

## بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گیاه *Lallemantia iberica* در بقاء و مهاجرت سلول های سرطان کولون روده

فاطمه علیزاده

کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش ژنتیک، دانشکده علوم دانشگاه آزاد مشهد، مشهد، ایران

Fatemehalizadeh15964528@gmail.com

### چکیده

گیاهان دارویی به عنوان درمان های مؤثر و مفید برای سرطان شناخته می شوند. حجم زیادی از مطالعات بالینی اثرات مثبت داروهای گیاهی بر بقای، مدیتیشن ایمنی و کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان گزارش شده است به همین منظور ما در این مطالعه از گیاه دارویی بالنگو استفاده کرده ایم این تحقیق به بررسی اثر بالنگو بر رده ی سلولی کولون به روش MTT پرداخته شد. سلول های سرطانی رده HT29 و رده سلول های نرمال hek ۶ فلاسک کشت داده شد. تست MTT انجام گردید. نتایج نشان داد با افزایش غلظت و زمان تعداد سلول های زنده کاهش پیدا کرد. سپس تاثیر ژن های 9 mmp2 و caspase 9 مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در گروه تیمار شده با عصاره بالنگو افزایش یافته است و نتایج ۲ و ۹ MMP در گروه تیمار شده MMP۲ بیان کاهشی دارد و ۹ MMP بیان افزایشی دارد. استخراج RNA بر روی سلول های متاثر از بالنگو انجام گرفت و در نهایت سنتز cDNA صورت گرفت. سپس PCR time Real انجام شد نتایج نشان داد که ماده موثره ی گیاه بالنگو به صورت وابسته به غلظت و زمان دارای خاصیت انتی اکسیدانی و فلانوییدی بر روی سلول سرطان کولون رده HT29 می باشد و همچنین سبب سمیت سلولی و القای آپوپتوزی بر روی سلول سرطان کولون رده HT29 می شود پس در درمان سرطان به عنوان یک ماده موثره شناخته می شود و دارای اهمیت فراوانی است

**کلید واژه ها:** سرطان کولون، رده HT29، گیاه بالنگو

## ۱- مقدمه

امروزه تعداد فزاینده ای از مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از محصولات طبیعی دارای اثرات ضد CRC موثر هستند و ممکن است به عنوان عوامل شیمی درمانی جایگزین برای درمان CRC عمل کنند. در این بررسی، ما محصولات طبیعی با اثرات ضد CRC از منابع مختلف را بر اساس ساختارهای شیمیایی مانند آلکالوئیدها، پلی ساکاریدها، پلی فنل‌ها، ترپنوئیدها، اسیدهای چرب غیراشباع خلاصه می‌کنیم و داروهای مشتق شده از محصولات طبیعی را که به صورت بالینی برای درمان سرطان کولورکتال استفاده می‌شوند، مورد بحث قرار می‌دهیم. وقوع و پیشرفت سرطان کولورکتال توسط ترکیبی از عوامل متعدد ایجاد می‌شود که در میان آنها سن، سابقه خانوادگی، جنسیت، منطقه و سابقه شخصی عوامل خطر اصلی هستند [Peng et al. 2018] و (Shen et al. 2018). اخیراً، اپیدمیولوژی پاتولوژیک مولکولی یک زمینه تحقیقاتی بین رشته‌ای که رابطه بین عوامل خطر (ژنتیک، سبک زندگی، الگوی غذایی، میکروبیوم و غیره) و ویژگی‌های مولکولی، وقوع، توسعه و پیش‌آگهی بیماری‌ها را آشکار می‌کند، عمدتاً مورد بررسی قرار گرفته است. برای مطالعات اپیدمیولوژیک در مورد سرطان به منظور ارائه بینش جدید و راهبردهای پیشگیری و درمان سرطان استفاده شد. تغییرات ژنتیکی از جمله بی‌ثباتی ریزماهواره MSI، جهش‌های BRAF، جهش‌های PIK3CA، جهش‌های KRAS و فنوتیپ متیلاتور جزیره‌ای CpG، عوامل اصلی مرتبط نزدیک با توسعه CRC هستند. [Ogino et al. 2011] و (Yamauchi et al. 2012). اخیراً، از دست دادن SMAD4 به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی امیدوارکننده برای بیماران CRC شناسایی شده است، زیرا ارتباط قابل توجهی با پیامدهای بالینی بدتر، مقاومت شیمیایی و کاهش انفیلتراسیون ایمنی دارد (Wasserman et al. 2019). مطالعات قبلی نشان داده است که سیگار کشیدن و چاقی از عوامل خطر CRC هستند. با این حال، مطالعات MPE نشان داده است که سیگار یک عامل خطر برای زیرگروه CRC با فنوتیپ متیلاتور جزیره CpG یا MSI بالا است، در حالی که چاقی یک عامل خطر برای زیرگروه CRC غیر MSI بالا است [Ogino et al. 2013] و (Suzuki et al. 2014). الگوی غذایی نیز یک عامل مهم در CRC است. مشخص شده است که دریافت کلسیم با خطر CRC نسبت معکوس دارد. عملکرد کلسیم در پیشگیری ایمنی از CRC با تنظیم عملکرد سلول [Zhang et al. 2016] و (Keum et al. 2014) و (Yang et al. 2019). با این حال، مشخص شده است که مصرف الکل خطر ابتلا به زیرگروه‌های جهش یافته CRC KRAS-wild/BRAF-wild و KRAS را افزایش می‌دهد (Jayasekara et al. 2017). Fusobacterium nucleatum یک میکروارگانیسم بیماری‌زا است که در ایجاد و پیش‌آگهی CRC نقش دارد [Yamaoka et al. 2018] و (Hamada et al. 2019). مطالعات فشرده مبتنی بر مکانیسم نشان داده است که با تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مانند مسیر E-cadherin/ $\beta$ -catenin و در متاستاز CRC نقش سرطان‌زایی دارد [Rubinstein et al. 2013] و (Bullman et al. 2017). مطالعات MPE همچنین نشان داده است که آسپرین می‌تواند خطر و مرگ و میر بیماران را در زیرگروه CRC مثبت PTGS2 کاهش دهد، اما نه زیرگروه CRC PTGS2 منفی (Benelli, Venè and Ferrari 2018). علاوه بر این، در مقایسه با زیرگروه PI3KCA-wild، آسپرین برای اعمال اثر ضد سرطانی قوی در برابر زیرگروه CRC جهش یافته با PI3KCA تأیید شده است [Gu et al. 2017] و (Liao et al. 2012).

سرطان یکی از بیماری‌هایی است که تلاش زیادی برای عوامل ایجاد کننده آن و همچنین درمان آن به عمل آمده است. سرطان زمانی ایجاد می‌شود که سلول‌های طبیعی در یک بخش خاص از بدن شروع به رشد خارج از کنترل می‌کنند. تمام انواع سلول‌های سرطانی همچنان به رشد، تقسیم و تقسیم دوباره می‌پردازند و سلول‌های غیرطبیعی جدید را تشکیل می‌دهند. به طور کلی سلول‌های سرطانی به علت آسیب DNA از سلول‌های طبیعی تولید می‌شوند. اغلب زمانی که DNA آسیب ببینند، بدن قادر است آن را تعمیر کند، متأسفانه در سلول‌های سرطانی، DNA آسیب دیده اصلاح نمی‌شود. افراد همچنین می‌توانند DNAهای آسیب دیده را از والدین به ارث برده، و استعداد به ابتلای سرطان را به ارث ببرند. تحقیقات نشان داده است که عوامل مختلف مثل

جهش، اشتباه در همانندسازی DNA، نوترکیبی و یا جابه جایی های کروموزومی، تغییرات نا به جای اپی ژنتیکی و غیره با ایجاد تغییراتی در DNA سلول باعث ایجاد سرطان می شوند. بیشتر این تغییرات باعث افزایش فعالیت انکوژن ها از جمله c myc و ras و کاهش فعالیت ژن های سرکوب کننده تومور (از جمله PTEN و P53) و همچنین کاهش فعالیت ژن های Bax و Caspases دخیل که در مرگ برنامه ریزی شده سلول apoptosis می شوند سرطان به طور کلی به عنوان یک تومور سفت شکل می گیرد. بعضی از سرطانها مانند لوسمی (سرطان خون) تومور تشکیل نمی دهند. سلول های سرطان دارای ویژگی هایی هستند که می تواند آنها را از سلول های طبیعی متمایز کند. یکی از تفاوت های مهم این سلول ها عملکرد غیر تخصصی آنها نسبت به سلول های طبیعی است. این بدان معنی است که در حالی که سلول های طبیعی به انواع سلول های متفاوتی با عملکرد اختصاصی بلوغ میابند، سلول های سرطانی این توانایی را ندارند. این یکی از دلایلی است که باعث می شود برخلاف سلول های طبیعی، سلول های سرطانی بدون توقف به تقسیم ادامه دهند. شکی نیست که استفاده از MPE برای مطالعه سرطان استراتژی دقیق تر و موثرتری برای پیشگیری و درمان CRC ارائه می دهد.

درمان های مرسوم برای CRC شامل جراحی و شیمی درمانی است. شیمی درمانی می تواند با القای آسیب DNA یا آغاز مسیرهای سیگنال دهی متعدد، از جمله توقف چرخه سلولی، مهار ترجمه جهانی، ترمیم DNA، و غیره منجر به مرگ سلول سرطانی شود (Woods, 2013, Turchi and therapy). با این حال، همانطور که بسیاری از مطالعات، از جمله مطالعات MPE نشان داده اند، نتیجه درمان داروهای شیمی درمانی در بیماران CRC با نوع فرعی سرطان متفاوت است. اثرات سمیت سلولی، مقاومت دارویی و عوارض جانبی مشکلات اصلی مرتبط با شیمی درمانی هستند. (Huang et al. 2019). بنابراین در این مطالعه با توجه به تاثیر گیاه بالنگو بر از بین بردن سلول های سرطانی به بررسی و تاثیرات آن پرداخته شده و در ادامه نتایج و پیشنهاداتی ارائه شده است.

### روش تحقیق

#### جدول ۳-۱ مواد آزمایشگاهی مورد استفاده در مطالعه حاضر

کشور	شرکت سازنده	موارد مصرفی
Iran	Bioidea	محیط کشت RPMI
Iran	Mahboub Bio Research	کیت AnnexinV-FITC
USA	Sigma	DAPI staining
USA	Sigma	MTT
France	CARLO ERBA	DMSO
USA	GIBCO	FBS
USA	Sigma	PBS
Iran	Bioidea	Penicillin-streptomycin
Iran	Bioidea	Trypsin
Iran	Taghtir Khorasan	الکل
Iran	Prs tous	کیت استخراج RNA
Iran	Prs tous	کیت سنتز cDNA
Iran	Bioidea	محلول Trypan Blue

**۲-۳ دستگاهها****جدول ۲-۳ دستگاههای مورد استفاده در مطالعه حاضر**

کشور	شرکت سازنده	موارد مصرفی
Germany	Memmert	انکوباتور CO2 دار
Germany	Sigma	دستگاه سانتریفیوژ
Germany	Sigma	دستگاه میکرو سانتریفیوژ
Germany	BEL	میکروسکوپ معکوس
Japan	Olympus	میکروسکوپ فلورسنت
Italy	KW	یخچال ۴ درجه سانتی گراد
Italy	KW	فریزر ۲۰- و ۸۰- درجه
Iran	JAL Taghiz	هود لامینار
China	BIOER	ترموسایکلر
USA	Bio-Rad	Real Time PCR
Korea	SPL	فالكون ۱۵ و ۵۰ میلی لیتر
China	JAT Biofil	پلیت ۶ و ۹۶ خانه
Germany	BIOER	سمپلرز ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر
China	Maxwell	سرسمپلر کریستالی، زرد، آبی
Korea	SPL	فلاسک کشت

**۳-۳ تهیه ردهی سلولی**

در این مطالعه از رده های سلولی سرطانی HT29 و سلول های نرمال HEK کشت استفاده گردید این سلول ها از انستیتو پاستور تهران تهیه گردید.

**۴-۳ تهیه محیط کشت کامل**

برای تهیه ی محیط کشت کامل به ۱۰ درصد FBS و ۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی سیلین، استرپتومایسین) و محیط کشت DMEM اضافه کرده و بعد از فیلتر کردن در فالكون های ۵۰ میلی لیتری در یخچال نگهداری شد.

**۵-۳ روش فریز نمودن سلول ها**

سلول های در حال رشد از نظر سلامت و عدم الودگی بررسی شده و سلول هایی که در مرحله رشد لگاریتمی بودند برای انجماد انتخاب شدند سلول ها را به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰۰ دور سانتریفیوژ کرده و بعد از حذف مایع رویی سلول ها به محیط انجماد که دارای ۹۰ درصد FBS و ۱۰ درصد DMSO به نسبت ۱۰ به ۱۰ اضافه گردید و برچسب حاوی اطلاعات (نام سلول، نام فرد فریز کننده و تاریخ) بر روی کرایو تیوپ نصب گردیده هر میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی به یک کرایو تیوپ منتقل شده و به مدت یک ساعت در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته و سپس ۲۴ ساعت در فریزر منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگه داری شد و سپس به تانک ازت منتقل شد.

**۶-۳ کشت سلول های ذخیره شده**

پس از خروج کرایو تیوپ حاوی سلول از تانک ازت و ذوب شدن آن در بن ماری ۳۷ درجه محتویات آن به داخل لوله فالكون که دارای محیط کشت است تخلیه گردید سپس محیط DMEM فاقد FBS به لوله ی فالكون اضافه گردید و بعد به مدت ۵ دقیقه

در ۱۰۰۰ دور در دقیقه در سانتریفیوژ قرار گرفت محتویات رویی دور ریخته و سلول های ته نشین شده در ۱ تا ۲ میلی لیتر محیط کشت کامل سوسپانسیون شد. سوسپانسیون به فلاسک حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت کامل انتقال داده شد سپس فلاسک به انکوباتور منتقل شد و پس از رشد سلول ها و رسیدن به پوشش ۷۰ درصدی و اطمینان از عدم آلودگی مراحل پاساژ سلولی انجام گردید.



شکل ۳-۱ انکوباتور CO<sub>2</sub> دار مورد استفاده در آزمایشگاه

### ۳-۷ پاساژ سلولی

پس از خارج کردن سلول ها از انکوباتور در زیر هود لامینار محیط روی سلول خارج شد و پس از شست شو سلول ها با PBS مجدد محلول روی سلول خارج شد و مقدار ۲ میلی لیتر PBS به فلاسک اضافه شد سپس برای جداسدن سلول ها از سطح فلاسک انزیم تریپسین به مقدار ۲.۰ میلی لیتر به سوسپانسیون اضافه شدو به مدت ۳ تا ۵ دقیقه وداخل انکوباتور قرار گرفت سپس سلول ها را توسط میکروسکوپ اینورت مشاهده شد درصورت جدا شدن سلول ها از سطح فلاسک ، فلاسک به زیر هود لامینار انتقال دادیم و به ان ۵.۰ میلی لیتر محیط کشت برای خنثی کردن تریپسین اضافه گردید سپس محلول را به فالکون ۱۵ میلی لیتر انتقال داده و به مدت ۳ دقیقه با ۱۷۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ قرار گرفت سپس فالکون را به زیر هود انتقال داده و پس از حذف محلول رویی به سلول ها به مقدار ۱ میلی لیتر محیط کشت کامل اضافه گردید و سوسپانسیون باید سمپلر شود و در نهایت به ۲ یا ۴ فلاسک سوسپانسیون انتقال داده شد و در انکوباتور نگهداری گردید.



شکل ۳-۲ هود لامینار مدل کلاس II مورد استفاده در آزمایشگاه

**۳-۸ اضافه کردن ماده‌ی موثره به محیط کشت (تیمار کردن)**

ابتدا غلظت‌های از ماده موثره‌ی مورد نظر ساخته شد سپس این غلظت‌های مختلف به سلول‌های کشت داده شده در پلیت ۹۶ خانه اضافه گردید تا از طریق رنگ آمیزی MTT غلظت موثره بالنگو با محاسبه درصد زنده ماندن سلول مشخص شود.

**۳-۹ بررسی درصد زنده ماندن سلول‌ها به روش آزمون رنگ سنجی با روش تریپان بلو و MTT**

غشای سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ‌های غیر الکترولیت به درون سلول را نمیدهند اما سلول‌های مرده به خوبی رنگ میگیرند. جهت بررسی زنده ماندن سلول‌ها ۱۰۰ میلی لیتر از سوسپانسیون سلولی با یک ۰۰۱ میلی لیتر از محلول تریپان بلو در یک حفره از پلیت ۹۶ خانه مخلوط شده اضافه گردید سپس توسط یک لام نیوبار تعداد سلول‌های رنگ گرفته و رنگ نشده تعیین شدند MTT روش ساده ای برای بررسی تعداد سلول‌ها میباشد تعیین میزان رشد سلول‌ها یکی از پر کاربرد ترین موارد در بررسی تاثیر مواد مختلفی مانند داروها بر سلول میباشد تست MTT یکی از روش‌های غیر رادیو اکتیو می‌باشد که به طور معمول مورد استفاده قرار گرفته است اساس این روش برشکست نمک تترازولیوم زرد رنگ به کریستال فورمازان بنفش در سلول‌های فعال میباشد سپس توسط جذب نوری 570nm خوانده شد و سپس نسبت جذب مورد آزمایش به جذب نمونه کنترل، نشان دهنده میزان زنده ماندن سلول‌ها میباشد در این روش نسبت میانگین جذب نمونه تست به میانگین جذب نمونه شاهد (بدون تیمار) که در صد زنده مانده سلولی آن ۱۰۰ در نظر گرفته میشود برابر در صد زنده ماندن سلولی نمونه تست می‌باشد و پایین بودن آن از ۵۰ درصد به عنوان سمیت سلولی قلمداد میشود.

**۳-۱۰ شمارش سلولی**

به وسیله لام نئوبار انجام شد از سوسپانسیون سلول‌ها حجم معینی برداشته و در زیر لام سنگی نئوبار تخلیه شد سلول‌هایی که در چهار مربع بیرونی قرار گرفت شمارش شد و میانگین آن گرفته شد برای مشخص شدن درصد سلول‌های زنده به آنها رنگ تریپان بلو اضافه گردید سلول‌های زنده اجازه ورود رنگ را به درون سلول نمیدهند در عوض سلول‌های مرده رنگ را جذب میکنند.

**۳-۱۱ مراحل شمارش سلولی**

- ۱\_ ابتدا سوسپانسیون سلولی به حجم ۱ میلی لیتر تهیه گردید.
- ۲\_ حدود ۱۰ میکرولیتر از تریپان بلوی ۰۰۴ درصد برداشت شد و همچنین همین مقدار از سوسپانسیون سلولی را در داخل پلیت ۹۶ خانه ریخته و پیتاژ گردید.
- ۳\_ حدود ۱۰ میکرولیتر از محلول را روی لام نئوبار قرار داده و به زیر میکروسکوپ نوری قرار گرفت.
- ۴\_ تعداد سلول‌های زنده را شمارش کرده و میانگین آن گرفته شد
- ۵\_ تعداد کل سلول‌های زنده در ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون از رابطه زیر به دست می‌آید:  

$$10000 \times (2) \times \text{ضرب رقت} \times (1) \times \text{ضرب حجمی} \times \text{تعداد سلول‌های زنده} = \text{تعداد کل سلول‌های زنده}$$



شکل ۳-۳ لام نیوبار شمارش سلولی

### ۱۲-۳ تعیین دوز مهاری ترکیبات IC50 بر روی سلول‌ها

میزان IC50 غلظتی از دارو است که ۵۰ درصد رشد سلول‌ها را نسبت به کنترل مهار میکند این مقدار و مقادیر بالاتر از آن به عنوان دوزهای سمی داروهای ضد سرطان شناخته میشود در درمان سرطان تلاش میشود از داروهایی استفاده شود که کمترین آسیب را به سلول‌های سالم وارد کند و بهترین تاثیر را بر مهار سلول‌های سرطانی داشته باشد رایج ترین روش اندازه گیری IC50 توسط رنگ آمیزی MTT و آزمون دفع رنگ تریپان بلو و لام نئوبار میباشد. پس از اندازه گیری جذب نوری IC50 در بازه زمانی محاسبه و نمودار آن رسم شد و نتایج حاصل به صورت درصد بقای سلول گزارش شدند درصد بقای سلول به صورت زیر محاسبه میشود

$$100 \times \text{جذب نوری کنترل} / \text{جذب نوری تست} = \text{میزان بقای سلول}$$

### ۱۳-۳ نحوه تهیه عصاره هیدرو الکلی

ابتدا ۱۰۰ گرم از پودر آسیاب شده دانه تمیز بالنگو با ترازوی دیجیتال توزین گردید، پودر توزین شده درون ارلن مایر ریخته شد و ۵۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰٪ تا سطح پودر را کاملا بپوشاند و درب آن توسط فویل آلومینیومی بسته شد، مخلوط حاصل به مدت ۴۸ ساعت بر روی شیکر با شدت ۱۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. سپس عصاره توسط فیلتر پارچه ای از تفاله جدا و توسط قیف بوختر از کاغذ صافی عبور داده شد. عصاره توسط سیستم خلا در دمای ۳۸ درجه سانتیگراد جداسازی شد و پس از آن عصاره غلیظ حاصله را در پلیت شیشه ای در بسته ریخته و با فویل آن را پوشانده و در آن ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت قرار داده شد تا کاملا خشک گردید.

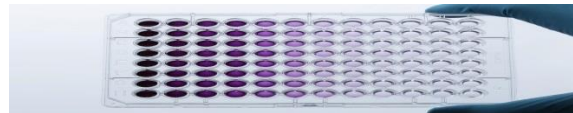
### ۱۴-۳ روش انجام تست MTT

برای انجام تست MTT ابتدا به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه محیط کشت را اضافه کرده و پس از تریپسینه کردن سلول‌ها درون فلاسک و سانتریفیوژ کردن و با رنگ آمیزی تریپان بلو و لام نئوبار شمارش سلولی انجام گرفت و پس از محاسبه تعداد سلول‌ها در هر چاهک از پلیت حدود ۱۰<sup>۴</sup> سلول کشت داده شد و در انکوباتور قرار گرفت پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها برای تست ۷۲ ساعت تیمار گردید و سلول‌ها را برای کشت ۴۸ ساعت کشت داده و مجدد پلیت داخل انکوباتور قرار میگیرد بعد از ۲۴ ساعت سلول‌های کشت داده شده را تیمار کردیم و سلول‌های جدید برای ۲۴ ساعت کشت داده میشود بعد از ۲۴ ساعت آخرین روز تیمار شد و پلیت داخل انکوباتور قرار میگیرد پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها برای میزان سمیت سلولی مورد سنجش قرار گرفت پس از اتمام تیمار سلول محلول رویی حذف شده و ۱۰۰ لاندا RPMI1640 بدون فنول رد به هر چاهک اضافه شد سپس ۱۰ لاندا از MTT به هر چاهک اضافه میشود و پلیت برای ۴ ساعت درون انکوباتور قرار میگیرد سپس بعد از اتمام تایم به هر چاهک ۱۰۰ لاندا DMSO یا

ایزوپروپانول به هر چاهک اضافه شد پس از ۱۰ دقیقه در دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر تست خوانده شد میزان توکسیسیتی ایجاد شده با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد سمیت سلولی} = 1 - \frac{\text{میانگین جذب مواد سمی / میانگین جذبی کنترل منفی} \times 100}{\text{درصد زنده ماندن} - 100} = \text{درصد سمیت سلولی}$$

جهت کم کردن میزان خطای آزمایش داخل چند چاهکی که بدون سلول است مقدار رنگ MTT اضافه گردید سپس شستشو داده شد و همراه با دیگر چاهکها جذب نوری آنها گرفته شد و در نهایت از تمام جذبها کم گردید تعداد سلولهای درون چاهکها نباید بیشتر از  $10^4$  سلول باشد زیرا پس از گذشت ۷۲ ساعت تعداد سلولها زیاد شده و سلولها دچار مرگ میر میشوند نتایج بر اساس میانگین و انحراف معیار با استفاده از SPSS و تست اماری one\_way anova و tukeys\_test بررسی شد



شکل ۳-۴ تست MTT پلیت ۹۶ خانه

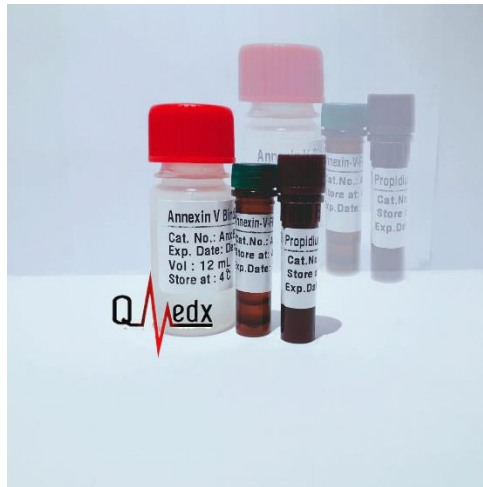
### ۱۵-۳ بررسی القای آپوپتوز به وسیله رنگ آمیزی Annexin و PI

Annexin V در حضور یون کلسیم تمایل زیادی به اتصال به فسفاتیدیل سرین دارد و به همین دلیل می تواند به عنوان یک نشانگر برای آپوپتوز مورد استفاده قرار گیرد فسفاتیدیل سرین در سطح سلول از نشانه اولیه آپوپتوز است در طول فرایند آپوپتوز فسفاتیدیل سرین از سطح سیتوپلاسمی غشای پلاسمایی به سطح خارج سلولی تغییر مکان می دهد که این عمل به خاطر اختلال در آنزیم ترانس لوکاز وابسته به ATP و یا فعال شدن سیستمهای آنزیمی دیگر می باشد قرار گرفتن فسفاتیدیل سرین در لایه خارجی یک سیگنال طبیعی ایجاد می کند تا سلولهای آپوپتیک توسط ماکروفاژ و بقیه سلولها شناسایی شد و فاگوسیته شدند. بررسی آپوپتوز توسط فلوسایتومتری انجام شد فلوسایتومتری روشی است که طی آن جریانی یکنواخت و خطی از سلولها در حضور ماده نشاندار فلورسانس در مجرای خوانش دستگاه قرار می گیرد و توسط تابش نور لیزر تحریک می شوند فلوسایتومتر می تواند سه نور نشری را ثبت کند. پارامترهایی که اندازه گیری می شود شامل: پراش جانبی، پراش مستقیم و نشر فلورسانس فلوئورکروم مورد استفاده فلوئورسین ایزوتیوسیانات است که در کانال سبز ثبت می شود و PI که رنگ اختصاصی DNA است در کانال قرمز یا نارنجی ثبت می گردد خروجی نتایج شامل منحنی پراش جانبی و پراش مستقیم جهت تعیین حدود اندازه سلولی و نحوه توزیع آنها و همچنین منحنی FL1 و FL2 جهت تعیین مربعات چهارگانه که شامل موارد زیر است:

سلولهای آپوپتوزی اولیه	سلولهای نکروزی
درصد هر مربع نسبت به کل محاسبه می شود	سلولهای زنده

Annexin V یک نشانگر حساس برای سطح سلولهای آپوپتیک است که فسفاتیدیل را در سطح خود بیان می کنند و PI یک نشانگر برای افتراق بین سلولهای نکروزی از آپوپتوزی می باشد که هسته سلولها را رنگ می کند.





شکل ۳-۵ کیت Annexin مورد استفاده در تحقیق

### ۳-۱۶ روش کار

۱-  $5 \times 10^6$  سلول HT29 در هر لوله ریخته شد و Binding Buffer 1X به حجم ۵۰۰ میکرولیتر رساندیم در ابتدا برای حذف محیط سلول را با PBS شستشو داده شد برای جلوگیری از همپوشانی رنگ PI با FTTC باید از ۴ لوله استفاده کرد، یک لوله بدون رنگ، یک لوله حاوی Annexin V-FTTC و یک لوله حاوی رنگ PI و لوله آخر دارای هر دو رنگ FTTC و PI می باشد.

۲- لوله اول که فاقد رنگ است را در یخچال نگه داده شد.

۳- به لوله دوم و چهارم ۵ میکرولیتر حاوی Annexin VFTC اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه و در تاریکی انکوبه شد.

۴- پس از اتمام زمان انکوباسیون لوله ها را با ۱ میلی لیتر Binding Buffer 1X و در ۱۵۰۰ دور به مدت ۵ دقیقه سانترفیوژ گردید و محلول رویی حذف و ۵۰۰ میکرولیتر Binding Buffer 1X اضافه گردید.

۵- در زمان خوانش سلول ها به لوله سوم و چهارم ۳ میکرولیتر PI اضافه گردید.

۶- در نهایت محتویات هر اپندروف به لوله های مخصوص فلوسایتومتری منتقل شدند و در دستگاه فلوسایتومتری بر اساس دو رنگ PI و Annexin مورد آنالیز قرار گرفتند.

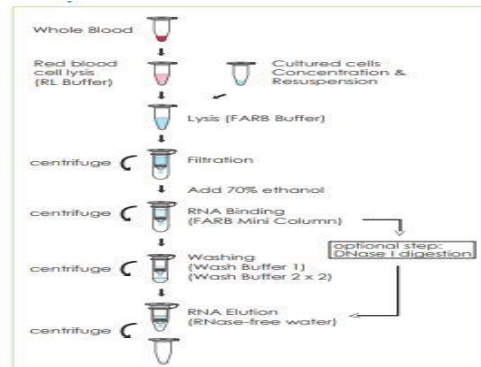
نکته ۱: تمام مراحل دو بار در زمان ۴۸ ساعت تکرار شدند.

نکته ۲: سلول های HT29 تیمار نشده به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند و دو چاهک برای هر غلظت در نظر گرفته شد.

### ۳-۱۷ مراحل استخراج RNA

در مرحله اول محیط رویی جمع آوری شد و در داخل این روف قرار گرفت ۳۰۰ تا ۴۰۰ میکرولیتر تریپسین در سطح سلول ها به آرامی ریخته شد تا سلول ها از سطح فلاسک جدا شود سپس توسط محیط رویی که قبلا جدا شده بود تریپسین خنثی گردید سپس داخل سانترفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۲۰۰۰ دور سانترفیوژ قرار گرفت محیط رویی اوت شد و ۷۵۰ میکرولیتر RL solution روی سلول ها ریخته شد که سبب تخریب غشا سلولی می شود و سپس خوب پیپیتاژ شد سپس ۵ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و بعد از آن ۱۵۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه شد سپس خوب پیپیتاژ گردید سپس ۳ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت سپس به مدت ۱۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در سانترفیوژ یخچال دار دمای ۴ درجه سانتیگراد قرار گرفت بعد از آن ۳ تا فاز تشکیل شد که فاز اولی RNA ما میباشد RNA را داخل این روف قرار دادیم به همان مقدار RNA مقدار اتانول اضافه گردید و

خوب پیپیتاژ شد سپس به spin column انتقال داده شد داخل سانترفیوژ کوچک به مدت ۱ دقیقه در ۱۰۰۰ دور قرار گرفت مایع زیری خارج شد سپس ۷۰۰ میکرولیتر PW اضافه شد سپس ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانترفیوژ انجام شد و دوباره مایع زیری خارج شد سپس دوباره ۵۰۰ میکرولیتر PW اضافه گردید و سانترفیوژ انجام شد تا خلوص RNA افزایش پیدا کند هرچی مایع زیر آن جمع شده بود حذف کرده و در این مرحله چیزی اضافه نشد سپس ۲ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانترفیوژ انجام شد در مرحله آخر فیلتر را انتقال داده به داخل این روف و سپس ۳۵ میکرولیتر DEPC اضافه گردید و سپس ۳ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و بعد از آن به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور سانترفیوژ انجام شد و در آخر در فریزر ۷۰- قرار داده شد.



شکل ۳-۶ مراحل استخراج RNA

### ۱۸-۳ Real Time PCR

تکنیکی است که به طور گسترده در بررسیهای کمی بیان ژن به کار میرود. PCR time-Real همچنین روشی بسیار حساس در تعیین تعداد ویروسهای در داخل نمونه مورد نظر می باشد. کاربردهای زیاد در زمینههای مختلف همچون کلون کردن ژن، نقشه برداری ژنی، تشخیص جهشها، توالی یابی DNA و تعیین هویت افراد داشته است. آزمایش PCR همچنین میتواند در سنجش میزان بیان ژنها مورد استفاده قرار گیرد. در روش PCR time-Real نیاز به این دستکارها برطرف شده است و همین موضوع از مزایای این تکنیک است و خطر آلودگی را نیز بسیار کاهش می دهد ویژگی کلیدی PCR time-Real، فراهم شدن امکان بررسی تکثیر قطعات میباشد. این تکنیک در تستهای مختلف تشخیصی، جای PCR عادی را گرفته است.

مراحل PCR:

- 1) Baseline region: در این مرحله تیپ گونه نوری قابل رویت نیست
  - 2) Exponential phase: محصول دو رشته ای در هر چرخه دو برابر می شود و رشد تصاعدی مربوط به واکنش آغاز می شود
  - 3) The phase liner: ترکیبات واکنش و کارایی آنها روبه اتمام است.
  - 4) the phase plateau: ترکیبات واکنش از بین می روند و افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی شود
- بررسی میزان بیان ژنهای caspase3/9 و MMP2/9 با استفاده از روش کمی سنجی PCR Time-Real انجام گرفت. محلول واکنش، Master mix میکرولیتر ۵/۱۲: شامل Real-Time PCR ۱ میکرولیتر cDNA، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر و ۵/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه فاقد نوکلئاز بود. همچنین برنامه حرارتی برای تکثیر هر دو ژن شامل: واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۱۰ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه شامل: واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، به مدت ۲۰ ثانیه؛ اتصال پرایمرها به DNA الگو ۶۲ درجه سانتیگراد، به مدت ۴۰ ثانیه و طویل شدن رشته الگو در ۷۲ درجه سانتیگراد، به مدت ۳۰ ثانیه صورت گرفت. پس از انجام واکنش تکثیر، دادههای خام به صورت Ct (cycle Threshold) از دستگاه استخراج گردید. در

پایان، برای محاسبه نسبی تعداد نسخه mRNA تکثیرشده، از روش مقایسه میزان تغییرات سطح آستانه هر ژن Ct با میزان آن در نمونه شاهد  $\Delta\Delta Ct$  استفاده شد.



### شکل ۳-۷-۲ Real Time PCR Bio-Rad USA

#### ۳-۱۹ تست خراش یا scratch

تست scratch یکی از تست‌های پرکاربرد در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی سلولی و مولکولی می‌باشد. این تکنیک به جهت بررسی سرعت و میزان مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی انجام می‌گیرد. در این تست پس از تشکیل تک لایه ای از سلول‌های سرطانی خراشی بر روی سلول‌ها ایجاد شد و از محل خراش در ساعت‌های مشخصی توسط میکروسکوپ دوربین دار عکس برداری شد. پس از تکمیل تست میزان مهاجرت و متاستاز سلول‌های سرطانی توسط نرم افزارهای آماری آنالیز شد از این تست برای بررسی اثر داروها و مواد شیمیایی مختلف در جهت بررسی میزان مهار مهاجرت سلول‌های سرطانی استفاده شد که می‌تواند تایید کننده اثر مثبت دارو در درمان سرطان می باشد

#### ۳-۲۰ رنگ آمیزی DAPI

DAPI به نقاط غنی از آدنین و تایمین در ساختار DNA متصل می‌شود و دارای رنگ فلورسانت می‌باشد از آن جا که DAPI می‌تواند از طریق یک غشای سلولی دست نخورده عبور کند، میتوان از آن برای رنگ آمیزی سلول‌های زنده و فیکس شده استفاده کردیم و میتوان از آن به عنوان یک نشانه گر استفاده کرد و این تست جهت تایید سایتوتکسیک و انتی پرولیفراتیو عصاره مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت

ابتدا سلول‌ها را کشت دادیم و بعد از رشد کردن سلول‌ها و رسیدن به تراکم مناسب تقریباً ۷۰ تا ۸۰ درصد، محیط کشت را خالی و سپس دو بار به وسیله PBS شستشو گردید.

به منظور فیکس کردن سلول‌ها ۳۰۰ تا ۴۰۰ لانداز پارا فرمالدهید ۲ تا ۴ درصد را به هر ول اضافه گردید و برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه کردیم و سپس سلول‌ها را دو بار با PBS شستشو گردید.

به هر ول ۳۰۰ تا ۴۰۰ لانداز بلاکینگ بافر (شامل سرم بز یا سرم میمون با غلظت ۱۰ درصد و ترائیتون با غلظت ۳/۰ درصد) اضافه و برای مدت ۴۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه قرار گردید.

سلول‌ها را بوسیله PBS شستشو گردید.

آنتی بادی اولیه را در غلظت مناسب آماده گردید و مقدار مناسبی از آن را به هر ول اضافه گردید و سپس برای مدت ۲ تا ۳ ساعت در دمای اتاق یا یک شب در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه قرار گرفت و بعد از این مدت با PBS شستشو گردید.

آنتی بادی ثانویه متصل به فلوروکروم را با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده رقیق گردید سپس در تاریکی به هر ول مقدار مناسبی اضافه گردید و برای مدت یک ساعت در تاریکی انکوبه قرار گرفت بعد از آن با PBS شستشو گردید.

۳۰۰ لانداز محلول DAPI رقیق شده را به هر ول اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه قرار گرفت و سپس با PBS شستشو گردید.

سلول ها را زیر میکروسکوپ فلورسنس مشاهده گردید.

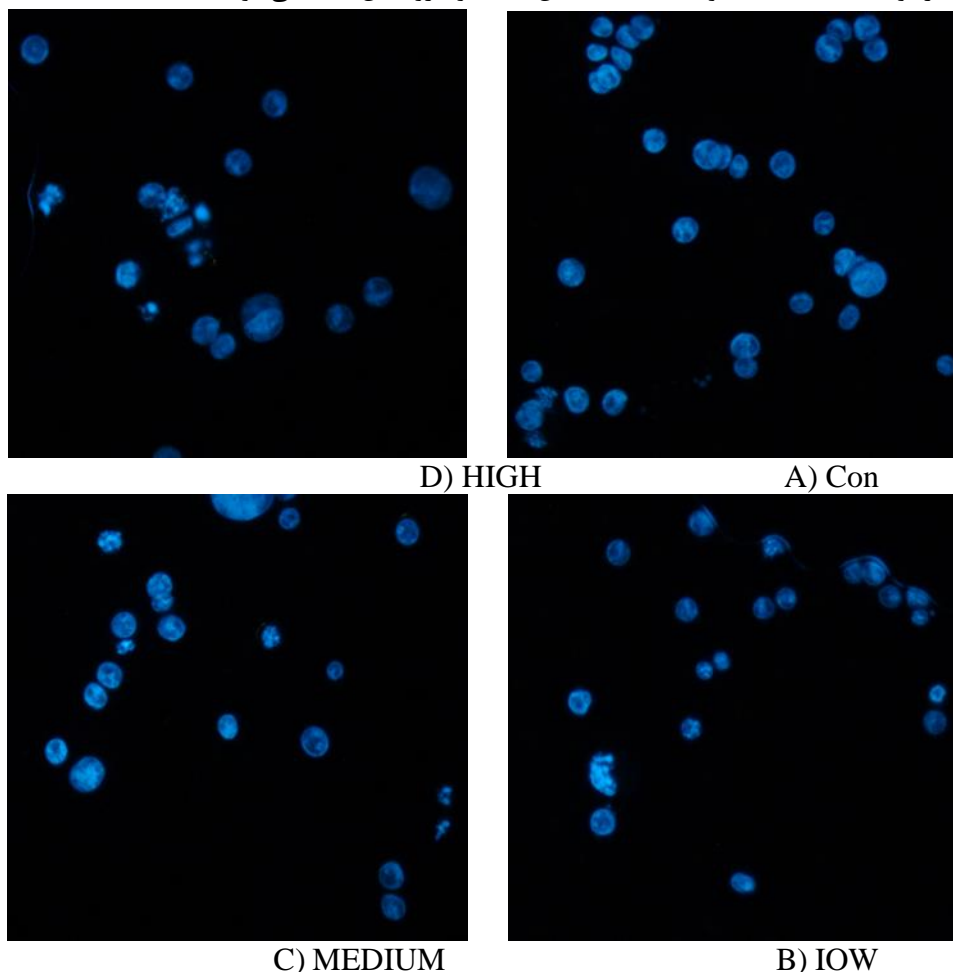
### ۳-۲۱ روش ها و ابزار تجزیه و تحلیل داده ها

داده ها توسط نرم افزار SPSS و آزمون های آماری مناسب نظیر ONOVA way\_one و همچنین آزمون تعقیبی Tukey در سطح  $P >$  تحلیل شد نمودارها با استفاده از نرم افزار Eaxcel رسم شده اند برای حصول اطمینان از نتایج این پژوهش در درمان استفاده می شود. تجربی تماما آزمایشات به صورت ۳ بار تکرار انجام شدند.

یافته ها

### ۴-۷ نتایج حاصل از رنگ آمیزی DAPI

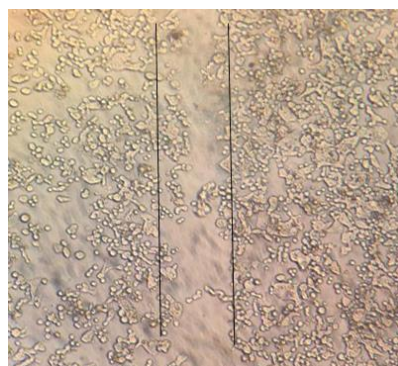
شکل ۴-۱ نتایج تست DAPI را در مدت زمان ۲۴ ساعت نشان می دهد همان طور که در شکل دیده می شود در غلظت های بالاتر تیمار توسط دانه گیاه بالنگو قطعه قطعه شدن هسته و کروماتین دیده می شود



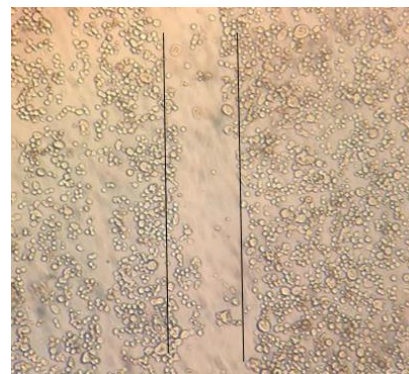
شکل ۴-۱: نتایج تست DAPI تحت تاثیر غلظت های کم و زیاد و متوسط از گیاه بالنگو. نمونه کنترل را نشان می دهد. از تاثیرات تیمار می توان به قطعه قطعه شدن هسته و تغییرات کروماتین اشاره کرد.

#### ۸-۴ SCRATCH TEST (مهاجرت سلولی):

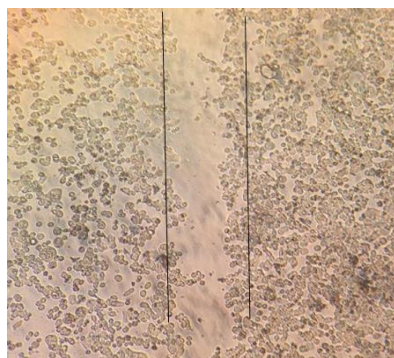
شکل ۴-۲ نتایج تست خراش را در میزان مهاجرت سلول های HT29 نشان می دهد. هرچه غلظت ماده موثر بیشتر می شود میزان مهاجرت و تکثیر سلولی کمتر می شود. در ناحیه کنترل به طور کامل ناحیه خراش داده شده از سلول ها پر شده است



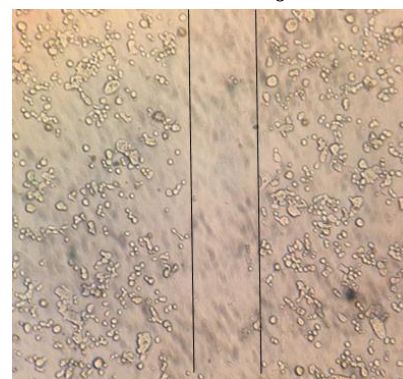
CONT



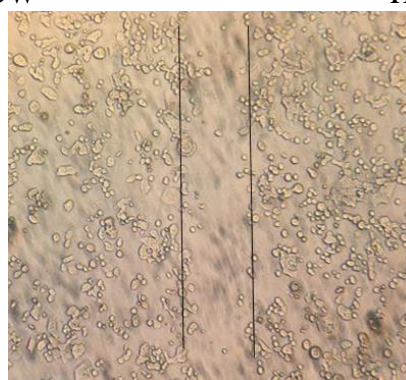
0



LOW



HIGH



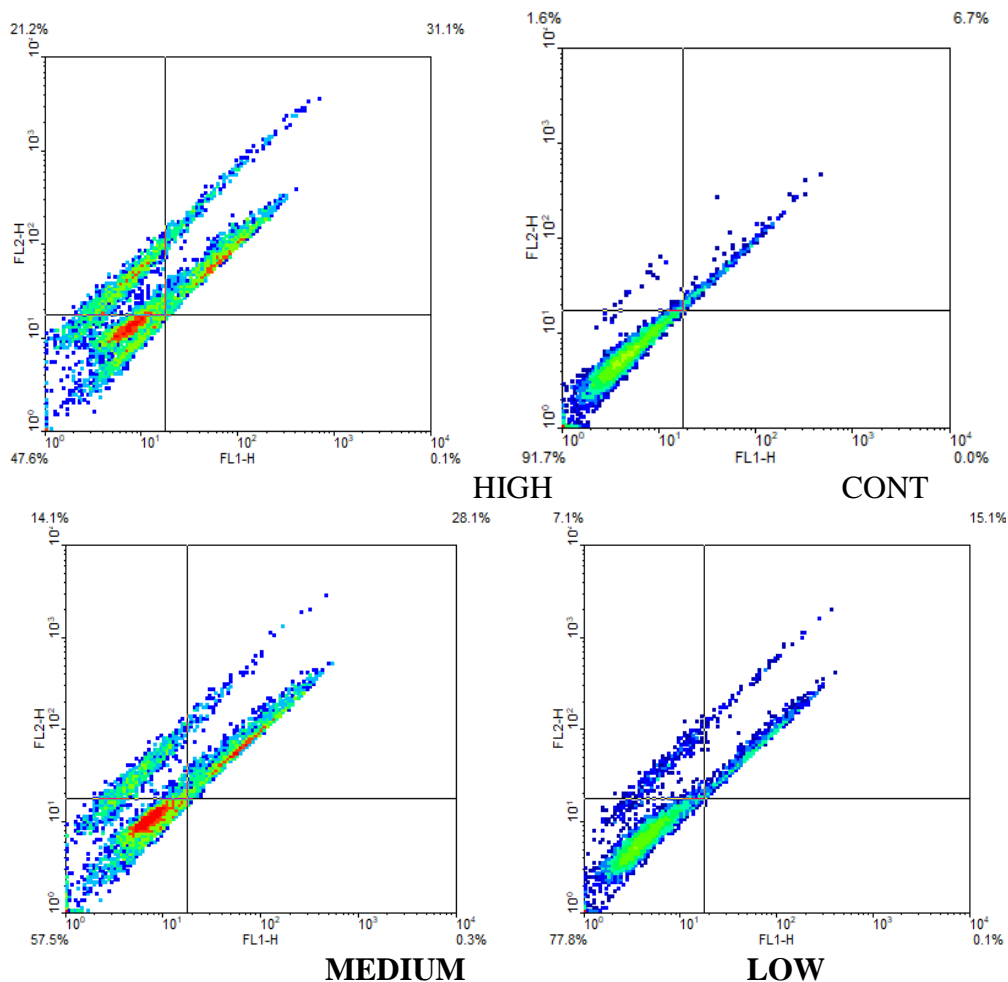
MEDIUM

شکل ۴-۲ در سلول هایی که تیمار انجام نشده است

قسمت هایی که خراش داده ایم توسط مهاجرت سلولی پر از سلول شده است اما در سلول هایی که تیمار انجام شده است مهاجرت سلولی کاهش پیدا کرده است

#### ۹-۴ بررسی فلوسایتومتری با استفاده از رنگ ANNEXIN:

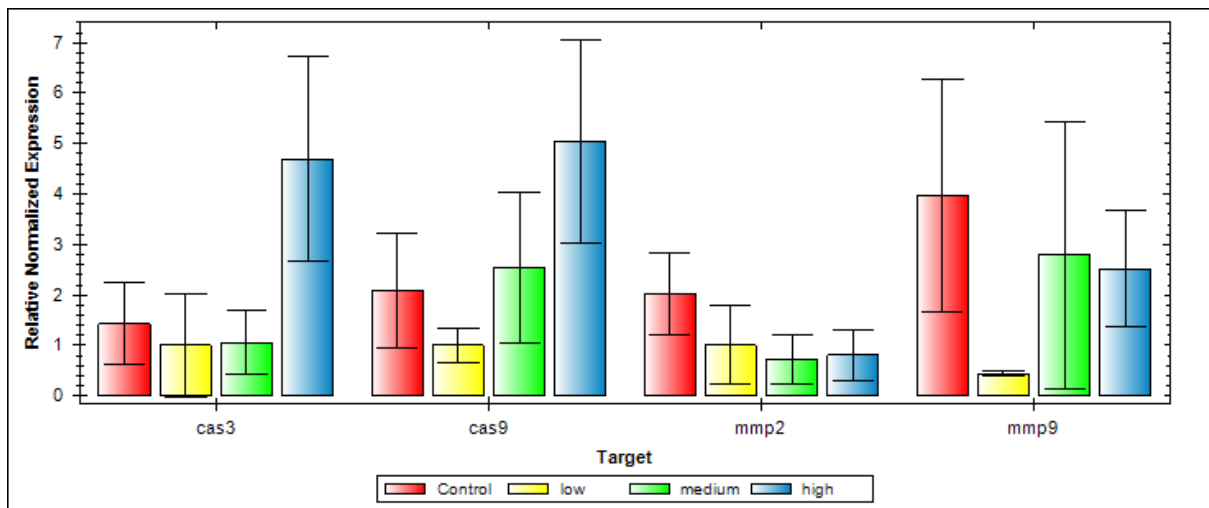
نمودار ۴-۴ نتایج مربوط به آنکسین را نشان می‌دهد. همان طور که در شکل دیده می‌شود آپوپتوز در غلظت‌های بالا بسیار زیاد است



#### نمودار ۴-۴ مقایسه بیان آنکسین در نمونه‌های تیمار شده و نشده با عصاره بالنگو

با استفاده از روش فلوسایتومتری. در هر کدام از نمودارها آن دسته از سلول‌هایی که در بخش پایین سمت چپ قرار دارند سلول‌های کاملاً سالم را نشان می‌دهند سلول‌های بخش بالا سمت چپ سلول‌های دچار نکروز را نشان می‌دهند و سلول‌های بخش بالا راست سلول‌های مرحله‌ی Late Apoptosis و بخش پایین راست سلول‌هایی که در مرحله Early Apoptosis قرار دارند را نشان می‌دهند

## ۴-۱۰ نتایج حاصل از بیان ژن



نمودار ۴-۵ نتایج حاصل از Real time PCR نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی که توسط بالنگو تیمار شده اند

نسبت به سلول‌هایی که تیمار نشده اند تغییرات قابل توجهی داشته اند بیان ژن کاسپاز ۳ و ۹ و MMP 2 و 9 تغییر یافته است

## ۴-۱۱ نتایج بیان ژن‌های کاسپاز ۳ و ۹

بررسی فعالیت کاسپاز نشان داد که فعالیت کاسپاز ۳ و ۹ در گروه تیمار شده با عصاره بالنگو نسبت به گروه تیمار نشده افزایش یافته است. بنا براین می‌توان گفت که عصاره بالنگو منجر به آغاز روند مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی رده HT29 از مسیر وابسته به کاسپاز شده است

## ۴-۱۲ نتایج حاصل از بیان ژن‌های MMP ۲ و ۹

نشان داد که فعالیت MMP2 در گروه تیمار شده با عصاره بالنگو نسبت به گروه تیمار نشده کاهش یافته است و MMP9 افزایش یافته است بنابراین میتوان نتیجه گرفت که عصاره بالنگو بر میزان بین ژن‌های MMP 2 و MMP 9 تاثیر می‌گذارد.

## نتیجه گیری

سرطان یک بیماری پیچیده است که توسط تکثیر سلولی کنترل نشده و فرار سلول‌ها از سیستم ایمنی ایجاد می‌شود و سبب هموار کردن راه‌های تهاجم سلولی و متاستاز می‌شود. سرطان یک مشکل عمده بهداشت عمومی در همه جهان است و از هر چهار مورد مرگ یک مورد مربوط به سرطان است سرطان روده بزرگ یا کولون سومین سرطان شایع در دنیا می‌باشد به طوری که در ایالات متحده درصد بالایی از مرگ و میر را به خود اختصاص داده است و طبق آمار سازمان بهداشت جهانی سرطان کولون سومین سرطان شایع در مردان و دومین سرطان رایج در زنان در سال ۲۰۱۶ بوده است. میزان زنده ماندن افراد دارای متاستاز، سرطان کولون به مدت ۵ سال است به طوری که این بیماران به داروهای ضد سرطان نیز مقاومت پیدا می‌کنند. در سال‌های اخیر به علت افزایش شیوع مرگ‌میر ناشی از سرطان و نقص روش‌های شیمی‌درمانی و رادیو درمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان نیاز به یافتن شیوه‌های جدید در کنترل سرطان احساس می‌شود. انتخاب نوع روش درمانی بر اساس مرحله بندی بیماری انجام میشود و جراحی درمان قطعی در مراحل اولیه بیماری می‌باشد امروزه از روش‌های شیمی‌درمانی و گاهی از رادیو تراپی در مراحل خاصی از بیماری سرطان کولون استفاده می‌شود. گسترش روز افزون سرطان کولون و مشکلات فراوان ناشی از آن از یک سو و عدم موفقیت کافی روش‌های درمانی رایج و سنتی در مبارزه اختصاصی با آن موجب توجه ویژه محققین نسبت به روش‌های درمانی هدفمند گشته است. بنابر این هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره گیاه بالنگو بر سرطان کولون رده HT29 و آنالیز بیان ژن‌های آپتوزی کاسپاز

۳ و ۹ میباشد در این مطالعه اثر گیاه بالنگو با تکنیک MTT و رنگ آمیزی تریپان بلو ارزیابی شد و القای آپپتوز با رنگ آمیزی آنکسین PI و به منظور مقایسه نتایج با یک نمونه کنترل، از سلول‌های نرمال HEK هم زمان استفاده گردید. سرطان درحال افزایش است تا کنون بیش از ۲۰۰ نوع سرطان شناخته شده است که هیچ یک از آنها درمان قطعی ندارند و به همین دلیل در پژوهش‌های مختلف بازگشت دوباره به فراورده‌های طبیعی افزایش پیدا کرده است (Shahneh et al. 2013). گیاهان همواره نقش مهمی را در درمان بیماری‌های انسانی دارند اما با توسعه سریع داروهای شیمیایی در دهه‌های اخیر استفاده از گیاهان دارویی منسوخ شده است و به علت عوارض جانبی داروهای شیمیایی و افزایش علاقه مندی استفاده از درمان‌های گیاهی در سراسر جهان بار دیگر توجه دانشمندان را به خود جلب کرده است با افزایش این علاقه مندی گیاهان دارویی جز مهم اقتصادی در کشورهای توسعه یافته تبدیل شده است بنابراین شناخت دقیق خواص درمانی و سمی گیاهان دارویی اهمیت زیادی دارد (Ali et al. 2013). با وجود سنتز بسیاری از داروها تخمین زده میشود که بیشتر فراورده‌های مورد مصرف منشا گیاهی دارند. به علت اینکه مواد موثره موجود در گیاهان دارویی به دلیل همراه بودن آنها با مواد دیگر پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیکی برخوردار میباشد بنابراین در بدن انباشته نمیشود و اثرات جانبی ندارد به همین دلیل نسبت به داروهای شیمیایی برتری دارد (Schlenk 2014).

### ۵-۵ نتایج حاصل از بیان ژن

که نتایج نشان داد که سلول‌های سرطانی که توسط بالنگو تیمار شده اند نسبت به سلول‌های کنترل منفی که تیمار نشده اند بیان آنها تغییر کرده است. و بر روی سرطان کولون رده HT29 تاثیر گذار می باشد و خاصیت القای مرگ سلولی و مهاجرت سلولی را دارا می باشد.

ژن caspase 3 بعد از تیمار با گیاه بالنگو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که مقدار آن در ابتدا (con) برابر با عدد ۱/۲ میباشد و پس از افزایش غلظت عصاره بالنگو (high) مقدار آن به ۴/۳ افزایش پیدا کرده است که حاکی از آن است افزایش غلظت عصاره باعث افزایش بیان ژن caspase 3 می‌شود.

ژن caspase 9 پس از تیمار با گیاه بالنگو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن است که مقدار آن در ابتدا (con) برابر با عدد ۲ میباشد و پس از افزایش غلظت عصاره بالنگو (high) مقدار آن به ۵ افزایش پیدا کرده است نتایج نشان می‌دهد که با افزایش غلظت عصاره بیان ژن caspase 9 افزایش پیدا می‌کند.

ژن MMP 2 پس از تیمار با گیاه بالنگو مورد بررسی قرار گرفت نتایج نشان داد که مقدار آن در ابتدا (con) برابر با مقدار ۲/۱ می باشد و پس از افزایش غلظت عصاره (high) مقدار آن برابر با ۰/۳ است که کاهش چشم گیری پیدا کرده است که نشان دهنده این است که با افزایش غلظت عصاره بالنگو بیان ژن کاهش پیدا میکند.

ژن MMP 9 پس از تیمار با گیاه بالنگو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از آن است که مقدار آن در ابتدا (con) برابر با مقدار ۴/۳ می باشد که پس از افزایش غلظت عصاره (high) مقدار به ۲/۲ کاهش پیدا کرده است که نشان دهنده این است که با افزایش غلظت عصاره بالنگو بیان ژن کاهش پیدا میکند.

درخشنده و همکاران در سال ۲۰۱۸ بر روی ارزیابی بیان ژن mmp9 و اثر نانو ذرات نقره بر روی رده سلولی سرطان کولون رده HT29 تحقیقاتی انجام دادند که نشان داد نانوذرات نقره باعث کاهش بیان mmp9 می‌شود که با نتایج ما هم سو می باشد. (درخشنده و همکاران ۲۰۱۸).

Suboj و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی تاثیر آلوئه امودین بر روی ژن‌های mmp9/2 مورد بررسی قرار دادند که نشان داد کاهش mmp 9/2 باعث کاهش رگ زایی و مهاجرت در سلول‌های سرطانی می‌شود که با نتایج مادر یک راستا قرار دارد (Subjo et al 2012).



همان طور که از نتایج بر می آید ماده موثره‌ی گیاه بالنگو به صورت وابسته به غلظت و زمان دارای خواصیت انتی اکسیدانی و فلانوییدی بر روی سلول سرطان کولون رده HT29 میباشد و همچنین سبب سمیت سلولی و القای اپوپتوزی بر روی سلول سرطان کولون رده HT29 میشود پس در درمان سرطان به عنوان یک ماده موثره می باشد و دارای اهمیت فراوانی است. با توجه به آزمایشات انجام شده و مشاهدات ما در این پژوهش پیشنهاد می شود که از تاثیر بالنگو بر روی رده های دیگر سرطان کولون استفاده شود.

پیشنهاد می شود که از گیاه بالنگو بر روی انواع دیگر سرطان ها استفاده شود.

پیشنهاد می شود که روی خواص های دیگر گیاه بالنگو تحقیقات انجام گردد.

پیشنهاد می شود از تاثیر گیاه بالنگو بر بیان سایر ژن های مرتبط با مسیرهای سرطان مورد پژوهش قرار گیرد.

پیشنهاد می شود که از گیاه بالنگو در تحقیقات آینده جهت کاهش اثرات جانبی داروهای شیمیایی مورد استفاده قرار بگیرد.

#### منابع

- Ali, I. , A. Haque, W. A. Wani, K. Saleem & M. J. B. C. Al Za'abi (2013) Analyses of anticancer drugs by capillary electrophoresis: a review. 27, 1296-1311 .
- Benelli, R. , R. Venè & N. J. T. R. Ferrari (2018) Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (cyclooxygenase-2), a complex target for colorectal cancer prevention and therapy . ۶۱-۴۲، ۱۹۶ .
- Bullman, S. , C. S. Pedamallu, E. Sicinska, T. E. Clancy, X. Zhang, D. Cai, D. Neuberg, K. Huang, F. Guevara & T. J. S. Nelson (2017) Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. 358, 1443-1448 .
- Center, M. M. , A. Jemal, R. A. Smith & E. J. C. a. c. j. f. c. Ward (2009) Worldwide variations in colorectal cancer. 59, 366-378 .
- Gu, M. , R. Nishihara, Y. Chen, W. Li, Y. Shi, Y. Masugi, T. Hamada, K. Kosumi, L. Liu & A. J. O. da Silva (2017) Aspirin exerts high anti-cancer activity in PIK3CA-mutant colon cancer cells. 8, 87379 .
- Hamada, T. , J. A. Nowak, D. A. Milner Jr, M. Song & S. J. T. J. o. p. Ogino (2019) Integration of microbiology, molecular pathology, and epidemiology: a new paradigm to explore the pathogenesis of microbiome-driven neoplasms. 247, 615-628 . .
- Huang, X. -m. , Z. -j. Yang, Q. Xie, Z. -k. Zhang, H. Zhang, J. -y. J. B. Ma & Pharmacotherapy (2019) Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. 117, 109142 .
- Huang, Y. , Y. Sun, W. -W. Wang & L. J. A. J. o. T. R. Zhang (2018) Boeravinone B a natural rotenoid exerts anticancer activity via inducing internalization and degradation of inactivated EGFR and ErbB2 in human colon cancer cells. 10, 4183 .
- Jan, R. J. A. p. b. (2019) Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. 9, 205 .
- Jayasekara, H. , R. J. MacInnis, E. J. Williamson, A. M. Hodge, M. Clendenning, C. Rosty, R. Walters, R. Room, M. C. Southey & M. A. J. I. j. o. c. Jenkins (2017) Lifetime alcohol intake is

associated with an increased risk of KRAS+ and BRAF-/KRAS-but not BRAF+ colorectal cancer. 14. ۱۴۹۳-۱۴۸۵ .

Keum, N. , D. Aune, D. C. Greenwood, W. Ju & E. L. J. I. j .o. c. Giovannucci (2014) Calcium intake and colorectal cancer risk: Dose–response meta-analysis of prospective observational studies. 135. 1940-1948 .

Liao, X. , T. Morikawa, P. Lochhead, Y. Imamura, A. Kuchiba, M. Yamauchi, K. Nosho, Z. R. Qian, R. Nishihara & J. A. J. C. c. r. Meyerhardt (2012) Prognostic role of PIK3CA mutation in colorectal cancer: cohort study and literature review. 18. 2257-2268 . .

Ogino, S. , P. Lochhead, A. T. Chan, R. Nishihara, E. Cho, B. M. Wolpin, J. A. Meyerhardt, A. Meissner, E. S. Schernhammer & C. S. J. M. P. Fuchs (2013) Molecular pathological epidemiology of epigenetics: emerging integrative science to analyze environment, host, and disease. 26. 465-484 .

Peng, L. , K. Weigl, D. Boakye & H. J. T. A. j . o. g. Brenner (2018) Risk scores for predicting advanced colorectal neoplasia in the average-risk population: a systematic review and meta-analysis. 113. 1788 .

Rubinstein, M. R. , X. Wang, W. Liu, Y. Hao, G. Cai, Y. W. J. C. h. Han & microbe (2013) Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/ $\beta$ -catenin signaling via its FadA adhesin. 14. 195-206 .

Schlenk, R. F. J. H. (2014) Post-remission therapy for acute myeloid leukemia. 99. 1663 . .

Shahneh, F. Z. , S. Valiyari, A. Azadmehr, R. Hajiaghae, S. Yaripour, A. Bandehagh & B. J. A. i. p. s. Baradaran (2013) Inhibition of growth and induction of apoptosis in fibrosarcoma cell lines by Echinophora platyloba DC: in vitro analysis. 2013 .

Shen, T. , L. -D. Cai, Y. -H. Liu, S. Li, W. -J. Gan, X. -M. Li, J. -R. Wang, P. -D. Guo, Q. Zhou, X. -X. J. J. o. h. Lu & oncology (2018) Ube2v1-mediated ubiquitination and degradation of Sirt1 promotes metastasis of colorectal cancer by epigenetically suppressing autophagy. 11. 1-16 .

Suzuki, H. , E. Yamamoto, R. Maruyama, T. Niinuma, M. J. B. Kai & b. r. communications (2014) Biological significance of the CpG island methylator phenotype. 455. 35-42 . .

Wasserman, I. , L. H. Lee, S. Ogino, M. R. Marco, C. Wu, X. Chen, J. Datta, E. Sadot, B. Szeglin & J. G. J. C. C. R. Guillem (2019) SMAD4 loss in colorectal cancer patients correlates with recurrence, loss of immune infiltrate, and chemoresistance. 25. 1948-1956 .

Woods, D. , J. J. J. C. b. Turchi & therapy (2013) Chemotherapy induced DNA damage response: convergence of drugs and pathways. 14. 379-389 .

Yamaoka, Y. , Y. Suehiro, S. Hashimoto, T. Hoshida, M. Fujimoto, M. Watanabe, D. Imanaga, K. Sakai, T. Matsumoto & M. J. J. o. g. Nishioka (2018) Fusobacterium nucleatum as a prognostic marker of colorectal cancer in a Japanese population. 53. 517-524 .

Yang, W. , L. Liu, N. Keum, Z. R. Qian, J. A. Nowak, T. Hamada, M. Song, Y. Cao, K. Nosho & S. A. J. C. P. R. Smith-Warner (2019) Calcium intake and risk of colorectal cancer according to tumor-infiltrating T cells. 12, 283-294 .

Zhang, X. , N. Keum, K. Wu, S. A. SmithWarner, S. Ogino, A. T. Chan, C. S. Fuchs & E. L. J. I. j. o. c. Giovannucci (2016) Calcium intake and colorectal cancer risk: results from the nurses' health study and health professionals follow-up study. 139, 2232-2242 .