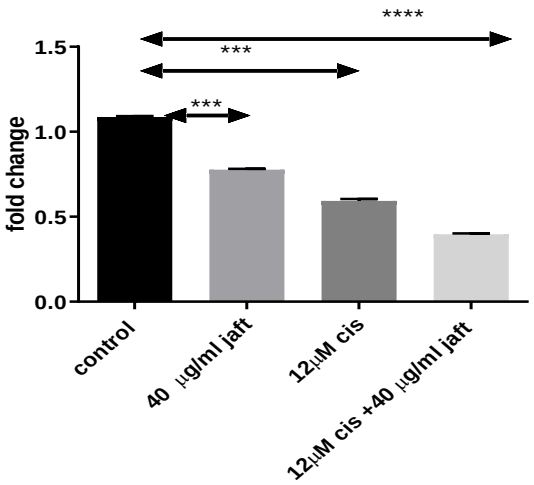
شکل ۱: مقایسه زنده ماندنی بین تیمارهای مختلف در رده سلولی: گروه کنترل، تیمار با عصاره جفت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر ، تیمار با سیس پلاتین ۱۲ میکرومولار ، ترکیبی از دو دارو در غلظت‌ها، غلظت سیس پلاتین در ۶ میکرومولار

جدول ۲ : مقایسه زنده ماندنی و سمیت سلولی بین گروه‌های مختلف،گروه کنترل، تیمار با عصاره جفت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر ، تیمار با سیس پلاتین ۱۲ میکرومولار ، ترکیبی از دو دارو در غلظت‌ها، غلظت سیس پلاتین در ۶ میکرومولار ، vs: در برابر، ns: عدم معنی‌داری

ردیف	مقایسه گروهها	تفاوت میانگین	فاصله اطمینان	سطح معنی‌داری
۱	گروه کنترل vs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جفت	۲۰/۵۳	۱۲/۹۹تا ۲۸/۰۶	****
۲	گروه کنترل vs ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۲۹/۸۸	۲۲/۳۴تا ۳۷/۴۴	****
۳	گروه کنترل vs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جفت+۶ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۳۸/۷۸	۳۱/۲۴تا ۴۶/۳۱	****
۴	گروه کنترل vs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره جفت+ ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۴۹/۳۳	۴۱/۷۹تا ۵۶/۸۶	****
۵	گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جفتvs ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۹/۳۵	۱/۸۱ تا ۱۶/۸۸	*
۶	گروه تیمار میکروگرم بر میلی‌لیتر۴۰ عصاره جفتvs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جفت+ ۶ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۱۸/۲۵	۱۰/۷۲ تا ۲۵/۷۸	****
۷	گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره جفتvs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره جفت+ ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۲۸/۸۰	۲۱/۲۷ تا ۳۶/۳۳	****
۸	گروه ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین vs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره جفت+ ۶ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۸/۹	۱/۳۶ تا ۱۶/۴۳	*
۹	گروه ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین vs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره جفت+ ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۱۹/۴۵	۱۱/۹۲ تا ۲۶/۹۸	****
۱۰	گروه تیمار۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیترعصاره جفت+ ۱۲ میکرومولار محلول سیس پلاتین vs گروه تیمار ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره جفت+ ۶ میکرومولار محلول سیس پلاتین	۱۰/۵۵	۳/۰۱ تا ۱۸/۰۸	**



شکل ۲ : ترسیم و محاسبه شاخص ترکیبی به وسیله نرم افزار Compucyn: آنالیز داده‌های Compusyn نشان می‌دهد که ترکیب عصاره جفت و سیس پلاتین در غلظت‌های مختلف دو داروی سیس پلاتین(C) و جفت (J)، بیانگر CI کمتر از یک و کاهش زنده مانی سلول‌ها است.



شکل۳ : نمودار مقایسه fold change حاصل از داده های Real time PCR بر بیان ژن *CDK2*، گروه کنترل، تیمار با عصاره جفت ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر ، تیمار با سیس پلاتین ۱۲ میکرومولار ، ترکیبی از دو دارو در غلظت‌ها، غلظت سیس پلاتین در ۶ میکرومولار

جدول ۳: تأثیر و مقایسه دوزهای عصاره جفت و سیس پلاتین به صورت تنها و حالت ترکیبی در Fa (فراونی جذب) برابر با زنده ماندنی ۵۰ درصد سلول‌ها

فراوانی جذب (Fa)	دوز عصاره جفت (میکروگرم بر میلی لیتر)	دوز سیس پلاتین (میکرومولار)	شاخص کاهش دوز عصاره جفت (میکروگرم بر میلی لیتر)	شاخص کاهش دوز سیس پلاتین (میکرومولار)
۰/۵	۳۸/۳۵	۱۲/۱	۲۰	٦/۰۲

جدول ۴: شاخص ترکیبی دو دارو در غلظت‌های مختلف

غلظت سیس پلاتین (میکرومولار)	غلظت عصاره جفت (میکرو گرم بر میلی‌لیتر)	شاخص تر کیبی (CI)	فراوانی (Fa)
۶	۲۰	۰/۹۱	۰/۴۸۳
۶	۴۰	۰/۹۰	۰/۴۰۹
۱۲	۲۰	۰/۷۵	۰/۳۵۳
۱۲	۴۰	۰/۷۳	۰/۳۰۸

بحث

با توجه به این کـه تـأثیر ترکیبـات گیـاهی بـر داروهای شیمی درمانی می توانند بر هر یک از اجزای مسیرهای پیام رسـان سـلولی نقـش داشـته باشـند و بررسی این تغییرات اهمیت ویژه‌ای دارند، لذا هـدف از ایـن مطالعـه تعیـین و بررسـی تـأثیر عصـاره جفـت بلوط(Quercus brantii) و ترکیب آن با سیس پلاتین بـر روی رده سلولی (AGS)سرطان معده بود.

سرطان هم‌چنان یکی از علل اصلی مرگ و میر در سراسر جهان است. سرطان و رویکردهای درمانی آن جدی‌ترین چالش‌های بهداشـتی هسـتند و گـزارش مربوطه سازمان بهداشت جهانی تخمین زده اسـت کـه

میزان سرطان(تعداد موارد جدید سرطان) در سال ۲۰۳۰ به بیش از ۱۵ میلیون نفر در سال خواهد رسید. علی‌رغم معرفی طیف وسیعی از رویکردهای نوآورانه درمانی سرطان، روش‌های مبتنی بر شیمی درمانی به تنهایی و به موازات جراحی و رادیوتراپی، استراتژی‌های درمانی کارآمد و رایجی هستند(۱۲ و ۶).

سیس پلاتین به عنوان یک داروی ضد سرطان با استفاده گسترده برای شیمی درمانی تومورهای مختلف مانند بیضه، سر و گردن، تخمدان، دهانه رحم، ریه سلول‌های غیر کوچک و کارسینوم معده شناخته شده است. مکانیسم اصلی اثر سیتوتوکسیک سیس پلاتین مربوط به واکنش آن با DNA بین رشته‌ای و درون رشته‌ای و تشکیل ترکیب‌های افزایشی سیس پلاتین– DNA کووالانسی است(۶). تشکیل ترکیب افزایشی سیس پلاتین–DNA علاوه بر پاسخ‌های ایمنی منجر به بروز یک سری آبشارهای آنزیمی در هسته، سیتوزول و سطح سلول می‌شود که این آبشارهای آنزیمی و پاسخ‌های مولکولی باعث مرگ سلولی می‌شوند. این اثرات سیتوتوکسیک غیراختصاصی سیس پلاتین طیف وسیعی از عوارض جانبی را بر کلیه و کبد و همچنین سیستم عصبی و شنوایی متحمل می‌کند و باعث ایجاد مقاومت دارویی نامطلوب می‌شود. برای غلبه بر اثرات نامطلوب ناشی از تجویز سیس پلاتین، برخی از استراتژی‌های درمان ترکیبی مانند تجویز سیس پلاتین در ترکیب با WR2721، کورستین و کوردیسپین استفاده شده است(۱۳ و۶).

علاوه بر این، مطالعه انجام شده به وسیله گروه تحقیقاتی قوامی و همکاران نشان داد که عصاره‌های گیاهی شامل؛ توت سفید(Morus alba)، موز(Musa) و گل عسلی(Arnebia decumbens) می‌توانند اثر سمیت سیس پلاتین را علیه سلول‌های A2780/cp القا کنند(۱۴). بررسی‌ها نشان داده است که عصاره‌های گیاهان غنی از فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی، با کاهش استرس اکسیداتیو باعث آثار محافظتی سلول‌ها می‌شوند. شواهد همچنین حاکی از فعالیت ضد سرطانی عصاره جفت بلوط در برابر انواع رده‌های سلولی سرطانی است. محصولات طبیعی، زمینه مناسبی را برای جستجوی درمان‌هایی با عوارض جانبی کمتر و اثربخشی یکسان یا بهتر فراهم می‌کنند. اثرات مفید عصاره‌های گیاهی از فیتوکمیکال‌های تشکیل دهنده آنها مشتق شده است که شامل؛ پلی فنول‌ها، فلاونوئیدها، کاروتنوئیدها، آلکالوئیدها و ترکیبات حاوی نیتروژن و گوگرد می‌باشد(۱۵). فیتوکمیکال‌های استخراج شده از گیاهان، عوامل شیمی‌درمانی و پیشگیری‌کننده شیمیایی خوبی که به دلیل عدم ایجاد مقاومت به درمان ، غیرسمی، به راحتی در دسترس بودن و ارزان شناخته شدند(۱۶).

امروزه، بسیاری از پژوهش‌ها بر روی گیاهان، عصاره‌های آنها و ترکیبات طبیعی متمرکز شده‌اند که ممکن است عوارض جانبی کمتری نسبت به ترکیبات شیمیایی مصنوعی برای درمان بیماری‌ها داشته باشند، همچنین شواهد فزآینده‌ای وجود دارد مبنی بر این که خواص افزایشی و سینرژیسم و پیشگیری

کننده شیمیایی میوه‌ها و سبزیجات از چندین ماده شیمیایی گیاهی نشات می‌گیرد(۱۷). قرن‌هاست که گونه‌های بلوط به عنوان داروهای سنتی در سراسر جهان برای اهداف دارویی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. بلوط ایرانی و دارمازو به طور سنتی به عنوان بخشی از مراقبت‌های پس از زایمان به وسیله ایرانیان، عرب‌ها، هندی‌ها، مالایی‌ها و چینی‌ها پس از تولد نوزاد برای درمان ترشحات واژن و عفونت‌های مربوط به پس از زایمان استفاده می‌شود(۱۸). در طب سنتی ایران از قسمت‌های مختلف گونه‌های گیاهی بلوط(پوست، برگ، میوه و جفت) به عنوان؛ قابض، ضدعفونی کننده، مهارکننده خونریزی، ترمیم‌کننده زخم و درمان زخم‌های سرطانی، یرقان، ورم لوزه‌ها، سل، ادم، اسهال، بیماری‌های پوستی مانند اگزما، ورم معده، زخم معده و برخی بیماری‌های دیگر استفاده میگردید(۲۰ و۱۹). تانن‌های قابل هیدرولیز از گونه بلوط همیشه‌سبز به طور ضمنی کمک کننده اصلی در پیشگیری از اختلالات ناشی از رادیکال‌های آزاد از جمله التهاب و سمیت کبدی هستند. علاوه بر این، فعالیت ضدمیکروبی عصاره اتانولی از گونه‌های بلوط همیشه سبز، عمدتا علیه باکتری‌های گرم منفی و کاندیدا آلبیکنس و همچنین عصاره‌های خام گونه‌های بلوط دارمازو و بلوط ایرانی فعالیت ضد هلیکوباکتر پیلوری را نشان داد(۱۸). بررسی‌های دیگر، اثر مثبت عصاره اتانولی بلوط دارمازورا با افزایش سطح سوپراکسید دیسموتاز و آنزیم‌های کاتالاز بدن که رادیکال‌های سوپراکسید را در موش‌ها خاموش می‌کنند را بر بهبود زخم نشان داد(۲۱). علاوه بر این، اثرات مهاری جفت و میوه بلوط ایرانی بر روی پروتئین کیناز فعال کننده میتوژن(MAPK)، بیان اینترلوکین (IL-1β) و COX-2، پروستاگلاندین E2 (PGE2) و IL-6 را نشان داده است(۱۹). در پژوهش یارانی و همکاران نشان داده شد که عصاره هیدروالکی جفت گونه بلوط دارمازو بیان ژن‌های *Mmp2* و *Mmp9* در غلظت‌های ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر(به ترتیب) به طور معنی‌داری کاهش یافت(۱۰). در مطالعه عزیزی و همکاران به وسیله القای زخم معده به وسیله عامل خارجی نشان داده شد که عصاره هیدروالکی بلوط ایرانی از طریق کاهش اکسیداتیو منجر به بهبود زخم معده و ترمیم آنها شده است(۲۲).

نتایج حاصل نشان می‌دهد عصاره اتانولی جفت بلوط ایرانی دارای خاصیت سایتوتوکسیک بر سلول AGS می‌باشند. نتایج مشابه در ارتباط با خاصیت ضدسرطانی عصاره بلوط دارمازو و بلوط ایرانی بر هر سه رده سلولی Hela ، HUVEC و AGS گزارش شده است(۱۱).

مطالعه حاضر فعالیت ضد تکثیری و کاهش بقایی سلولی عصاره هیدروالکی جفت بلوط در رده سلولی AGS سرطان معده را بررسی کرد. نتایج حاضر با سنجش سمیت سلولی نشان داد که زنده‌مانی سلولی AGS، به صورت وابسته به دوز، به دنبال درمان با عصاره هیدروالکی جفت و سیس پلاتین به طور قابل توجهی کاهش یافت. بنابراین،

مطابق با گزارش‌های ذکر شده در بالا، نتایج حاضر ممکن است نشان دهد که تانن و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره جفت ممکن است مسئول فعالیت ضدتکثیری باشد. استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین گونه‌های اکسیژن فعال و دفاع اکسیداتیو است. اهداف ROS را DNA ، پروتئین‌ها، RNA و لیپیدها تشکیل می‌دهند. در شرایط طبیعی، بین تولید رادیکال‌های آزاد و تخریب آن به کمک سیستم آنتی‌اکسیدان سلولی، تعادل ثابتی وجود دارد، بنابراین هرگونه عدم تعادل بین سطح اکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها باعث آسیب به DNA و پیشرفت سرطان می‌شود. آسیب DNA ناشی از ROS به طور قابل اهمیتی در توسعه سرطان مؤثر بوده، عوامل کاهش دهنده شکل‌گیری آنها می‌بایستی مخاطره سرطان را تقلیل دهند. علاوه بر آن، نقش آنتی‌اکسیدان‌ها در پیشگیری و درمان سرطان‌ها در پژوهش‌های بسیاری گزارش شده است(۲۳). خنوف و همکاران فعالیت ضد لیپوپراکسیدانی برخی از اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و تانن‌های خالص شده با مزیت محافظت گوارشی از گونه‌های بلوط را مورد مطالعه قرار دادند که دارای خواص بازدارنده پراکسیداسیون لیپیدی هستند(۱۹). اعتقاد بر این است که این خاصیت آنتی‌اکسیدانی مسئول اثرات محافظتی گوارشی ناشی از تانن‌های و ترکیبات فنلی بلوط است. بررسی‌های بیشتر برای شناسایی اجزای مختلف عصاره هیدروالکی جفت و نشان دادن اثرات درمانی هر ماده خالص شده مورد نیاز است(۲۶-۲۴).

از آن جایی که حلالیت هیدروالکلی عصاره‌های گیاهی می‌تواند به عنوان یک مزیت برای پتانسیل مؤثر ضدتکثیری یا ضدتوموری آنها در نظر گرفته شود، ما از عصاره هیدروالکلی جفت در پژوهش‌های خود استفاده کردیم. در این مطالعه مشاهده شد که عصاره هیدرو الکی جفت بلوط ایرانی ترکیب با سیس پلاتین، از طریق کاهش بیان *CDK2* اثرات ضدتکثیری و ضدسرطانی رده سلولی AGS سرطان معده دارند. *CDK2* عضوی از خانواده کینازهای وابسته به سیکلین بوده و در فعالیت‌هایی همچون تکثیر DNA، تقسیم میتوز و سیگنال‌های تنظیم کننده رشد نقش دارد. درواقع، این ژن با تأثیر بر روی ریتنوبلاستوما، در ایجاد و توسعه سرطان ، در تبدیل مرحله G1 به مرحله S، پایداری *CDK2* مورد نیاز است. کمپلکس(Cyclin E / CDK2) می‌تواند Protein RB را فسفریله کرده و باعث فعال شدن E2F گردد که در ادامه E2F و سایکلین E فعال منجربه ایجاد فید بک مثبت شود و چرخه سلولی را به پیش می‌برد(۲۷). در مطالعه مرادی و همکاران عصاره جفت با القای آپوپتوز از طریق آزادسازی سیتوکروم c و با اثر روی پروتئین p53 از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. پروتیئن p53 از طریف اتصال به DNA باعث تحریک ژن *WAFI* می‌شود که این ژن سازنده پروتئین p21 است. پروتئین p21 با اتصال به پروتئین *CDK2* ،اجازه تکثیر و ورود سلول به مرحله بعدی را نمی‌دهد و باعث مرگ سلولی می‌شود. تانن‌ها و خاصیت آنتی‌اکسیدانی موجود در عصاره

جفت با تنظیم مکانیسم آبشاری و اتصال به *CDK2* می‌توانند مانع از تکثیر سلول و توقف چرخه سلولی گردد(۲۷).

اگر چه جهت شناسایی ترکیبات مؤثره در عصاره جفت با محدودیت‌های هم‌چون عدم وجود تجهیزات آزمایشگاهی GC/MS و LC/MS و هزینه‌های زیاد مواد آزمایشگاهی جهت بررسی سایر ژن‌ها در مسیرهای سلولی همراه بود، لذا پیشنهاد می‌شود با شناسایی ترکیبات فعال اجزای عصاره جفت بلوط تاثیر آنها را بر مکانیسم‌های سلولی ارزیابی کنیم تا نحوه عملکرد آنها مشخص شود. علاوه بر این، مکانیسم‌های عمل جدیدی ممکن است کشف شوند.

نتیجه‌گیری

اگر چه خواصی مانند آنتی‌باکتریال، التیام زخم، ضدالتهاب و سایر بلوط ایرانی قبلا بررسی شده بود. هیچ گزارشی در مورد خواص احتمالی ضدتکثیری چرخه سلولی و سینر ژیسم با داروهای شیمیایی درمان سرطان معده از جمله سیس پلاتین و جفت بلوط وجود ندارد. داده‌های حاصل از سمیت سلولی، شاخص ترکیبی وReal Time – PCR نشان داد که اثر ضدتکثیری و ضدسرطانی هم‌زمان عصاره هیدروالکلی جفت و سیس پلاتین از طریق جلوگیری از بیان *CDK2* و خاصیت سینرژیسم عصاره جفت با سیس پلاتین نسبت به عصاره جفت و سیس پلاتین به تنهایی در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی افزایش داشت. از این رو، نتایج مطالعه حاضر از کاربردهای سنتی جفت برای درمان و کاهش عوارض داروهای شیمیایی حمایت می‌کند. این نتایج را می‌توان به عنوان نقطه شروعی برای ارزیابی پتانسیل بهتر ضد تکثیری و متوقف کننده چرخه سلول‌های سرطانی، عصاره جفت بلوط در نظر گرفت.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر گرفته از پایا ن نامه دوره دکتری ژنتیک با کد SCU.SB98.12468 ، از دانشگاه شهید چمران اهواز می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران به خاطر مساعدت و همکاری در این مطالعه، قدردانی نمایند.

REFERENCES

1.Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians 2018; 68(1): 7-30.
2.Tanida S, Mizoshita T, Ozeki K, Tsukamoto H, Kamiya T, Kataoka H, Sakamuro D, Joh T. Mechanisms of cisplatin-induced apoptosis and of cisplatin sensitivity: potential of BIN1 to act as a potent predictor of cisplatin sensitivity in gastric cancer treatment. International Journal of Surgical Oncology 2012; 2012: 862879.
3.Sedletska Y, Giraud-Panis MJ, Malinge JM. Cisplatin is a DNA-damaging antitumour compound triggering multifactorial biochemical responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents 2005; 5(3): 251-65.
4.Lesan V, Ghaffari SH, Salaramoli J, Heidari M, Rostami M, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Evaluation of antagonistic effects of metformin with Cisplatin in gastric cancer cells. International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research 2014; 8(3): 12.
5.Najafzadeh N, Abbasi A, Mazani M, Amani M. Effects of all trans retinoic acid combined with cisplatin on survival of gastric cancer cell line(AGS). Scientific Journal of Hamadan University of Medical Sciences Autumn 2013; 20(3): 207-14.
6.Rabik CA, Dolan ME. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. Cancer Treatment Reviews 2007; 33(1): 9-23.
7.Sagar SM, MH DY, Wong RK. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer. Current Oncology 2006; 13(1): 14-26.
8.Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond [J]. Am J Clin Nutr 2005; 81(1 Suppl): 215s-217s.
9.MY H, WA WA. Cytotoxicity Effect of Quercus infectoria Based Vaginal Cream on Hela Cells and its Preliminary in Vivo Toxicity Evaluation Towards Female Rats. International Medical Journal Malaysia 2018; 17(2): 27-45.
10.Yarani R, Mansouri K, Mohammadi-Motlagh HR, Mahnam A, Emami Aleagha MS. In vitro inhibition of angiogenesis by hydroalcoholic extract of oak (Quercus infectoria) acorn shell via suppressing VEGF, MMP-2, and MMP-9 secretion. Pharmaceutical Biology 2013; 51(3): 361-8.
11.Moradi MT, Karimi A, Alidadi S. In vitro antiproliferative and apoptosis-inducing activities of crude ethyle alcohole extract of Quercus brantii L. acorn and subsequent fractions. Chinese Journal of Natural Medicines 2016; 14(3): 196-202.
12.GraphPad Statistics. Synergism Effect of Drug Combinations in Compusyn Software. Statistical tutorials and software guides. Retrieved January 2022;12: 123-35.
13.Longchar A, Prasad SB. Biochemical changes associated with ascorbic acid–cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. Toxicology Reports 2015; 2: 489-503.
14.Ghavami G, Sardari S. Synergistic effect of vitamin C with cisplatin for inhibiting proliferation of gastric cancer cells. Iranian Biomedical Journal 2020; 24(2): 119.
15.Karna P, Gundala SR, Gupta MV, Shamsi SA, Pace RD, Yates C, Narayan S, Aneja R. Polyphenol-rich sweet potato greens extract inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer cells in vitro and in vivo. Carcinogenesis 2011; 32(12): 1872-80.
16.Sak K. Chemotherapy and dietary phytochemical agents. Chemotherapy Research and Practice 2012; 2012: 45-64.
17.Herbst RS. Therapeutic options to target angiogenesis in human malignancies. Expert Opin Emerg Drugs 2006; 11(4): 635-50.
18.Soon LK, Hasni E, Law KS, Walliullah SS, Fardi CG, Syed Mohsin SSJ. Ultrastructural findings and elemental analysis of quercus infectoria olive. Ann Microscopy 2007; 7(1): 32–7.
19.Khennouf S, Benabdallah H, Gharzouli K, Amira S, Ito H, Kim TH, Yoshida T, Gharzouli A. Effect of tannins from Quercus suber and Quercus coccifera leaves on ethanol-induced gastric lesions in mice. J Agric Food Chem 2003; 51: 1469–73.
20.Umachigi SP, Jayaveera KN, Ashok Kumar CK, Kumar GS, Vrushabendra Swamey BM, Kishore Kumar DV. Studies on wound healing properties of Quercus infectoria. J Pharm Res 2008; 7: 913–9.
21.Aroonrerk N, Kamkaen N. Anti-inflamatory activity of Quercus infectoria, Glycyrrhiza uralensis, Kaemperia galanga and Coptis chinensis, the main components of thai herbal remedies for aphthous ulcer. J Health Res 2009; 23(1): 17-22.

22.Azizi S, Pirbalouti AG, Amirmohammadi M. Effect of hydro-alcoholic extract of Persian oak (Quercus brantii) in experimentally gastric ulcer. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR 2014; 13(3): 967.
23.Zingg JM, Azzi A. Nonantioxidant activities of vitamin E. Curr Med Chem 2004; 11(9): 1113-33.
24.Gharzouli K, Khennouf S, Amira S, Gharzouli A. Effects of aqueous extracts of Quercus ilex (L.) root bark, Punica granatum (L.) fruit peel and Artemisiaalba Asso leaves on ethanol-induced gastric damage in rats. Phytother Res 1999; 13: 42-5.
25.Khennouf S, Gharzouli K, Amira S, Gharzouli A. Effects of Quercus ilex (L.) and Punica granatum.polyphenols against ethanol-induced gastric damage in rats. Pharmazie 1999; 54: 75-6.
26.Khennouf S, Amira S, Arrar L, Baghiani A. Effect of some phenolic compounds and Quercus tannins on lipid peroxidation. World Appl Sci J 2010; 8: 1144-9.
27.Amit KT, Madhumita R, Bhattacharya RK. Natural products as inducer of apoptosis: Implication for cancer therapy and prenvention. Curr Sci 2001; 80(11): 1387-96.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

The Effects of Oak Placenta(jaft) Extract Combined with Cisplatin on Gastric Cancer Cell Line(AGS)

Andarzi S[1], Sadeghi H[2], Syyednejad SM[3], Hajari MR[4*]

[1]Department of biology, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, [2]Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Sciences, Yasuj, Iran

Received: 23 Jan 2023 Accepted: 09 Jun 2023

Abstract

Background & aim: Oak placenta(Jaft) extract has potent antioxidant, anti-proliferative, anti-cancer activity, and other therapeutic properties. Therefore, the aim of this study is to investigate the effect of Jaft extract and its combination with Cisplatin on gastric cancer adenocarcinoma cell line (AGS).

Methods: In the present experimental study conducted at Shahid Chamran University of Ahvaz in 2022, the AGS cell line was cultured in 1640-RPMI medium and treated with Jaft extract and cisplatin. Cell viability and combination index(CI) were measured using the MTT assay and Compucyn software(respectively). Moreover, the expression of the *CDK2* gene as an important gene involved in the cell cycle was evaluated by Real-Time PCR. The collected data were analyzed using Graph Pad Prism 6 software and one-way ANOVA.

Results: The findings of the present study indicated that Jaft extract and cisplatin cause decreased cell viability of AGS ($p< 0.0001$). The analysis of compusyn data indicated that these two substances together have synergistic properties (CI<1), in addition to simultaneous usage of Jaft extract increases the cytotoxicity of cisplatin drug. In the simultaneous treatment, it was observed that the expression of *CDK2* decreased and led to an increase in the anticancer effect of cisplatin ($p<0.001$).

Conclusion: The present study revealed that placenta extract had anti-proliferative and anti-cancer properties. According to the synergistic effects of these two drugs, Jaft can change the gene expression of *CDK2* in the cell cycle and introduce a possible approach for the treatment of gastric cancer with more potency and less dose of administered cisplatin to induce toxicity. The results of the present study indicated that Jaft extract is a proper selection to sensitize cancer cells to cisplatin.

Keywords: Jaft extract, Cisplatin, AGS cell line, Adenocarcinoma, *CDK2*

Corresponding Author: Hajari MR, Department of biology Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Email: Mohamad.hajari@gmail.com

Please cite this article as follows: Andarzi S, Sadeghi H, Syyednejad SM, Hajari MR. The Effects of Oak Placenta(jaft) Extract Combined with Cisplatin on Gastric Cancer Cell Line(AGS). Armaghane-danesh 2023; 28(4): 474-490.