

## Evaluation of cytotoxic effect of methanolic extract fractions of *Ornithogalum cuspidatum* on WEHI-164 fibrosarcoma cancer cell line

Valiyari S.<sup>1,2</sup>, Asadi H.<sup>1,2</sup>, Baradaran B.<sup>1,2\*</sup>, Babaloo Z.<sup>2</sup>, Delazar A.<sup>1</sup>, Bannazadeh Amirkhiz M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. <sup>2</sup> Immunology Research Center, Tabriz

University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

Received: 1 Aug. 2011, Accepted: 13 Mar. 2012

**Objectives:** The medicinal plant of *Ornithogalum cuspidatum* ( Liliaceae ) uses widely in Iranian traditional medicine for treatment of respiratory and inflammatory disease. Previous study on methanolic extract of *Ornithogalum cuspidatum* showed that it has cytotoxic effect. Therefore we aimed to study the cytotoxic effect of methanolic extract fractions of *Ornithogalum cuspidatum* on WEHI-164, fibrosarcoma cancer cell line. **Methods:** Fractions of methanolic extract of *Ornithogalum Cuspidatum* was prepared using SPE ( Solid Phase Extraction ). WEHI-164 cancer cell line were treated with different concentrations of 10%, 20%, 40%, 60%, 80% and 100% fractions of methanolic extract of *Ornithogalum cuspidatum* for 12 and 24 hours. Cytotoxicity and cell viability were measured by MTT assay. ELISA was performed to determine apoptosis after 24 hours in different concentrations of methanolic fractions. **Results:** 10% and 20% fractions of methanolic extract had not cytotoxic effect but 40%, 60%, 80% and 100% fractions induced a significant growth inhibition in WEHI-164 cancer cell line with LC<sub>50</sub> of 200, 96, 76 and 73 µg/ml respectively. Morphological changes of cell death in treated WEHI-164 cells were mediated via apoptosis. Apoptosis in WEHI-164 cells after 24 hours treatment with 200 µg/ml of 40%, 60%, 80% and 100% fractions were 36, 41, 42 and 49% respectively. **Conclusion:** The results of this study suggest that 80% and 100% fractions of methanolic extract of *Ornithogalum cuspidatum* contain higher cytotoxic and apoptotic compounds on WEHI-164 cancer cells and can be candidate for identifying and purifying of cytotoxic bioactive compounds.

**Key words:** *Ornithogalum cuspidatum*, WEHI-164 Fibrosarcoma cell, Apoptosis, Cytotoxic.

### بررسی اثر سایتوتوکسیک فراکسیونهای عصاره متانولی گیاه شیر مرغ دیهیمی (*Ornithogalum cuspidatum*) بر روی سلولهای سرطانی مدل فیبروسارکوما رده WEHI-164

سمیرا ولی یاری<sup>۱,۲</sup>، حامد اسدی<sup>۱,۲</sup>، بهزاد برادران<sup>۱,۲\*</sup>، زهره بابالو<sup>۲</sup>، عباس دل آذر<sup>۱</sup>، مریم بنزازده امیرخیز<sup>۲</sup>  
<sup>۱</sup>مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. <sup>۲</sup>مرکز تحقیقات ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۱۱، تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۲۳

**زمینه و هدف:** مطالعه گذشته بر روی عصاره متانولی گیاه دارویی شیر مرغ دیهیمی نشان دهنده اثر سایتوتوکسیک آن می باشد. لذا مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سایتوتوکسیک فراکسیونهای مختلف بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 مدل فیبروسارکوما صورت گرفت. **روش ها:** فراکسیون های عصاره متانولی پیاز گیاه شیر مرغ دیهیمی با روش SPE ( Solid Phase Extraction ) تهیه شد. سلول های سرطانی WEHI-164 با غلظت های مختلف از فراکسیونهای متانولی ۱۰٪، ۲۰٪، ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ تیمار شدند و در زمان های ۱۲ و ۲۴ ساعت اثر سایتوتوکسیسیته آنها بر روی سلول های WEHI-164 با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی القاء آپوپتوز، تست ELISA در غلظت های مختلف از فراکسیون های متانولی در زمان ۲۴ ساعت انجام شد. **یافته ها:** نتایج تست MTT نشان می دهد که در بین فراکسیون های مورد مطالعه فراکسیون های ۱۰٪ و ۲۰٪ فاقد اثر سایتوتوکسیک بوده و فراکسیونهای ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ پس از ۲۴ ساعت موجب مهار رشد سلول های WEHI-164 با LC<sub>50</sub> به ترتیب ۲۰۰، ۹۶، ۷۶ و ۷۳ میکرو گرم بر میلی لیتر شدند. با افزایش غلظت فراکسیون های ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ شدت القاء آپوپتوز افزایش می یابد و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم به ترتیب برابر ۳۶، ۴۱، ۴۲ و ۴۹ درصد می باشد. **نتیجه گیری:** نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که فراکسیون های ۸۰٪ و ۱۰۰٪ عصاره حاوی ترکیبات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک بیشتری بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 می باشند و می توانند برای شناسایی ترکیبات فعال سایتوتوکسیک کاندید مناسبی باشند.

**واژه های کلیدی:** گیاه شیرمرغ دیهیمی، سلول های سرطانی فیبروسارکوما رده WEHI-164، آپوپتوز، سایتوتوکسیک.

\* Corresponding Author: Behzad Baradaran, Assistant Professor, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. Tel:+98-411-3364665; Email:behzad\_im@yahoo.com

\* نویسنده مسئول: بهزاد برادران، استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران. تلفن: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۵، شماره: ۰۴۱۱-۳۳۶۴۶۶۵ Email:behzad\_im@yahoo.com

## ۱- مقدمه

گیاه شیر مرغ دیهیمی (*Ornithogalum cuspidatum*) متعلق به خانواده *Liliaceae* از گیاهان بومی ایران بوده که در شمال غربی ایران می‌روید. جنس *Ornithogalum* حدوداً شامل ۲۰۰ گونه می‌باشد که در آب و هوای معتدل در اروپا، آسیا و آفریقا توزیع شده‌اند. این گیاه علفی، پیازدار و به ارتفاع ۲۰-۶ سانتی متر می‌باشد (۱). این گیاه در طب سنتی در درمان بیماری‌های التهابی و تنفسی بسیار حائز اهمیت بوده و بررسی‌های بیشتر بر روی آن ارزش بالایی دارد. در طی مطالعات فیتوشیمیایی بر روی پیاز گونه‌های مختلف *Ornithogalum* وجود ترکیبات استروئیدی، فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، گلیکوزیدی، تریپنوئیدی و ساپونین‌های استروئیدی گزارش شده است. این ترکیبات با دخالت در مسیرهای بیولوژیکی مختلف، اثرات سایتوتوکسیک، ضد سرطانی و ضد میکروبی دارند (۴-۲).

سرطان عامل مرگ و میر انسان‌ها در بیشتر نقاط دنیاست و در هر سنی بروز می‌کند. تقریباً ۵۰٪ از مرگ‌های دوره میان‌سالی سرطان است (۵). یکی از انواع سرطان‌ها، سرطان‌های بدخیم بافت نرم یا سارکوماها هستند که در بافت‌هایی مثل چربی، عضلات، استخوان و اعصاب بروز می‌نمایند و حدود ۲ درصد مرگ و میر ناشی از سرطان را موجب می‌شوند (۶، ۷).

فیروسارکوما یکی از انواع سرطان‌های بافت نرم می‌باشد که منشا آن سلول‌های فیروبلستی است (۸). بیشتر ترکیبات ضد سرطانی که تا به امروز برای درمان سرطانها به کار رفته است از گیاهان به دست آمده‌اند (۹). جستجوی ترکیبات ضد سرطانی از گیاهان در ۱۹۵۰ با کشف آلکالوئید وینکا و استخراج ماده سایتوتوکسیک پودوفیلوتوکسین آغاز و امروزه بیش از ۶۰٪ ترکیبات ضد سرطانی منشا طبیعی دارند (۱۱، ۱۰).

یکی از عملکردهای داروهای ضد سرطانی القاء آپوپتوز می‌باشد. آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده سلول، یک فرایند بسیار دقیق می‌باشد که طی آن آنزیم‌های کاسپاز به طور اختصاصی فعال شده و یک سلول یا گروهی از سلولها دچار مرگ سلولی می‌شوند (۱۶-۱۲).

مطالعه گذشته بر روی گیاه شیر مرغ دیهیمی فعالیت سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک موثری را بر روی سلول‌های سرطانی WEHI-164 مدل فیروسارکوما نشان داد (۱۷)، بنابراین برآن شدیم تا در مطالعه حاضر اثر سایتوتوکسیک فراکسیون‌های عصاره متانولی گیاه شیر مرغ دیهیمی را بر روی سلول‌های سرطانی WEHI-164 بررسی کنیم تا

فراکسیون‌های مناسب را جهت استخراج و خالص‌سازی ترکیبات فعال بیابیم.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱: تهیه عصاره و فراکسیون‌ها

پیاز گیاه شیر مرغ دیهیمی طی ماه‌های فروردین و اردیبهشت از شهرستان مراغه واقع در استان آذربایجان شرقی جمع‌آوری و توسط آسیاب پودر گردید. ۱۰۰ گرم از پودر بدست آمده پس از توزین در کاغذ کارتوش قرار گرفت و وارد دستگاه سوکسله گردید و یک لیتر متانول اضافه شد. پس از ۶ ساعت عصاره متانولی از دستگاه خارج شد و به وسیله دستگاه روتاری اوپراتور (Heildolph آلمان) تحت خلأ و در دمای پایین‌تر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک گردید. جهت تهیه فراکسیون‌ها از روش SPE (Solid Phase Extraction) استفاده شد. بدین منظور ۲ گرم از عصاره متانولی در حداقل مقدار ممکن از مخلوط آب و متانول با نسبت ۱۰:۹۰ کاملاً حل شد و سپس بر روی ستون Sep- Pak (Wartes آمریکا) از نوع ODS (Octa Decyl Silica) منتقل گردید و شستشوی آن توسط محلول‌های ۱۰٪، ۲۰٪، ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ متانول در آب هر یک به میزان ۲۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. فراکسیون‌های حاصل نیز با استفاده از دستگاه روتاتوری اوپراتور در دمای پایین‌تر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد و فشار پایین کاملاً خشک شد. برای تهیه غلظت‌های مورد نیاز از فراکسیون‌ها، ۰/۱ گرم از فراکسیون‌ها در کمترین مقدار ممکن از DMSO حل شده و سپس با محیط کشت RPMI 1640 رقیق گردید.

## ۲-۲: کشت سلول

رده سلولی WEHI-164 از انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI1640 (Sigma) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین ۱۰۰ IU/ml و استرپتومایسین ۱۰۰ μg/ml کشت داده شد و سپس در انکوباتور حاوی ۵٪ CO<sub>2</sub> محیط مرطوب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. محیط کشت سلول‌ها هر ۲ روز یک بار تعویض شد (۱۸).

## ۲-۳: بررسی اثر سایتوتوکسیسیته با روش MTT

اثر سایتوتوکسیک فراکسیون‌های متانولی بر روی سلولهای WEHI-164 با استفاده از -(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-3-MTT (MTT) 2,5diphenyl tetrazolium bromide بررسی شد. در این روش محلول زرد رنگ MTT به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های زنده به

روش آماری مورد استفاده جهت تجزیه و تحلیل داده ها آزمون یک طرفه ANOVA بوده و کلیه آنالیزها با نرم افزار آماری SPSS Ver 16 صورت گرفت. سطح معنی دار بودن آماری  $P < 0.01$  در نظر گرفته شد.

### ۳- نتایج

#### ۳-۱: اثر سایتوتوکسیک فراکسیون های عصاره متانولی بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 مدل فیروسارکوما

نتایج حاصل از بررسی اثر سایتوتوکسیسیته شش فراکسیون مختلف عصاره متانولی پیاز گیاه شیر مرغ دیهیمی بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 در طی ۱۲ و ۲۴ ساعت به این ترتیب می باشند:

فراکسیون ۱۰۰٪ < فراکسیون ۸۰٪ < فراکسیون ۶۰٪ < فراکسیون ۴۰٪.

فراکسیون های ۱۰٪ و ۲۰٪ فاقد اثر سایتوتوکسیک می باشند. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود در بررسی ۱۲ ساعته فراکسیون ۴۰٪ فقط در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر دارای اثر سایتوتوکسیک معنی دار در مقایسه با گروه کنترل می باشد و در غلظت ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر باعث کاهش قابلیت زیست پذیری سلول ها تا ۲۰ درصد شده است. در حالی که فراکسیونهای ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ در همه غلظت های بررسی شده اختلاف معنی دار با گروه کنترل نشان دادند. به طوری که در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ترتیب باعث کاهش قابلیت زیست پذیری سلول ها تا ۶۲، ۶۶ و ۷۰ درصد شدند. در بررسی ۱۲ ساعته  $LC_{50}$  برای فراکسیونهای ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ به ترتیب برابر است با: ۱۶۵، ۱۰۵ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر.

در شکل ۲ بررسی اثر سایتوتوکسیک فراکسیون ها در زمان ۲۴ ساعت نشان می دهد که فراکسیون ۴۰٪ در غلظت های ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر اختلاف معنی دار با گروه کنترل نشان نداد اما با افزایش غلظت اثر سایتوتوکسیک در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت و ۲۹ تا ۶۰ درصد کاهش قابلیت زیست پذیری مشاهده شد. با توجه به شکل ۲ اثر سایتوتوکسیک فراکسیون های ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ در مقایسه با ۱۲ ساعت افزایش نشان می دهد و در غلظت ۴۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر به ترتیب باعث کاهش قابلیت زیست پذیری سلول ها تا ۷۶، ۸۴ و ۸۵ درصد شدند. همچنین با افزایش غلظت فراکسیون ها اثر سایتوتوکسیک افزایش یافته و از قابلیت زیست پذیری سلول ها کاسته می شود. در بررسی ۲۴ ساعته  $LC_{50}$  برای فراکسیون های

کریستال های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می شود، که می توان پس از حل کردن در DMSO با دستگاه الیزا ریدر رنگ تولید شده را سنجش نمود (۱۹).

سلولها به تعداد ۵۰۰۰ عدد در پلیت های ۹۶ خانه ای به صورت تریپلیکیت کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند، سپس سلول ها در طی زمان های ۱۲ و ۲۴ ساعت تحت تیمار با غلظت های مختلف فراکسیون های متانولی (۰، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) قرار گرفتند. محیط کشت حاوی ۱٪ DMSO فاقد عصاره به عنوان کنترل منفی استفاده شد. سپس محیط کشت حاوی عصاره جمع آوری شده و محیط کشت تازه همراه با ۵۰ میکرولیتر MTT (۲mg/ml) به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و محیط مرطوب حاوی ۵٪  $CO_2$  انکوبه شد. پس از انکوباسیون، محیط کشت حاوی MTT حذف شده و جهت حل کردن کریستال های فورمازان ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر سورنسن اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. جذب نوری پلیت ها توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر سنجیده شد.

#### ۴-۲: بررسی القای آپوپتوز به روش الیزا

از این تست جهت بررسی نوع مرگ سلولی و سنجش میزان القای آپوپتوز فراکسیون های عصاره متانولی بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 استفاده گردید. سلول ها به تعداد ۵۰۰۰ عدد در پلیت های ۹۶ خانه ای و به صورت تریپلیکیت کشت داده شدند و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول ها به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت فراکسیون های متانولی در غلظت های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر و محلول کنترل (۱٪ DMSO) قرار گرفتند. سوپرناتانت و لایزت سلول ها جهت تشخیص القاء آپوپتوز مطابق با کیت الیزا (Cell Death Detection, Roche) جمع آوری شدند و به میکروپلیت های آماده که حاوی دو نوع آنتی بادی مونوکلونال علیه DNA و Histon می باشند اضافه گردید. میکروپلیت ها به مدت ۲ ساعت در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند. سپس با استفاده از بافر انکوباسیون ۳ بار عمل شستشو انجام شد و سوپسترا اضافه گردید. شدت جذب با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۰۵ nm تعیین گردید (۲۰).

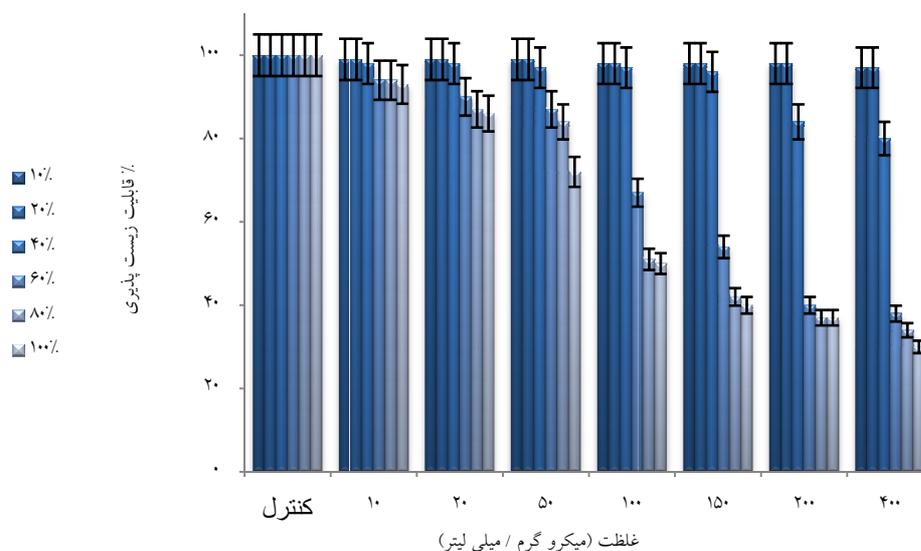
#### ۵-۲: تحلیل آماری

۲۴، ۱۰۰، ۵۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر در زمان ۲۴ ساعت جهت تعیین نوع مرگ سلولی و بررسی میزان القاء آپوپتوز مناسب می باشند. مقایسه شدت جذب سوپرناتانت و لایزت سلول ها با کنترل مثبت نشان داد که نوع مرگ سلولی آپوپتوز می باشد. با توجه به شکل ۳ با افزایش غلظت فراکسیون های ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ شدت القاء آپوپتوز افزایش می یابد و در غلظت ۲۰۰ میکروگرم به ترتیب برابر ۳۶، ۴۱، ۴۲، و ۴۹ درصد می باشد.

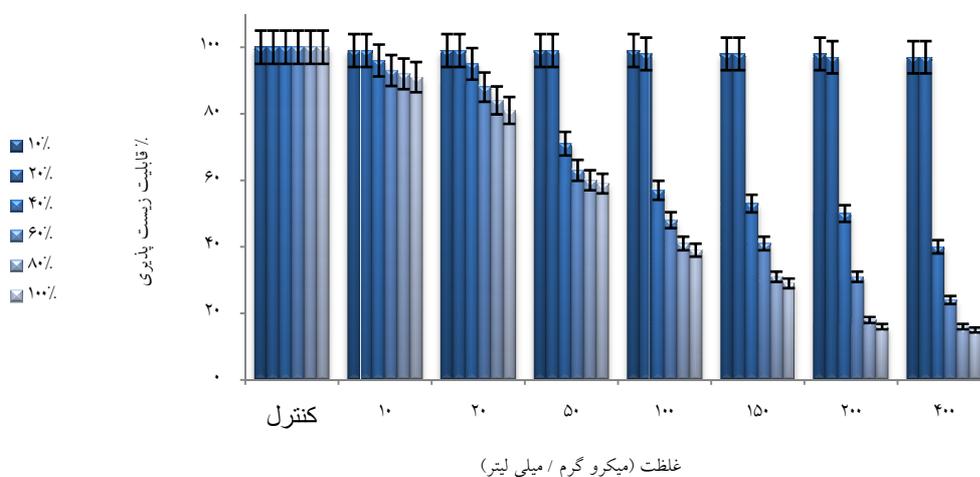
۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ به ترتیب برابر ۷۶، ۹۶، ۲۰۰ و ۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. نتایج حاصل از بررسی زمان و غلظت نشان می دهد که با گذشت زمان و افزایش غلظت اثر سایتوتوکسیک فراکسیون ها افزایش یافته و قابلیت زیست پذیری سلول های سرطانی کاسته می شود.

### ۲-۳. تست الایزا

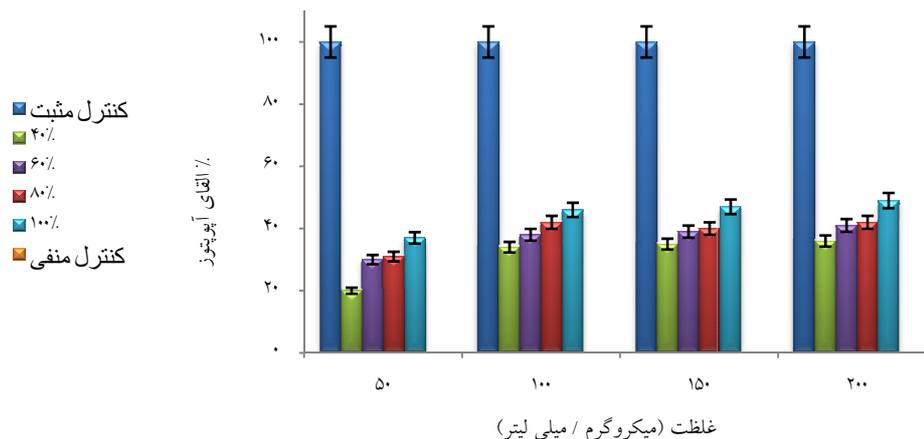
نتایج حاصل از آزمایشات MTT و مقادیر  $LC_{50}$  نشان داند که فراکسیون های ۴۰٪، ۶۰٪، ۸۰٪ و ۱۰۰٪ با غلظت های



شکل ۱. اثر غلظت های مختلف فراکسیون های عصاره متانولی شیر مرغ دیهیمی بر رده سلولی WEHI-164 پس از تیمار در زمان ۱۲ ساعت با روش MTT. Error bar بیانگر  $Mean \pm SD$  است.



شکل ۲. اثر غلظت های مختلف فراکسیون های عصاره متانولی شیر مرغ دیهیمی بر رده سلولی WEHI-164 پس از تیمار در زمان ۲۴ ساعت با روش MTT. Error bar بیانگر  $Mean \pm SD$  است.



شکل ۳. بررسی میزان القاء آپوپتوز در رده سلولی WEHI-164 تیمار شده با ۴ فراکسیون عصاره متانولی شیرمرغ دیهیمی در زمان ۲۴ ساعت با روش الیزا. Error bar بیانگر Mean±SD است.

## ۴- بحث

کردند (۲) و دل آذر و همکاران به این نتیجه رسیدند که اثرات سایتوتوکسیک عصاره گیاه *Ornithogalum procerum* در اثر مواد پلی استرول می باشد (۲۵) و *Kuroda* در مطالعه دیگری به این نتیجه رسید که اثرات عصاره گیاهان این خانواده در اثر ترکیبات استروئیدی گلیکوزیده می باشد (۴). بنابراین بر آن شدید برای اولین بار اثر سایتوتوکسیک فراکسیون های عصاره متانولی پیاز گیاه شیرمرغ دیهیمی را بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 بررسی کنیم تا فراکسیون هایی که اثر مهارکنندگی و القاء آپوپتوز بیشتری دارند شناسایی شوند. مقایسه نتایج حاصل از تست MTT نشان داد که در طی ۱۲ و ۲۴ ساعت فراکسیون های ۱۰٪ و ۲۰٪ در غلظت های مختلف فاقد اثر سایتوتوکسیک می باشند و پتانسیل سایتوتوکسیسیتهی فراکسیون های دیگر بدین ترتیب می باشد: فراکسیون ۱۰٪ < فراکسیون ۸٪ < فراکسیون ۶٪ < فراکسیون ۴٪. این نتایج نشان دهنده تجمع بیشتر ترکیبات سایتوتوکسیک در فراکسیون های قطبی تر می باشد. در بررسی ۱۲ و ۲۴ ساعته فراکسیون های ۶٪، ۸٪ و ۱۰٪ در همه غلظت های مورد بررسی اختلاف معنی دار با گروه کنترل داشتند و با افزایش غلظت اثر سایتوتوکسیک بیشتری نشان دادند. در طی ۱۲ ساعت اثر سایتوتوکسیک فراکسیون ۴٪ تنها در غلظت های ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر اختلاف معنی دار با گروه کنترل داشت در حالی که در طی ۲۴ ساعت در دیگر غلظت ها نیز اثر سایتوتوکسیک معنی دار نشان داد. با توجه به میزان LC<sub>50</sub> فراکسیون های ۸٪ و ۱۰٪ در زمان ۲۴ ساعت که به ترتیب برابر ۷۶ و ۷۳ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد می توان نتیجه گرفت که این فراکسیون ها دارای بیشترین ترکیبات ضد سرطانی می باشند. اثر غلظت های مختلف فراکسیون ها در

امروزه سرطان یکی از مهمترین عامل مرگ و میر در دنیا محسوب می شود. در طول سالهای گذشته پیشرفت های زیادی در توسعه درمان تومورها مثل جراحی، رادیوتراپی و شیمی درمانی صورت گرفته است. با این حال بیماران زیادی هنوز به این درمان ها مقاوم هستند. بنابراین استراتژی های جدیدی برای افزایش بقاء و بهبود زندگی بیماران سرطانی مورد نیاز است (۲۱، ۲۲). از زمان های قدیم ترکیبات طبیعی و گیاهان در درمان بیماری های مختلف نقش داشته اند و بیشتر ترکیبات ضد سرطانی از گیاهان به دست آمده اند. برای مثال تاکسول به طور گسترده برای درمان تومورهای متاستاتیک و بدون متاستاز مانند سرطان تخمدان و پستان به کار می رود (۲۳). Yan Zhou و همکارانش در سال ۲۰۰۵ به این نتیجه رسیدند که ترکیب ساپونینی OSW-1 از گیاه *Ornithogalum saundersiae* در لوسمی، لنفوم، تومورهای تخمدان، مغز و پانکراس فعالیت ضد سرطانی بالایی دارد و سبب اختلال ساختمانی و عملکردی میتوکندری می شود و مسیر آپوپتوز وابسته به کلسیم را فعال می کند (۲۴، ۴). Minpei Kuroda و همکارانش در سال ۲۰۰۶ با مطالعه بر روی گونه *Ornithogalum thyrsoides* ترکیبات مختلف استروئیدی مانند کلستان گلیکوزید را شناسایی کردند که خواص سایتوتوکسیک قوی بر علیه سلول های لوسمی دارند (۲). سماواتی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با مطالعه بر روی عصاره متانولی پیاز گیاه شیر مرغ دیهیمی اثر سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک این گونه را بر روی سلول های سرطانی WEHI-164 مدل فیروسارکوما تایید کردند (۱۷). Kuroda و همکارانش با مطالعه بر روی *Ornithogalum thyrsoides* ترکیبات مختلف استروئیدی مانند کلستان گلیکوزید را عامل اثرات ضد سرطانی این گیاه معرفی

گیاه شیر مرغ دیهیمی دارای اثرات سایتوتوکسیک و آپوپتوتیک بر روی سلول های سرطانی فیبروسارکوما می باشند. بنابراین ترکیبات سایتوتوکسیک این فراکسیون ها می تواند شناسایی، جداسازی و خالص سازی شوند و با انجام مطالعات تکمیلی در آینده جهت طراحی داروهای ضد سرطانی استفاده شوند.

## ۶- تشکر و قدردانی

از حمایت های مالی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز و همچنین از مرکز تحقیقات ایمونولوژی و تمامی همکاران و عزیزانی که ما را در جهت اجرای هر چه بهتر این تحقیق یاری نمودند نهایت تشکر را داریم.

## References

- Nazifi E., Delazar A., Movafegi A., Hemmati S., Nazemiyeh H., Nahar L., Sarker S., et al. GC-MS analysis of the dichloromethane extract of the the bulbs of *Ornithogalum cuspidatum* Bert. Family: Liliaceae from Iran. Academy of Chemistry of Globe Publication., 2008, 2(3): 94-99.
- Kuroda M., Ori K., Mimaki Y. Ornithosaponins A-D four new polyoxygenated steroidal glycosides from the bulbs of *Ornithogalum thyrsoides*. Steroids., 2006, 71(38): 199-205
- Zhou Y., Prieto C.G., Carney D.A., Xu R-H., Pelicano H., Kang Y., et al. OSW-1: a natural compound with potent anticancer activity and a novel mechanism of action. Journal of the National Cancer Institute., 2005, 97(23): 1781-5.
- Kuroda M., Mimaki Y., Sashida Y. Saundersiosides C-H rearranged cholestane glycosides from the bulbs of *Ornithogalum saundersiae* and their cytostatic activity on HL-60 cells. Photochemistry., 1999, 52(13): 435-443.
- Karim-Kos H.E., Vries E.D., Soerjomataram I., Lemmens V., Siesling S., Coebergh J.W.W. Recent trends of cancer in Europe: a combind approach of incidence-survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. European journal of cancer. 2008., 44(10): 1345-89.
- Mankin H.J., Hornicek F.J. Diagnosis, Classification, and Management of Soft Tissue Sarcomas. Cancer Control., 2005, 121: 5-22.
- Osuna D., Álava E.D. Molecular Pathology of Sarcomas. Reviews on Recent Clinical Trials., 2009, 4: 12-26.
- Black.A.Morrison. Soft tissue sarcomas of the extremities. Bumc Proceedings., 2000, 90(16): 285-3.
- Wen-jing R., Mao-de L., Jian-guang Z. Anticancer effects of Chinese herbal medicine, science or myth?. Journal of Zhejiang University Science B., 2006, 712: 1006-14.
- Abdolmohammadi M., Fouladdel S.h., Shafiee A., Amin G.h., Ghaffari S.M, Azizi E. Anticancer effects and cycle analysis on human breast cancer T47D cells treated with extract of *Astrodaucus Persicus* (Bioss) Drude in comparison to Doxorubicin. DARU., 2008, 16(2): 112-118.
- Cragg G.M., David J.N., Plant as source of anti cancer agents. Journal of Ethnopharmacology., 2005, 100: 72-79.
- Katzung B.G., Masters S.B., Trevor A.J. Basic and clinical pharmacology, Norwalk, appelton & lange., 1997: 409-425.

زمانهای ۱۲ و ۲۴ ساعت باعث کاهش رشد سلول های سرطانی شد. بنابراین اثر سایتوتوکسیک فراکسیون ها وابسته به غلظت و زمان می باشد. به طوری که با افزایش غلظت فراکسیون ها و زمان انکوباسیون اثر سایتوتوکسیک افزایش می یابد. نتایج حاصل از بررسی میزان القاء آپوپتوز برای فراکسیون های ۰.۴٪، ۰.۶٪، ۰.۸٪ و ۱.۰٪ در زمان ۲۴ ساعت با غلظت های مشخص نشان داد که شدت القاء آپوپتوز برای فراکسیون های ۰.۸٪ و ۱.۰٪ حداکثر می باشد.

## ۵- نتیجه گیری

با توجه به اینکه در بین فراکسیون های متانولی گیاه شیرمرغ دیهیمی، فراکسیون های ۰.۸٪ و ۱.۰٪ عصاره متانولی پیاز

- Park E.J., Pezzuto J.M., Botanicals in Cancer Chemoprevention. Cancer and Metastasis Reviews., 2002, 21: 231-255.
- Bruin E.C.d., Medema J.P. Apoptosis and nonapoptot deaths in cancer development and treatment response. Cancer Treatment Reviews., 2008:1-13.
- FAN T.J., HAN L.H., CONG R.S., LIANG S. Caspase Family Proteases and Apoptosis. Acta Biochimica et Biophysica Sinica., 2005, 37(11): 719-727.
- Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicology Pathology., 2007, 354: 495-516.
- Samavati M., Babaloo Z., Delazar A., Baradaran B., Nazifee E., Mohammadi A., et al. Cytotoxic and Apoptotic Effects of *Ornithogalum cuspidatum* Methanolic Extract on WEHI-164 Fibrosarcoma Cancer Cell Line, Pharmaceutical Sciences., 2010, 16(3): 149-156.
- Phelan M.C. Basic Techniques for Mammalian Cell Tissue Culture. Current Protocols in Cell Biology., 1998, 7: 1- 10.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods., 1983, 65: 55-63.
- Wang, Guttridge, Mayo, Baldwin. NF-kappa B Induces Expression of the Bcl-2 Homologue A1/Bfl-1 To Preferentially Suppress Chemotherapy-Induced Apoptosis. Mol Cell Biol., 1999, 19: 5923-9.
- Biagi E., Rousseau R.F., Yvon E., Vigouroux S., Dotti G., Brenner M.K. Cancer vaccines: dream, reality, or nightmare. Clin Exp Med., 2002, 2: 109-118.
- Wong S. Diagnosis and management of desmoid tumors and fibrosarcoma. Journal of Surgical Oncology., 2008, 97(32): 554-558.
- Christopher G., Kathryn M., Nancy H., Woong K., Lester J., Luka M. Relationship of Mitotic Arrest and Apoptosis to Antitumor Effect of Paclitaxel. Journal of the National Cancer Institute., 1996, 88(18): 1308-15.
- Agnieszka W., Maciej D., Jadwiga M., Jacek W., Michal N., Joanna R., et al. New Analogues of the Potent Cytotoxic Saponin OSW-1. Medicine Chemistry., 2007, 50(14), 3667-73.
- Delazar A , Nazifi E, Movafeghi A, Nahar L, Nazemiyeh H, Moghadam. B,et al . (2009) GC-MS analysis of *Ornithogalum Procerum* . *DARU*, 17(1), 33-36.