Journal of Ilam University of Medical Sciences

P-ISSN: 1563-4728
E-ISSN: 2588-3135

# Anti-oxidative and anti-cancer effects of Melia azedarach L. extract on Proliferation and Cell Viability of Testicular cancer TM4 cell line

**Cobra Tofighi [1,2*], Negar Sadeghi[1]**

[1] Dept of Biology, Danesh Alborz University, Abeyek, Iran
[2] Dept of Plant Biology, Facucty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran. Iran

**Article Info**

***Article type:***
Research article

***Article History:***
Received: Jun. 18, 2024
Received in revised form: Sep. 02, 2024
Accepted: Sep. 07, 2024
Published Online: Dec. 05,2024

**** Correspondence to:***
Cobra Tofighi
Dept of Biology, Danesh Alborz University, Abeyek, Iran

Email:
tofighi86@gmail.com

**A B S T R A C T**

**Introduction:** Testicular cancer is one of the most common type of cancers to affect men. Medical herbs are increasingly considered useful complementary treatments for cancer. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic, antioxidant, and anticancer capacity of Melia azedarach L. extract on testicular cancer TM4 cells.

**Materials & Methods:** The TM4 cells were treated with various concentrations of leaf Melia azedarach L. extracts (10, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 750, and 1000 µg $ml^{-1}$) for 24, 48, and 72 hours. MTT assay and real-time PCR were used for the evaluation of plant extract cytotoxicity and gene expression (CAS8, CAS9) analysis, respectively. Anthocyanin content and DPPH radical scavenging activity were evaluated for the antioxidant potential of plant extract. Statistical tests included one-way ANOVA, which was imported to SPSS V.18, and the significance level was considered less than 0.01.

**Results:** MTT assay results revealed a decline in live cells with increasing concentration of plant extract in a dose- and time-dependent manner. Cell viability was significantly ($P < 0.01$) reduced, especially at a concentration of 1000 µg $ml^{-1}$. Also, the CAS8 gene expression was increased in TM4 cells treated with bitter olive extract at 174.2 µg $ml^{-1}$ concentration (IC50), whereas the CAS9 gene expression was decreased. Moreover, a higher DPPH activity and anthocyanin content were found with increasing plant extract concentration.

**Conclusion:** Ethanolic extracts of Melia azedarach L. have antioxidant activity, which could significantly inhibit the proliferation of testicular cancer TM4 cells (A549) by inducing apoptosis and CAS8 gene expression. Therefore, it could be regarded as an additional treatment for testicular cancer.

**Keywords**: Melia azedarach L., Testicular cancer, Gene expression, MTT

**How to cite this paper:** Tofighi C, Sadeghi N. Anti-oxidative and anti-cancer effects of Melia azedarach L. extract on Proliferation and Cell Viability of Testicular cancer TM4 cell line. *Journal of Ilam University of Medical Sciences*. 2024;32(5):38-49.

## Introduction

Testicular cancer is one of the most common types of cancer that affect men. Genetic changes typically cause this disease, making the identification of genes linked to cancer development crucial for finding effective treatment solutions (1). Common cancer treatments include surgery, chemotherapy, and radiotherapy (2). The use of chemotherapy has become more popular; however, the excessive cytotoxicity of this method causes undesirable side effects (2). Medical herbs are being increasingly considered a useful supplementary treatment for cancer (3). The bitter olive plant (Melia azedarach L.) belongs to the Meliaceae family, and phytochemical studies have shown that different parts of this plant contain a variety of bioactive compounds such as phenols, flavonoids, alkaloids, tannins, saponins, and terpenoids (3). The aim of this study was to evaluate the cytotoxic, antioxidant, and anticancer capacity of Melia azedarach L. extract on testicular cancer TM4 cells.

## Methods

This research study was conducted in May 2022 at Danesh Alborz University. First, to prepare the herbal extract, the leaves of the bitter olive plant were dried in the shade away from direct sunlight and then ground into powder. The dry, bitter olive powder was soaked in 80% ethanol for 24 hours on a shaker. Then it was filtered using Whatman filter paper. Next, a

© The Author(s)
Publisher: Ilam University of Medical Sciences

rotary device concentrated it, and we stored the resulting extract in a refrigerator at 4°C. The TM4 cells were treated with various concentrations of leaf Melia azedarach L. extracts (10, 25, 50, 75, 100, 150, 250, 750, and 1000 µg $ml^{-1}$) for 24, 48, and 72 hours. MTT assay and real-time PCR were used for the evaluation of plant extract cytotoxicity and gene expression (CAS8, CAS9) analysis, respectively. The comparative CT method was used to calculate the relative expression levels. Anthocyanin content and DPPH radical scavenging activity were evaluated for the antioxidant potential of plant extract. A spectrophotometer measured the absorbance of the reaction mixture at 530 nm to determine the anthocyanin content of the leaf extract. Okoh et al.'s method measured the DPPH free radical inhibition capacity by adding methanolic extract to DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) solution and reading the absorbance of the samples at a wavelength of 157 nm (5). Statistical tests included one-way ANOVA, which was imported to SPSS V.18, and the significance level was considered less than 0.01.

## Results

The MTT assay report revealed a decline in live cells with increasing concentrations of plant extracts in a dose- and time-dependent manner. Cell viability was significantly ($P < 0.01$) reduced, especially at a concentration of 1000 µg $ml^{-1}$. Also, the CAS8 gene expression was increased in TM4 cells treated with bitter olive extract at 174.2 µg $ml^{-1}$ concentration (IC50), whereas the CAS9 gene expression was decreased. Moreover, a higher DPPH activity and anthocyanin content were found with increasing plant extract concentration. The destructive effects of anticancer drugs such as cisplatin are well known, but medicinal plants have fewer side effects than chemical drugs. Therefore, many researches are being carried out in order to use their natural metabolites in cancer treatment as a complementary treatment. The aim of this study was to investigate the cytotoxic and anticancer effects of bitter olive plant extract on the TM4 cell line in testicular cancer. The results showed that bitter olive extract in different concentrations has dose- and time-dependent cytotoxic effects on TM4 testicular cancer cells. So that after the toxicological test, it was observed that the percentage of cell survival in the doses of 500, 750, and 1000 and in 72 hours was significantly reduced ($P < 0.01$). It seems that the performance of bitter olive extract depends on the dose, and it was time, and with increasing dose concentration, the survival time of cells decreased significantly compared to control samples, and the IC50 level in 72 hours was 174.2. Also, real-time PCR results showed that the expression of the CAS8 gene went up in TM4 cells treated with bitter olive plant extract compared to the control sample that wasn't treated, but the expression of the CAS9 gene went down significantly ($P < 0.01$). Also, the amount of anthocyanin and DPPH radical scavenging activity went up significantly as the concentration of bitter olive extract went up. The highest level of antioxidant activity was seen at a concentration of 1000 µg/ml for both indicators.

## Conclusion

Ethanolic extracts of Melia azedarach L. have antioxidant activity, which could significantly inhibit the proliferation of testicular cancer TM4 cells (A549) by inducing apoptosis and CAS8 gene expression. Therefore, it could be regarded as an additional treatment for testicular cancer.

## Authors' Contribution

Conceptualization, Methodology, Validation: CT, NS, Formal Analysis, Investigation, Software, Resources, Data Curation, Writing– Original Draft Preparation, Writing– Review & Editing, Visualization, Supervision, Project Administration, Funding Acquisition: CT.

## Ethical Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Danesh Alborz University. The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

## Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

## Funding

No funding.

## Acknowledgment

The authors of the article are extremely grateful to the Department of Biology of Danesh Alborz University for the approval and support of this study.

مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام

JIUMS

P-ISSN: ۱۵۶۳-۴۷۲۸

E-ISSN: ۲۵۸۸-۳۱۳۵

# بررسی اثر مهارکنندگی تکثیر سلولی و ضدسرطانی عصارهٔ گیاه زیتون تلخ بر ردهٔ سلولی TM4 در سرطان بیضه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن

کبری توفیقی [۱و۲*]، نگار صادقی [۱]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه دانش البرز، قزوین، ایران

[۲] گروه علوم گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

**اطلاعات مقاله**

**نوع مقاله:** پژوهشی

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۳/۰۳/۲۹

**تاریخ ویرایش:** ۱۴۰۳/۰۶/۱۲

**تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۰۶/۱۷

**تاریخ انتشار:** ۱۴۰۳/۰۹/۱۵

**نویسنده مسئول:**

کبری توفیقی

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه دانش البرز، قزوین، ایران

**Email:**
tofighi86@gmail.com

**چکیده**

**مقدمه:** سرطان بیضه شایع‌ترین سرطان در میان مردان در سرتاسر جهان است. امروزه کاربرد داروهای گیاهی به‌عنوان درمانی مکمل برای کاهش آثار این بیماری موردتوجه است. هدف از این تحقیق بررسی خاصیت ضدسرطانی، آنتی‌اکسیدانی و سمیت سنجی گیاه زیتون تلخ (*Melia azedarch* L.) بر ردهٔ سلولی TM4 بود.

**مواد و روش‌ها:** پس از تهیهٔ عصارهٔ اتانولی گیاه زیتون تلخ ردهٔ سلولی سرطان بیضه TM4 توسط غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر( به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند؛ سپس زنده‌مانی سلول‌ها توسط روش MTT، بیان نسبی ژن‌های *CAS8* و *CAS9* با استفاده از روش Real-time PCR و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها با بررسی محتوای آنتوسیانین و میزان مهار رادیکال آزاد DPPH بررسی شد. در نهایت نتایج با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه با نرم‌افزار SPSS vol.18 نسخه ۱۸ تجزیه‌وتحلیل شد.

**یافته‌های پژوهش:** نتایج مربوط به تست MTT نشان داد که عصارهٔ زیتون تلخ در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های سرطان بیضه آثار سمیت سلولی وابسته به دوز و زمان دارد، به‌طوری‌که بالاترین درصد مهار رشد معنی‌دار در غلظت‌های ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده گردید ($P\leq0.01$)؛ همچنین بیان ژن *CAS8* در سلول‌های TM4 تیمار شده با عصارهٔ گیاه در غلظت ۱۷۴/۲ (IC50) نسبت به نمونهٔ کنترل افزایش داشت؛ اما بیان *ژن CAS9* کاهش معنی‌داری نشان داد. علاوه بر این، محتوای آنتوسیانین و میزان مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت عصاره بیشتر شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** براساس نتایج، عصارهٔ گیاه زیتون تلخ به علت داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی پتانسیل بالایی در از بین بردن سلول‌های سرطان بیضه دارد و با القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن CAS8 می¬تواند به‌عنوان درمان مکمل در بهبود سرطان در نظر گرفته شود.

**واژه‌های کلیدی:** زیتون تلخ، سرطان بیضه، بیان ژن، MTT

**استناد:** توفیقی کبری، صادقی نگار. بررسی اثر مهارکنندگی تکثیر سلولی و ضدسرطانی عصارهٔ گیاه زیتون تلخ بر ردهٔ سلولی TM4 در سرطان بیضه و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن. *مجله دانشگاه علوم پزشکی ایلام*، آذر ۱۴۰۳؛ (۵)۳۲: ۴۹-۳۸.

CC BY NC

حق‌مؤلف © نویسندگان

## مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر در سراسر جهان است و معمولاً این بیماری ناشی از تغییرات ژنتیکی است. به همین علت، شناسایی برخی ژن‌های مرتبط با پیشرفت سرطان نقش مهمی در یافتن راهکارهایی در درمان این بیماری ایفا می‌کند.

سرطان بیضه تقریباً ۱ درصد از کل سرطان‌ها را در مردان شامل می‌شود و شایع‌ترین تومور در میان مردان جوان (۱۵ تا ۴۰ سال) است. بروز سرطان بیضه به‌طور گسترده‌ای در مناطق مختلف دنیا متفاوت است، با بالاترین بروز در شمال اروپا و بروز بسیار کم در آفریقای مرکزی. با وجود این، نرخ بروز سرطان بیضه در سال‌های اخیر افزایش‌یافته و گروه‌های سنی بالاتر از ۱۵ سال را تحت تأثیر قرار داده است. این در حالی است که هیچ سازوکار ایجادکنندهٔ اثبات‌شده‌ای تاکنون در بروز و درمان این سرطان شناسایی نشده است (۱).

درمان‌های رایج سرطان شامل چندین روش درمانی مانند جراحی، شیمی‌درمانی و رادیوتراپی است. کاربرد شیمی درمانی رواج بیشتری دارد، با وجود این، سمیت سلولی بی رویهٔ این روش موجب عوارض جانبی نامطلوب می‌شود، زیرا این روش می‌تواند بافت‌ها و سلول‌های در حال رشد سریع از جمله فولیکول‌های مو، سلول های دستگاه گوارش و مغز استخوان را نیز مهار کند. استفاده از شیمی‌درمانی همچنین باعث ایجاد مقاومت چندداروییی در سلول‌های بنیادی سرطانی می‌گردد (۲).

بنابراین تحقیق دربارهٔ روشهای درمانی جایگزین با عوارض جانبی کمتر ازجمله استفاده از گیاهان دارویی با خواص ضدسرطانی ضروری است. گیاه زیتون تلخ ( Melia azedarch L.) متعلق به تیرهٔ Meliaceae، شامل ۵۱ جنس و حدود ۵۷۵ گونه است و برگ، میوه، پوست، دانه و ریشهٔ این گیاه در طب سنتی استفاده می‌شود. بررسی‌های فیتوشیمیایی نشان داده است که بخش‌های مختلف این گیاه حاوی انواع ترکیبات فعال زیستی مانند فنول‌ها، فلاوونوئیدها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و ترپنوئیدها است (۳). فعالیت‌های بیولوژیکی مختلفی نیز مانند آثار ضدقارچی، ضدمالاریایی، ضدباکتریی، ضدباروری، حفاظت از کبد، آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیک از این گیاه گزارش‌شده است (۴). پژوهش¬هایی که اخیراً انجام شده است، نشان دهندهٔ فعالیت‌های سیتوتوکسیک بخش‌هایی از گیاه M. azedarach L. در شرایط آزمایشگاهی بر رده‌های سلولی سرطانی است که سازوکار عمل آن‌ها نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد (۵). ازاین‌رو، هدف از این تحقیق بررسی آثار سیتوتوکسیک و ضدسرطانی عصارهٔ گیاه Melia azedarch L. بر ردهٔ سلولی TM4 در سرطان بیضه است.

## مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی در اردیبهشت سال ۱۴۰۲ در دانشگاه دانش البرز انجام گردید. ابتدا برای تهیه عصارهٔ گیاهی، برگ‌های گیاه زیتون تلخ به دور از نور مستقیم خورشید در سایه خشک شده و سپس به‌وسیلهٔ آسیاب، پودر گردید. مقدار ۵۰ گرم از پودر خشک زیتون تلخ در ۲۵۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر خیسانده شد. سوسپانسیون به مدت ۷۲ ساعت در یخچال در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری گردید و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. پس از آن به‌وسیلهٔ دستگاه روتاری تغلیظ صورت گرفت و عصارهٔ حاصل در دمای ۴ درجهٔ سانتی گراد یخچال نگه‌داری گردید. در این پژوهش از غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصارهٔ زیتون تلخ استفاده شد.

در این پژوهش برای کشت سلولی از ردهٔسلولی سرطان بیضه TM4 استفاده گردد. ردهٔ سلولی TM4از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد. برای کشت سلول‌ها از محیط RPMI16040 استفاده گردید که حاوی ۱ درصد pensterp و ۱۰ درصد FBSاست. سلول‌ها در فلاسک T25 در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد با ۵ درصد دی‌اکسیدکربن و ۹۵ درصد رطوبت کشت داده شد.

تست MTT (سمیت سنجی) برای دستیابی به درصد زنده‌مانی سلول‌ها تحت تأثیر عصارهٔ گیاهی انجام گرفت. سوسپانسیون سلولی به کمک محیط کشت به حجم رسانده و در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور

CO2 دار (Memmert آلمان) قرار گرفت تا سلول‌ها به کف چاهک بچسبد. سلول‌ها پس از یک روز با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر با عصارهٔ زیتون تلخ تیمار گردیدند. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان زنده‌مانی سلول‌ها بررسی شد. محیط کشت داخل چاهک‌ها خالی گردید و به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر رنگ MTT به‌صورت ۱۰ درصد اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. مادهٔ زردرنگ MTT از چاهک‌ها خالی شد. به هر چاهک مقدار ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید؛ سپس با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر الایزا ریدر جذب اندازه‌گیری شد. جذب هر چاهک با چاهک کنترل که دارو دریافت نکرده بود مقایسه گردید و درصد زنده‌مانی به‌دست آمد. ۵۰ درصد زنده‌مانی عدد IC50 را نشان می‌دهد.

اندازه‌گیری بیان ژن‌های CAS9و CAS8 بدین ترتیب انجام شد. استخراج RNA به کمک ترایزول از سلول‌های TM4 انجام گردید و در ۸۰- قرار گرفت تا cDNAساخته شود. برای سنتز cDNA از کیت SMOBIO (تهیه‌شده از شرکت SMOBIO تایوان) استفاده شد. در مرحلهٔ پس از انجام سنتز cDNA، به‌منظور تعیین میزان بیان ژن‌های CAS8,9 درسلول از واکنش Real- time PCR استفاده و ژن B2Mبه عنوان ژن منبع در نظر گرفته شد. توالی ژن‌های CAS8,9 از سایت NCBIدریافت گردید و پرایمرهای موردنظر بر اساس استانداردهای طراحی پرایمر با نرم‌افزار Gene runner برای تکنیک Real-time PCR طراحی شد (برای ژن CAS8 پرایمر فوروارد: AGAAGAGGGTCATCCTGGGAGA، پرایمر ریورز: TCAGGACTTCCTTCAAGGCTGC و به همین ترتیب، برای ژن CAS9 پرایمر فوروارد: GTTTGAGGACCTTCGACCAGCT و پرایمر ریورز: CAACGTACCAGGAGCCACTCTT). مخلوط واکنش PCR شامل ۱۰ میکرولیتر مسترمیکس، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۰/۴ میکرولیتر پرایمر ریورز، ۶/۲ میکرولیتر H2O و ۳ میکرولیتر cDNA بود (کیت AMPLIQONII RealQ Plus 2x Mastermix green و دستگاه Real-time PCR ABI-USA ABI-StepOne plus ). سپس پس از پایان مراحل، اطلاعات به‌دست‌آمده از لحاظ melting curve یا منحنی ذوب بررسی شد و نمودارهای به‌دست‌آمده ازلحاظ ایجاد نشدن دایمر بررسی گردیدند. از داده‌های به‌دست‌آمده عدد Ct محاسبه و براساس معادله‌های آنالیزی مخصوص Real-time PCR عدد Foldchange محاسبه شد.

به‌منظور سنجش محتوای آنتوسیانین عصارهٔ برگی از روش دیاز و همکاران (۶) استفاده گردید و جذب مخلوط واکنش در طول‌موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. به‌منظور تعیین محتوای آنتوسیانین عصارهٔ مورد نظر، از نمودار استاندارد آنتوسیانین استفاده شد. سنجش ظرفیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH به روش اوکوه و همکاران با افزودن عصارهٔ متانولی به محلول DPPH (۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدراسیل) و خواندن جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۱۵۷ نانومتر انجام شد (۷). ظرفیت مهار رادیکالهای آزاد DPPH با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه شد که در آن A0 معرف میزان جذب کنترل و A1 معرف میزان جذب نمونه است.

ظرفیت مهار رادیکالهای آزاد (درصد) = [(A0-A1)/A0]×100

در نهایت، نتایج توسط نرم‌افزار SPSS vol.18 و مقایسهٔ میانگین‌ها با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA تجزیه‌وتحلیل شد ($P\leq0.01$). نمودارها نیز توسط نرم‌افزار اکسل رسم گردید.

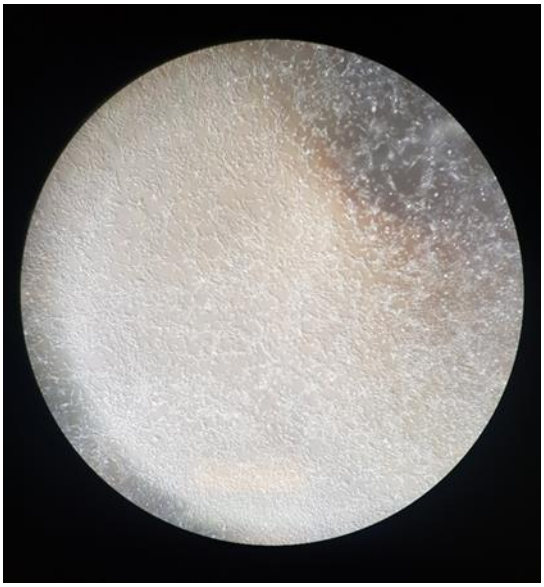
## یافته‌های پژوهش

نتایج مربوط به درصد زنده‌مانی سلول‌های سرطانی ردهٔ TM4 تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی زیتون تلخ در شکل شمارهٔ ۱ (سلول‌های TM4 چسبیده به کف فلاسک) و نمودارهای شمارهٔ ۱ تا ۳ (درصد زنده مانی TM4 با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی زیتون تلخ در مدت ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت) نشان داده‌شده است. بر اساس نتایج به دست آمده عصارهٔ زیتون تلخ در غلظت‌های مختلف

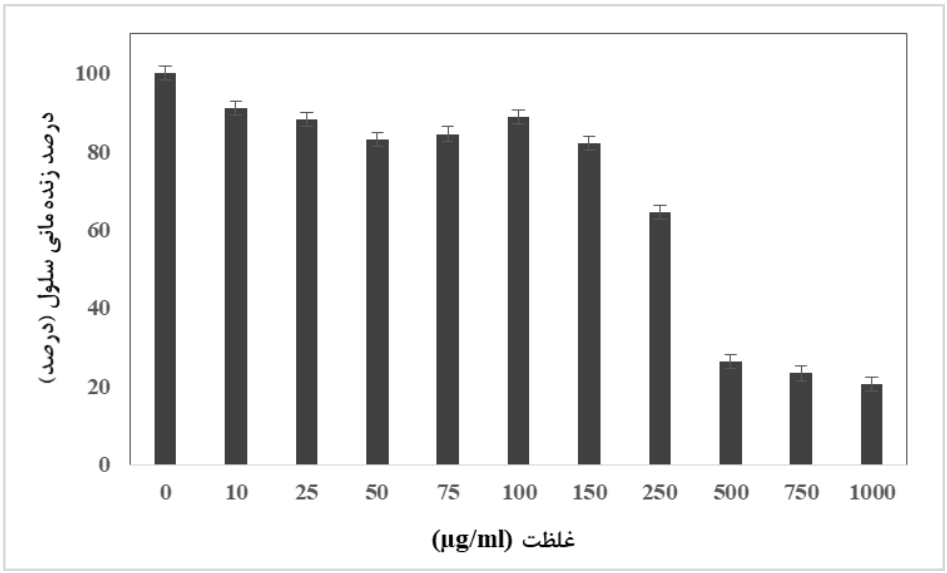
دارای آثار سمیت سلولی می‌باشد (غلظت صفر گروه کنترل است). به‌طوری‌که با افزایش غلظت و گذشت زمان، سمیت سلولی نیز بیشتر شد. طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بالاترین درصد مهار رشد معنی‌دار ($P\leq0.01$) در سلول‌های سرطانی ردهٔ TM4 به‌ترتیب در غلظت‌های ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر مشاهده گردید. حروف متفاوت در هر گروه بیانگر تفاوت معنی‌دار است. همچنین، مقادیر به‌دست‌آمده مربوط به IC50 به دست آمده از تجزیه‌وتحلیل تست MTT به‌ترتیب در ۲۴ ساعت به ۳۲۸/۴، در ۴۸ ساعت به ۲۷۴/۳ و در ۷۲ ساعت ۱۷۴/۲ رسید.

نتایج مربوط به تغییرات بیان ژن‌های CAS9 و CAS8 در سلول‌های سرطانی TM4 تیمار شده با عصارهٔ زیتون تلخ در نمودار شمارهٔ ۴ و منحنی های ذوب در نمودارهای شمارهٔ ۵ و ۶ نشان داده‌شده است. برای بررسی بیان ژن‌ها، از عصارهٔ گیاهی با غلظت ۲/۱۷۴ میکروگرم در میلی‌لیتر مربوط به IC50 زمان ۷۲ ساعت استفاده گردید. بر اساس یافته‌های Real-Time PCR، میزان بیان ژن CAS8 در سلول‌های TM4 تیمار شده با عصارهٔ گیاه زیتون تلخ نسبت به نمونهٔ کنترل تیمار نشده افزایش داشت اما بیان ژن CAS9 کاهش معنی‌دار در $P\leq0.01$ نشان داد.

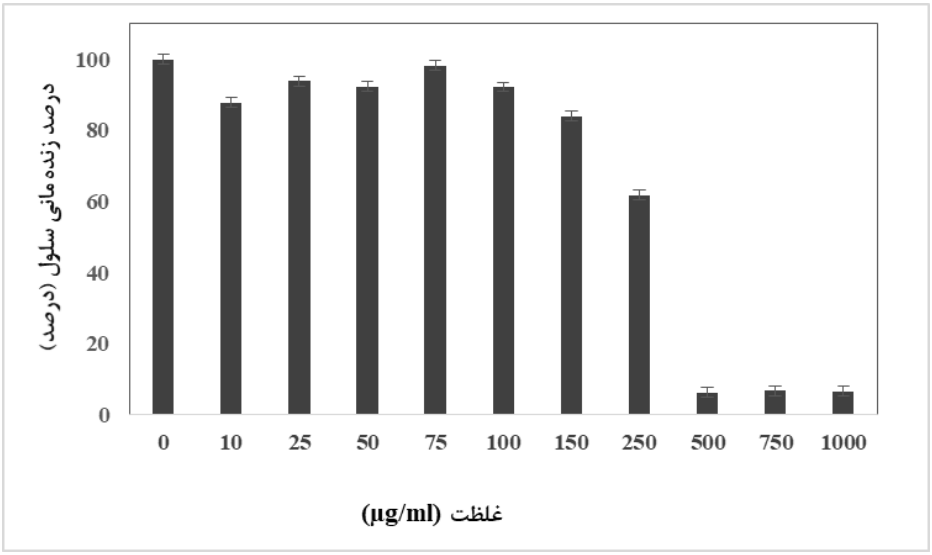
همچنین، یافته‌های مربوط به بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌های زیتون تلخ شامل محتوای آنتوسیانین و نیز فعالیت مهار رادیکال DPPH در نمودارهای ۷ و ۸ ارائه گردیده است. به طوری که هم محتوای آنتوسیانین و هم فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش غلظت عصاره، افزایش معنی دار در $P\leq0.01$ نشان داد و حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی معنی دار هم در محتوای آنتوسیانین و هم فعالیت مهار رادیکال DPPH در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر ثبت گردید.



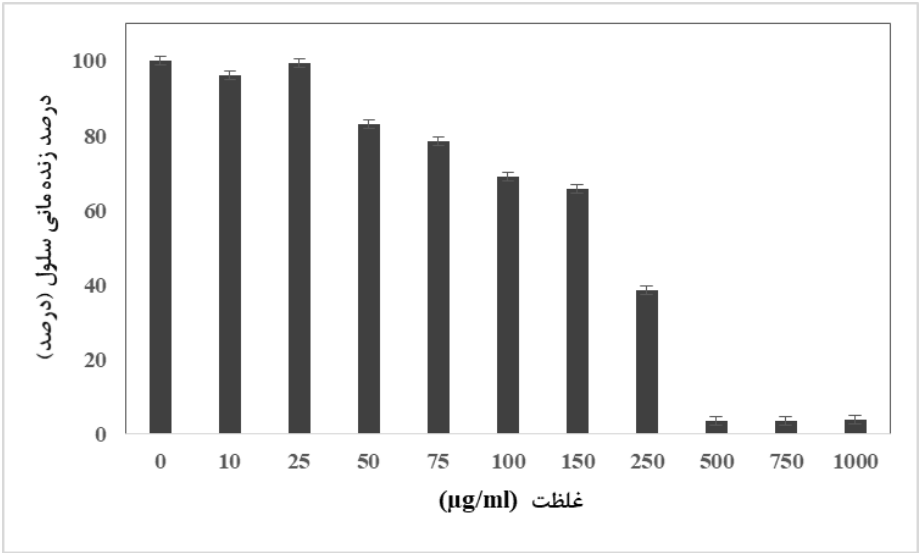
**شکل شماره ۱.** سلول‌های TM4 چسبیده به کف فلاسک



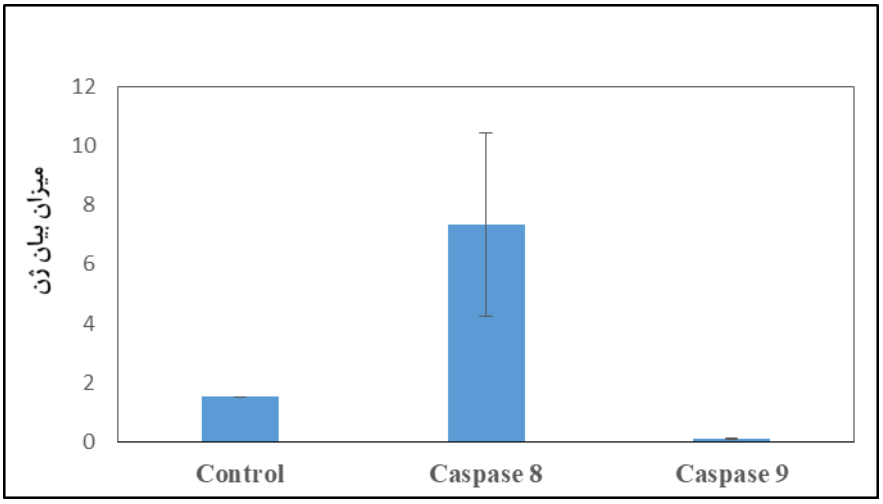

**نمودار شماره ۱.** درصد زنده مانی TM4 با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی زیتون تلخ در مدت ۲۴ ساعت



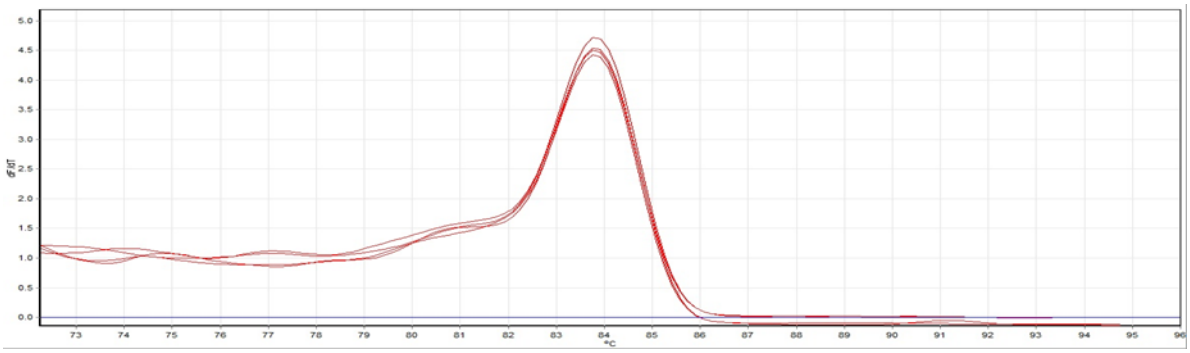

**نمودار شماره ۲.** درصد زنده مانی TM4 با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی زیتون تلخ در مدت ۴۸ ساعت



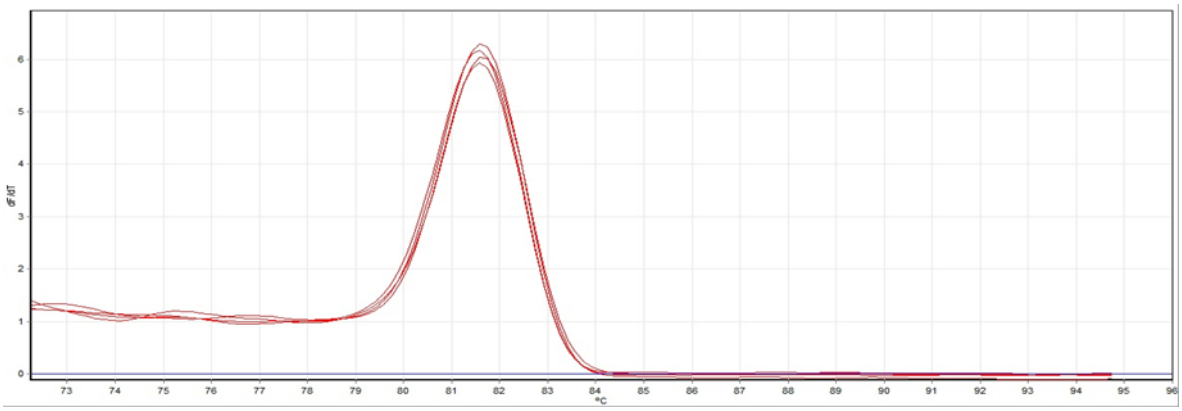

**نمودار شماره ۳.** درصد زنده مانی TM4 با غلظت‌های مختلف عصارهٔ اتانولی زیتون تلخ در مدت ۷۲ ساعت



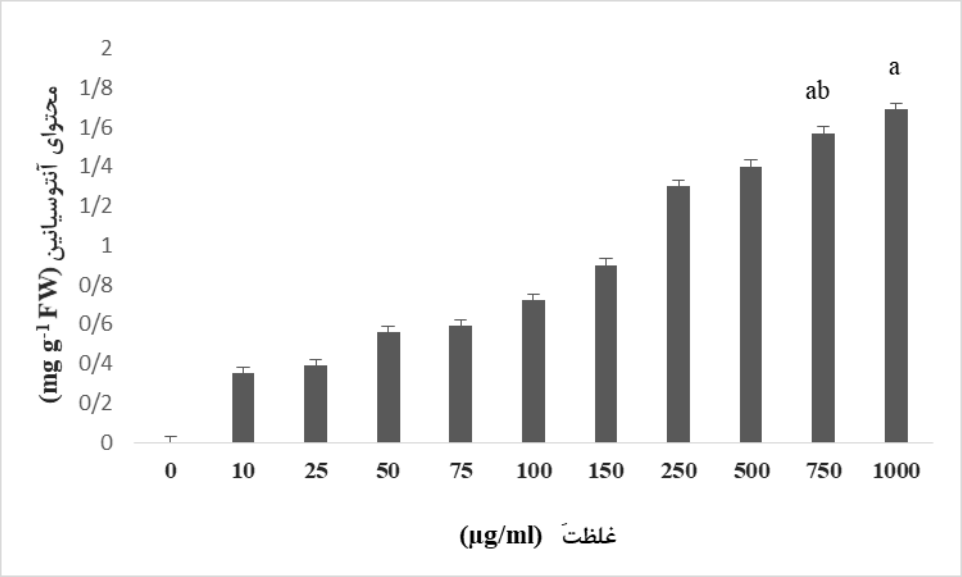

**نمودار شماره٤.** نمودار بیان ژن‌های مربوط به کاسپاز ۸ و کاسپاز ۹ در نمونه‌های تیمار شده با عصارهٔ متانولی زیتون تلخ مقایسه با کنترل



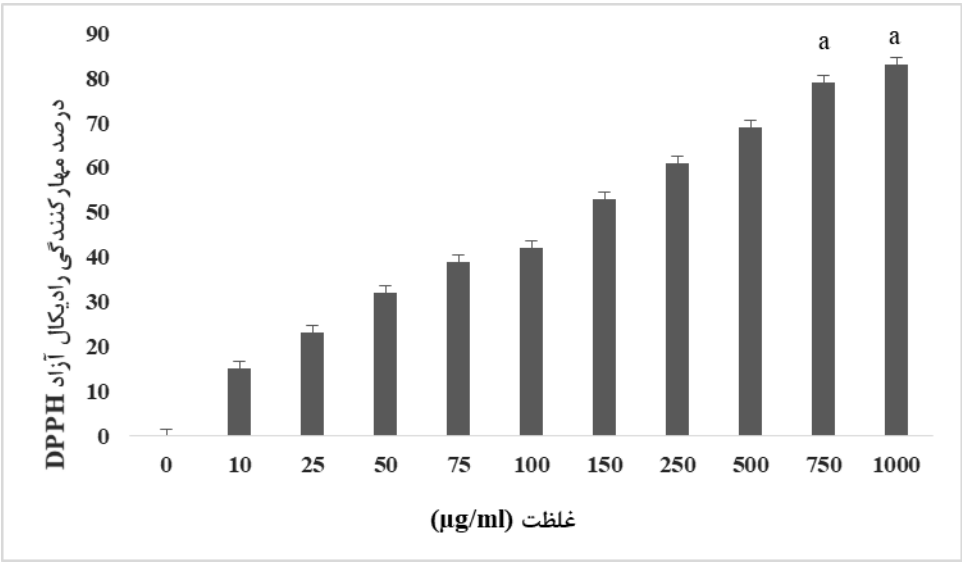
**نمودار شماره ٥.** منحنی ذوب مربوط به Caspase8



**نمودار شماره ٦.** منحنی ذوب مربوط به Caspase9




**نمودار شماره ۷.** محتوای آنتوسیانین عصارهٔ برگی زیتون تلخ در غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر




**نمودار شماره ۸.** درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت های ۰ تا ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصارهٔ برگی زیتون تلخ

## بحث و نتیجه‌گیری

آثار تخریبی داروهای ضدسرطان همچون سیس پلاتین کاملاً شناخته‌شده است؛ اما گیاهان دارویی نسبت به داروهای شیمیایی عوارض کمتری دارند؛ ازاین‌رو، امروزه تحقیقات متعددی به‌منظور استفاده از متابولیت‌های طبیعی آن‌ها در درمان سرطان به‌عنوان درمان مکمل در حال انجام است. هدف از این مطالعه بررسی آثار سیتوتوکسیک و ضدسرطانی عصارهٔ گیاه زیتون تلخ بر ردهٔ سلولی TM4 در سرطان بیضه بود. نتایج این پژوهش نشان داد که عصارهٔ زیتون تلخ در غلظت‌های مختلف بر سلول‌های سرطان بیضه ردهٔ TM4 آثار سمیت سلولی وابسته به دوز و زمان دارد.

به‌طوری‌که پس از انجام تست سمیت سنجی مشاهده شد که درصد زنده‌مانی سلول‌ها در دوزهای ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ و در زمان ۷۲ ساعت به‌طورچشمگیری کاهش‌یافته بود که بر اساس این نتایج می‌توان دریافت که عملکرد عصارهٔ زیتون تلخ وابسته به دوز و زمان بود و با افزایش غلظت دوز و زمان زنده‌مانی سلول‌ها نسبت به نمونه‌های کنترل، کاهش معنی‌داری پیدا کرد و میزان IC50 در ۷۲ ساعت ۱۷۴/۲ بود؛ همچنین، محتوای آنتوسیانین و نیز فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش غلظت عصارهٔ زیتون تلخ، افزایش معنی‌دار نشان داد، به‌طوری‌که حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر دو

شاخص در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود.

با توجه به روند افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت عصاره می‌توان کاهش روند زنده‌مانی سلول‌های TM4 به‌ویژه در غلظت‌های ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر را به جاروب کردن بیشتر رادیکال‌های آزاد و افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره نسبت داد.

در این تحقیق همچنین بیان ژن‌های CAS8 و CAS9 در سلول‌های TM4 سرطان بیضه تیمار شده با عصارهٔ زیتون تلخ شد. برای انجام تست Real-Time PCR از غلظت IC50 72 ساعته استفاده گردید که برابر با مقدار ۱۷۴/۲ بود.

نتایج نشان دهندهٔ بالاتر بودن میزان بیان ژن CAS8 نسبت به ژن CAS9در سلول‌های TM4 بود. میزان بیان ژن CAS9 سلول‌های تیمار شده با زیتون تلخ به مقدار چشمگیری نسبت به سلول‌های تیمار نشده کاهش یافت. این یافته‌ها هم‌سو با مطالعات پیشین انجام شده دربارهٔ تأثیر عصارهٔ گیاه زیتون تلخ بر سلول‌های سرطانی است (۱۱).

مطالعات مختلفی به بررسی آثار ضدتکثیری و ضدسرطانی عصارهٔ برخی گیاهان پرداخته است. در مطالعهٔ مشابهی برای ارزیابی سمیت سلولی اسانس یا عطرمایهٔ رزماری، سلول‌های MCF-7به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در معرض غلظت‌های مختلفی از عطرمایه قرار گرفتند و نتایج نشان دهندهٔ مرگ سلولی وابسته به دوز و زمان بود (۸). کمترین میزان بقا ۱۹ درصد پس از ۷۲ ساعت بود و با افزایش غلظت عطرمایه، مرگ سلولی نیز افزایش یافت؛ همچنین، نتایج Real-Time PCR نشان‌دهندهٔ افزایش معنی‌داری در بیان ژن BIM پس از تیمار با عطرمایهٔ رزماری بود و بدین ترتیب می‌تواند بیان‌کنندهٔ اثر سیتوتوکسیک عطرمایهٔ رزماری بر سلول¬های سرطانی پستان با افزایش بیان ژن آپوپتوتیک BIMو القای آثار ضدسرطانی باشد.

در مطالعه دیگری، آثار سیتوتوکسیک عصارهٔ دی کلرومتانولی گیاه گزنه (Urtica dioica) بر سلول‌های سرطان سینهٔ ردهٔ MDA-MB-468 نشان داده شد که همزمان با القای آپوپتوز بود (۹)؛ همچنین، آثار ضدسرطانی عصارهٔ گیاه درمنهٔ ترکمنی (Artemisia turcomanica) در تحقیقی بر ردهٔ سلولی سرطان پستان (MCF-7) و اثر آن بر بیان ژن‌های bcl2 و Bax انجام گردید. این پژوهش نشان داد که با افزایش غلظت و زمان، زنده‌مانی سلول‌ها کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه‌های کنترل داشتند (۱۰).

بررسی اثر اوژنول یک ترکیب شیمیایی عضو خانوادهٔ فنیل پروپانوئیدها و از اجزای اصلی روغن میخک بر بیان ژن‌های CASP8 و CASP9 در سلول‌های ردهٔ سرطان کولون HT-29 نشان داد که اوژنول احتمالاً اثر مهاری بر رشد، تکثیر و تهاجم سلول‌های ردهٔ سرطان کولون از طریق افزایش بیان ژن‌های CASP8 و CASP9 دارد و آپوپتوز را در سلول‌های دودمان سرطانی HT-29 القاء می‌کند و موجب کاهش خطر سرطانی شدن سلول‌های عادی می‌شود (۱۱).

عصارهٔ گیاه شبدر لرستانی (Trifolium cherleri) نیز سمیت سلولی وابسته به دوز بر ردهٔ سلولی A549 دارد و نتایج Real-Time PCR نشان دهندهٔ افزایش بیان ژن‌های آپوپتوزی CAS3 و CAS9 است (۱۲)؛ همچنین، با بررسی عصارهٔ متانولی برگ گیاه گز روغنی (Moringa oleifera) مشخص شد که این عصاره موجب بازدارندگی سلول‌های سرطان پستان (MCF7) با القای آپوپتوز از طریق تنظیم افزایش بیان ژن‌های Bax، p53 وCAS8 می‌گردد (۱۳).

در مطالعهٔ حاضر نیز همسو با مطالعات ذکرشده، عصارهٔ گیاه زیتون تلخ ظرفیت القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان بیضهٔTM4 داشت (۶۴). به‌طوری‌که، بر اساس این نتایج، احتمالاً افزایش بیان ژن کاسپاز ۸ می‌تواند موجب فعال شدن سایر کاسپازهای اجرایی در سلول شود و از این طریق، آپوپتوز را در سلول‌های سرطانی ردهٔ TM4 القا کند و از رشد و تکثیر این سلول‌های سرطانی جلوگیری نماید.

بر اساس یافته‌های این تحقیق، عصارهٔ گیاه زیتون تلخ به دلیل داشتن فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پتانسیل بالایی در از بین بردن سلول‌های سرطان بیضه دارد و با القای آپوپتوز و افزایش بیان ژن CAS8 می‌تواند به‌عنوان درمان مکمل در بهبود سرطان در نظر گرفته شود؛ بنابراین در کل می‌توان نتیجه گرفت که زیتون تلخ به‌عنوان دارو می‌تواند باعث افزایش بیان ژن‌های آپوپتوتیک مانند کاسپاز ۸ گردد و از این طریق، با القا

آپوپتوز می‌تواند باعث کاهش رشد سلول‌های سرطانی ردهٔ TM4 شود؛ بنابراین با انجام تحقیقات گسترده‌تر می‌توان از این گیاه به‌عنوان یک داروی ضدسرطانی قوی استفاده کرد.

## سپاس‌گزاری

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از گروه زیست‌شناسی دانشگاه دانش البرز که برای تحقیق و انجام این مطالعه همکاری داشته‌اند، تقدیر و تشکر به‌عمل آورند.

## تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

## حمایت مالی

تحقیق حاضر بدون حمایت مالی از طرف هرگونه مؤسسه یا سازمانی و تنها به وسیله هزینه‌های شخصی نویسنده مسئول صورت گرفته است.

## مشارکت نویسندگان

در این پژوهش، پیشنهاد پژوهش، انجام مواد و روش‌ها، مراحل آزمایشگاهی و اعتباریابی با مشارکت کبری توفیقی و نگار صادقی انجام شد. جمع‌آوری و تحلیل آماری داده‌ها، نگارش پیش‌نویس مقاله، اصلاحات و نهایی سازی توسط کبری توفیقی انجام گردید.

## References

1. de Vries G, Rosas-Plaza X, van Vugt MATM, Gietema JA, de Jong S. Testicular cancer: Determinants of cisplatin sensitivity and novel therapeutic opportunities. Cancer Treat Rev 2020;88:102054. doi: 10.1016/j.ctrv.2020.102054.
2. Ross RK, McCurtis JW, Henderson BE, Menck HR, Mack TM, Martin SP. Descriptive epidemiology of testicular and prostatic cancer in Los Angeles. Br J Cancer 1979;39:284-92. doi:10.1038/bjc.1979.53.
3. Dias MC, Pinto DCGA, Costa M, Araújo M, Santos C, Silva AMS. Phytochemical and Antioxidant Profile of the Medicinal Plant Melia azedarach Subjected to Water Deficit Conditions. Int J Mol Sci 2022; 23:13611. doi: 10.3390/ijms232113611.
4. Azarnia M, Kamyab S Z, Mirabolghasemi S G, Saeidnia S. Effect of hydroalcoholic extract of Melia azedarach L. seeds on serum concentration of sex hormones in polycystic ovary syndrome induced in female wistar rats. Feyz 2015; 19:111-17.
5. Ervina M. A review: Melia azedarach L. as a potent anticancer drug. Phcog Rev 2018; 12: 94-102. doi: 10.4103/phrev.phrev_41_17.
6. Diaz C, Purdy S, Christ A, Morot-Gaudry JF, Wingler A, Masclaux-Daubresse C. Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in Arabidopsis. A metabolic profiling approach. Plant Physiol 2005;138:898-908. doi: 10.1104/pp.105.060764.
7. Okoh SO, Asekun OT, Familoni OB, Afolayan AJ. Composition and antioxidant activities of leaf and root volatile oils of Morinda lucida. Nat Prod Commun 2011;6:1537-41. doi: 10.1177/1934578X1100601032.
8. Shakhseniaie M, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghirossadat F. Effect of Rosemary Essential Oil on BIM Apoptotic Gene Expression in MCF 7 Breast Cancer Cell Line. JSSU 2022; 30:4452-61. doi: 10.18502/ssu.v30i1.9100.
9. Nikoumanesh S, Asgharian A M. The Antioxidant and cytotoxic Effects of nettle-leaves (Urtica dioica L.) Ethanolic extract on the A549 cell line. NCMBJ 2017; 7:27-34.
10. Keshtmand Zahra, Seyede Narges Naimi, Ardeshir Hesampour. Anti-cancer effect of Artemisia turcomanica extract on breast cancer cell line (MCF-7). J Mol Biol 2023; 15: 47-54. doi.org/10.1016/j.nanoso.2023.101030.
11. Banitalebi Dehkordi M, Zia Jahromi N, Sazgar H. Study the Effect of Eugenol on CASP8 and CASP9 Gene's Expression in Colon Cancer Cell Lines HT-29. J Ilam Uni Med Sci 2019; 27:85-96. doi: 10.29252/sjimu.27.5.85.
12. Mirzaie A, Bagheri Kashtali A, Sahebjamee H, Noorbazargan H, Rahmati H, Sadat Shandiz S A. Phytochemical composition, antibacterial and anticancer activities of Trifolium cherleri extract on lung cancer cell line (A549) and analysis of caspase 3 and caspase 9 apoptosis genes expression. Tehran Univ Med J 2017; 75:343-9.
13. Mohd Fisall UF, Ismail NZ, Adebayo IA, Arsad H. Dichloromethane fraction of Moringa oleifera leaf methanolic extract selectively inhibits breast cancer cells (MCF7) by induction of apoptosis via upregulation of Bax, p53 and caspase 8 expressions. Mol Biol Rep 2021;48:4465-75. doi: 10.1007/s11033-021-06466-y.