



## Investigation of the effect of hydroalcoholic extract of Terminalia chebula on survival and induction of apoptosis in cultured colorectal cancer cells on PCL/Gelatin nanofiber scaffold

Behnood A<sup>a</sup>, Mohammadi T<sup>b\*</sup>, Pooyanmehr M<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Graduated student, Basic Sciences and Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

<sup>b</sup> Assistant professor, Basic Sciences and Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran

<sup>c</sup> Assistant professor, Basic Sciences and Pathobiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Razi University, Kermanshah, Iran.

### Original Article

Use your device to scan and read the article online



**Citation:** Behnood A, Mohammadi T, Pooyanmehr M. Investigation of the effect of hydroalcoholic extract of Terminalia chebula on survival and induction of apoptosis in cultured colorectal cancer cells on PCL/Gelatin nanofiber scaffold. Journal of Cell and Tissue. 2025; 16(2):170-184.

<https://doi.org/10.61882/JCT.16.2.170>

### KEYWORDS

Terminalia chebula  
scaffold  
nanofibrous  
cancer  
apoptosis

### EXTENDED ABSTRACT

**Introduction:** Colorectal adenocarcinoma, a frequent malignancy of the large intestine, is often treated with chemotherapy. However, the significant toxicity of these drugs to healthy tissues poses a major challenge in achieving successful cancer treatment. Cell culture has enabled the development of in vitro models for drug and anti-cancer compound testing. However, traditional 2D monolayer cultures have limitations in studying cancer biology. To more accurately recapitulate in vivo cellular behavior, cells are now routinely cultured in three-dimensional environments, which closely resemble the native tissue in terms of morphology and gene expression profiles. Electrospun nanofibers, with their high surface area and porosity, closely mimic the extracellular matrix and promote cell-cell interactions. These scaffolds have revolutionized 3D cell culture, providing a powerful tool for evaluating anticancer drugs in a more physiologically relevant environment. In recent years, much research has focused on herbal medicines as potent drug candidates for inducing apoptosis. Terminalia chebula is a medicinal plant with a wide array of therapeutic applications, including anticancer effects. Although numerous studies have reported the growth of healthy tissues on nanofiber scaffolds, there is limited information regarding the growth of tumor cells on these scaffolds.

\* Corresponding author.; Tel: 09124197437, Fax: 083-38320041

E-mail address: [tymhd@razi.ac.ir](mailto:tymhd@razi.ac.ir)

DOI: <https://doi.org/10.61882/JCT.16.2.170>

Received 12 Jun. 20205; Received in revised form: 16 May. 2025; Accepted: 25 May. 2025

Original Article

© Author



**Aim:** This study investigated the anti-proliferative and apoptotic effects of *Terminalia chebula* extract on HT-29 colorectal cancer cells cultured in a PCL/Gelatin nanofiber scaffold model.

**Materials and Methods:** Colorectal cancer cells (HT-29 cell line) were cultured in both conventional (2D) and nanofiber scaffold (3D) culture conditions. After 24 hours, the cells were treated with 10, 100, 200, and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations of the extract for 24 hours. Subsequently, the MTT assay was performed to determine cell viability and IC<sub>50</sub>. In addition, cells treated with the IC<sub>50</sub> concentration were stained with acridine orange/ethidium bromide. The morphology of the scaffold and cell adhesion on it were also examined using scanning electron microscopy. The obtained data were statistically analyzed using SPSS software, one-way ANOVA, and Tukey's post-hoc test.

**Results:** Our findings indicated that Scanning electron microscopy images revealed that the 3D nanofibrous scaffolds, both cell-free and seeded with HT-29 cells, exhibited desirable mechanical properties and adequate porosity. The cells cultured on these scaffolds demonstrated robust growth, proliferation, and a 3D morphology closely resembling in vivo conditions, indicating successful cell-scaffold interactions. The MTT assay revealed that cell viability decreased in a concentration-dependent manner following 24 hours of treatment with the extract. The IC<sub>50</sub> of the extract was 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 2D culture and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 3D culture after 24 hours of treatment. Based on the morphological assessment using acridine orange/ethidium bromide staining, it was determined that treatment with the extract induced apoptosis in HT-29 cancer cell line.

**Conclusion:** Collectively, the findings of this study indicated that the hydroalcoholic extract of *Terminalia chebula* exhibits concentration-dependent cytotoxicity against cancer cells, with enhanced efficacy in a 3D culture model. This highlights the advantages of using nanofiber scaffolds to mimic the in vivo tumor microenvironment and to better understand the mechanisms of cancer progression. Future studies should further explore the potential of this model for drug discovery and mechanistic investigations.



## بررسی اثر عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه روی بقا و القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی کولورکتال کشت شده بر داربست نانوفیبر PCL/Gelatin

علی بهنود<sup>۱</sup>، طیبه محمدی\*<sup>۲</sup>، مهرداد پویانمهر<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دکترای عمومی دامپزشکی، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی  
<sup>۲</sup> استادیار، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه tymhd@razi.ac.ir  
<sup>۳</sup> استادیار، گروه علوم پایه و پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه رازی، کرمانشاه

واژگان کلیدی	چکیده
هلیله سیاه داربست نانوفیبر سرطان آپوپتوزیس	<p><b>هدف:</b> هلیله سیاه گیاهی با خاصیت ضد سرطانی است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر عصاره آن روی سلول‌های سرطانی در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی است. <b>مواد و روش‌ها:</b> عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه با غلظت‌های ۰، ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه و اثر آن بر سلول‌های سرطانی روده بزرگ با روش کشت مرسوم (محیط کشت دو بعدی) و کشت بر داربست نانوفیبر PCL/Gelatin (محیط کشت سه بعدی) با کمک آزمون سنجش بقای سلولی (MTT) بعد از ۲۴ ساعت تیمار بررسی شد. همچنین برای تعیین نوع مرگ سلولی تحت اثر عصاره، رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیديوم بروماید انجام شد. <b>نتایج:</b> عصاره در هر دو محیط کشت باعث مهار تکثیر سلول‌ها شد. غلظت IC50 عصاره در محیط کشت دو بعدی ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر و در محیط کشت سه بعدی، ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تعیین شد. عصاره باعث مرگ سلولی شد که بر اساس تغییرات مورفولوژیک سلول، آپوپتوزیس تشخیص داده شد. <b>نتیجه‌گیری:</b> عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه توانست روی سلول‌های سرطانی به صورت وابسته به غلظت اثر کشندگی داشته باشد و این اثر در شرایط کشت سه بعدی با استفاده از داربست نانوفیبر بیشتر از شرایط کشت دو بعدی مرسوم بود. کشت سلول‌های سرطانی روی داربست نانوفیبری می‌تواند مدلی مناسب برای بررسی تاثیر عوامل ضد سرطان روی سلول‌ها در شرایطی شبیه درون بدن فراهم کند.</p>
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳	
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۲/۲۶	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴	

### ۱- مقدمه

سرطان کولورکتال که سومین عامل مرگ ناشی از سرطان در سطح جهان محسوب می‌شود، به سرعت در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۳۰ سالانه ۳ میلیون مرگ و بیش از ۲/۲ میلیون مورد جدید از این بیماری در سراسر جهان رخ دهد (۱). پیش از ایجاد CRC، سلول‌های اپی‌تلیال مخاطی اغلب به شکل غیرسرطانی تکثیر می‌یابند. سرطان‌های روده بزرگ که در دیواره روده بزرگ یا راست روده شکل می‌گیرند، قادر هستند به عروق خونی یا لنفاوی نفوذ کرده و از طریق خون به گره‌های لنفاوی مجاور یا سایر اندام‌ها متاستاز دهند. رژیم غذایی و سبک زندگی متفاوت

می‌توانند التهاب روده را تشدید کرده و فلور میکروبی روده را تغییر دهند، در نتیجه پاسخ ایمنی تحریک شده و هر دوی این عوامل می‌توانند باعث شکل‌گیری پولیپ‌ها و تبدیل آن‌ها به سرطان شوند (۲). تغییرات در ژن‌های سرطان‌زا و ژن‌های سرکوب‌کننده تومور نیز ممکن است به سلول‌های مخاطی برتری انتخابی داده و تکثیر بیش از حد و در نهایت سرطان‌زایی را تسریع کنند. این جهش‌ها می‌توانند ارثی باشند یا به‌طور خودبه‌خودی رخ دهند (۱). جراحی تنها راه درمان CRC است. با این حال، نتیجه آن همیشه رضایت‌بخش نیست. اگر چه ۷۰-۸۰ درصد بیماران در زمان تشخیص تحت عمل جراحی قرار می‌گیرند، ۵۰ درصد بیمارانی که به تازگی تشخیص داده شدند، در نهایت دچار متاستاز می‌شوند. شیمی‌درمانی و پرتودرمانی هم باید برای شمار زیادی از بیماران مد نظر قرار گیرد. با این حال، سمیت داروهای شیمی‌درمانی برای سلول‌ها و بافت‌های سالم بدن بیمار مانعی بزرگ در درمان موفق سرطان است (۳). عوارض جانبی نظیر نرسیدن دارو با غلظت مناسب به بافت هدف، اثرات مخرب پرتودرمانی بر بافت‌های سالم بدن و همچنین مقاوم شدن بدن در برابر درمان از جمله عوارض داروهای شیمی‌درمانی است (۴). با وجود افزایش شیوع، پیشرفت‌های درمانی در زمینه CRC منجر به کاهش موارد ابتلا به این بیماری در کشورهای توسعه‌یافته شده است (۱).

امروزه کشت آزمایشگاهی شرایط مناسبی را برای آزمایش دارو و ترکیبات ضد سرطانی جدید فراهم آورده است. هدف کشت آزمایشگاهی فراهم آوردن شرایطی مشابه با شرایط درون‌تنی می‌باشد. محدودیت‌های کشت‌های تک لایه دو بعدی جهت مطالعه بیولوژی سرطان در آزمایشگاه در مطالعات بسیاری نشان داده شده است. چسبندگی و سازمان‌دهی سلول‌های سرطان در حال رشد در کشت دو بعدی از نظر تکثیر، انتقال سیگنال سلولی و پاسخ به داروها و پرتودرمانی متفاوت از سلول‌های سرطانی است که در بدن هستند. داربست درگیر سرطان در بدن ساختار سه بعدی است که از سلول‌های مجاور، ماتریکس خارج سلولی، رگ‌های خونی، سلول‌های ایمنی و سیتوکین‌ها تشکیل شده‌اند. مطالعات اخیر روی کشت سه بعدی نشان داده‌اند که سلول‌های سرطانی طی تکثیر، رگزایی، متاستاز و شیمی‌درمانی یا پرتودرمانی با ریزمحیطی که در آن هستند برهم‌کنش‌های زیادی دارند. مطالعات نشان می‌دهند که کشت سلول‌ها بر داربست‌ها و محیط‌های سه بعدی سبب فراهم آوردن شرایطی می‌شود که از جنبه‌های مختلف همچون مورفولوژی و پروفایل بیان ژنی بسیار نزدیک به سلول‌های محیط درون‌تنی می‌باشند. برهم‌کنش با پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی از تمایز سلول‌های بنیادی سرطانی جلوگیری می‌کند. سیستم‌های کشت مرسوم دو بعدی جهت مطالعه این برهم‌کنش‌ها ناکافی هستند به طوری که برای باز تولید برهم‌کنش سلول با سلول و پیچیدگی سه بعدی تومورهای توپر شکست می‌خورند. اخیراً داربست‌های سه بعدی جهت تقلید ساختار ماتریکس خارج سلولی و محیط سه بعدی بافت‌ها ایجاد شده‌اند (۵). یکی از انواع این داربست‌ها، داربست‌های نانورشته‌ای الکترورسی شده است که می‌توانند ارتباط سلول با سلول را تسهیل کنند و برهم‌کنش‌های سلولی با فراهم کردن نسبت سطح به حجم بیشتر همراه با تخلخل بالا مشابه ماتریکس خارج سلولی را تقلید کنند و از این رو با تقلید از محیط طبیعی بدن، فرصت‌های جدیدی را برای ارزیابی داروهای ضدسرطان فراهم کرده‌اند (۵). پلی‌کاپرولاکتون یک پلی‌استر آلیفاتیک زیست تخریب پذیر و زیست سازگار است که به راحتی قابلیت الکترورسی شدن را داشته و برای استفاده در بدن انسان تاییدیه سازمان غذا و دارو را نیز دارد. با توجه به این که این پلیمر در شرایط فیزیولوژیکی (بدن انسان) با هیدرولیز پیوندهای استری تجزیه می‌شود، توانسته است، در مهندسی بافت توجه زیادی را برای استفاده به‌عنوان بیومتریال قابل کاشت در بدن انسان به‌خود جلب کند ولی از آنجائی که ذاتا هیدروفوب است نمی‌تواند شرایط مناسبی جهت چسبندگی سلول مهیا کند، لذا ترکیب آن با یک داربست طبیعی همچون ژلاتین می‌تواند هر دو فاکتور چسبندگی و استحکام مکانیکی را ایجاد نماید (۶).

از سوی دیگر، طی سال‌های اخیر، ترکیبات شیمیایی پیشگیری کننده طبیعی که قادر به مهار، تاخیر یا برعکس کردن فرایند چند مرحله‌ای سرطان زایی با حداقل سمیت هستند مورد توجه ویژه قرار گرفته‌اند، به طوری که بیش از ۶۰ درصد داروهای ضد سرطان موجود منشا طبیعی دارند. گیاهان منبع غنی عوامل دارویی و ترکیباتی هستند که به درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان کمک می‌کنند. با کشف علوم جدید مانند فیتوشیمی و ارتباط آن با شیمی گیاهان دارویی طی سالیان زیاد، از ترکیبات گیاهی در صنعت داروسازی بهره برده‌اند (۷). هلیله سیاه با نام علمی *Terminalia chebula* در خاور میانه و مناطق حاره ای مانند هند، چین و تایلند می‌روید. میوه آن در طب سنتی از زمان باستان برای درمان بیماری‌های مرتبط با پیری همانند کاهش حافظه استفاده شده است. هلیله سیاه اثرات درمانی وسیعی دارد و برای درمان بیماری‌های مختلفی مانند سرطان، بیماری‌های قلبی عروقی، فلجی، جذام، آرتریت، صرع، سرفه، تب، اسهال، گاستروانتریت، بیماری‌های پوستی، عفونت ادراری، نفرس و زخم‌های عفونی استفاده شده است. در میان داروهای گیاهی به شاه داروها معروف است. هلیله سیاه حاوی ترکیبات مختلفی است. تانن‌ها از جمله گالوتانن که حاوی گالیک اسید است و الاجی تانن ترکیبات اصلی آن هستند. چیبولینیک اسید و چبولانیک اسید نیز تانن‌های دیگر موجود در آن هستند. الاجیک اسید، گالیک اسید، تانیک اسید، چیبولیک اسید از جمله ترکیبات فنولی موجود در هلیله سیاه هستند. ترکیبات متفرقه دیگری همچون پالمیتیک، استئاریک، اولئیک، لینولئیک، آراشیدونیک اسید نیز در مغز میوه وجود دارند (۸).

آپوپتوزیس مرگ برنامه ریزی شده سلولی است که باعث تجزیه لیزوزوم و غشاهای سلولی نمی‌شود. از این رو، طی آن محتویات سلول خارج نمی‌شود و التهاب یا جراحات ثانویه را تحریک نمی‌کند. بنابراین، جستجو برای عواملی که بتواند آپوپتوزیس را در سلول‌های توموری تحریک کنند به‌عنوان هدف اصلی در کشف داروی ضد سرطان مورد توجه قرار گرفته است. طی آپوپتوزیس سلول دشتخوش تغییرات ریخت‌شناختی مانند چروکیدگی سلول، حباب‌دار شدن غشا، متراکم شدن کروماتین و قطعه قطعه شدن DNA می‌شود (۹). تحقیقات اخیر روی داروهای گیاهی به‌عنوان گزینه‌های دارویی القاکننده قوی آپوپتوزیس متمرکز شده‌اند (۱۰).

با این که مطالعات بسیاری رشد بافت‌های سالم روی داربست‌های الکترورسی شده را گزارش کرده‌اند، اطلاعات کمی در رابطه با رشد سلول‌های توموری روی این داربست‌ها وجود دارد (۱۱). لذا در مطالعه حاضر، اثرات عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه روی بقای سلول سرطانی کولورکتال (HT-29) کشت شده بر داربست نانوفیبر ساخته شده از PCL/Gelatin مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

مطالعه حاضر پس از اخذ شناسه اخلاق IR.RAZI.REC.1399.056 از کمیته اخلاق دانشگاه انجام شده است.

**تهیه عصاره:** میوه خشک هلیله سیاه از عطاری معتبر خریداری و در آزمایشگاه پودر شد. ۱۰۰ گرم از پودر با اتانول ۷۰ درصد مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت روی استیرر مغناطیسی همزده شد. سپس به کمک کاغذ صافی واتمن فیلتر شد. محلول حاصل تغلیظ و خشک شد. از عصاره خشک شده محلول استوک تهیه شد که تا زمان استفاده، در یخچال نگهداری شد. به‌منظور تهیه غلظت‌های موردنظر، حجم لازم از استوک برداشته و سپس با محیط کشت به حجم رسانده شد.

**کشت و پاساژ سلولی:** در این مطالعه، از سلول سرطانی روده بزرگ انسان رده HT-29 استفاده شد. سلول‌ها در فلاسک کشت T-25 حاوی محیط کشت کامل متشکل از DMEM (Gibco, USA) غنی شده با ۱۰ درصد FBS (Bioidea, Iran) و پنی‌سیلین-استرپتومایسین ۱ درصد (Bioidea, Iran) کشت شدند و در انکوباتور با شرایط دمایی ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد

و CO<sub>2</sub> ۵ درصد نگهداری شدند. تعویض محیط هر دو روز یکبار انجام گرفت تا زمانی که سلول‌ها حدود ۸۰ درصد سطح کف فلاسک کشت را پوشانند. سپس، پاساژ سلولی با استفاده از Trypsin/EDTA ۰/۲۵ درصد انجام شد.

**کشت سلولی سه بعدی:** سلول‌ها بر روی داربست نانوفیبر PCL/Gelatin کشت داده شدند. بدین‌منظور، ابتدا داربست‌های نانوفیبر قالب‌گیری شده استریل، برای چاهک پلیت‌های ۲۴ و ۹۶ خانه، با PBS شسته شدند و در کف چاهک‌ها قرار داده شدند. در هر چاهک سطح داربست‌ها با PBS پوشانده شدند و انکوبه شدند. ۲۴ ساعت بعد، PBS خارج و سلول‌ها روی داربست‌ها (۵۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه و ۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۲۴ خانه) کشت شدند و حجم مناسب محیط کشت به آرامی به چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها آماده تیمار با عصاره هلیله سیاه بودند.

**تیمار سلولی:** ۲۴ ساعت پس از انکوبه کردن سلول‌ها روی داربست، زیر میکروسکوپ بررسی شدند و در ادامه تیمارهای لازم برای سلول‌ها در هر دو محیط دوبعدی و سه بعدی بدین ترتیب انجام گرفت: ابتدا محیط کشت رویی از هر چاهک خارج و شستشوی سلول‌ها با PBS انجام شد. در ادامه، به چاهک‌های مربوط، غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره اضافه شد. به چاهک‌های گروه کنترل فقط محیط کشت اضافه شد.

**آزمون MTT:** ۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مورد مطالعه، غلظت IC<sub>50</sub> عصاره توسط آزمون MTT تعیین شد.

بدین‌منظور، ابتدا محیط رویی سلول‌ها دور ریخته شد و سلول‌ها با PBS شسته شدند. محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و به نسبت ۱ به ۹ با محیط کشت مخلوط شد. از مخلوط مذکور، ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه و پلیت به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محلول MTT با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه و به آرامی پیپتاژ شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه دیگر انکوبه شد. در پایان جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر قرائت شد. درصد بقای سلولی با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بقای سلول} = (\text{گروه تیمار OD} / \text{گروه کنترل OD}) \times 100$$

**رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیديوم بروماید:** برای بررسی نوع مرگ سلولی در سلول‌های HT-29 بر اساس مورفولوژی، از رنگ آمیزی آکریدین اورنج- اتیديوم بروماید استفاده شد. سلول‌ها با تراکم ۵۰ هزار سلول در پلیت ۲۴ خانه کشت و پس از ۲۴ ساعت با غلظت IC<sub>50</sub> عصاره تیمار شدند. پس از ۲۴ ساعت تیمار، سلول‌ها با PBS شسته شدند و سپس با متانول فیکس و با PBS شسته شدند و در پایان با محلول آکریدین اورنج/اتیديوم بروماید (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) رنگ آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسانس با فیلتر آبی بررسی و عکس‌برداری انجام شد.

**آماده سازی داربست برای عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی:** به‌منظور عکس‌برداری، داربست حامل سلول و فاقد سلول ۲۴ ساعت انکوبه شدند، سپس با PBS شسته شدند. در ادامه، به هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد اضافه شد و دو ساعت در دمای اتاق باقی ماند. گلو تار آلدئید خارج و داربست‌ها با PBS شسته شدند. مراحل آب‌گیری با کمک غلظت‌های صعودی اتانول انجام شد و در نهایت داربست‌ها درون فویل آلومینیومی قرار داده شدند و جهت عکس‌برداری به آزمایشگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی ارسال شدند.

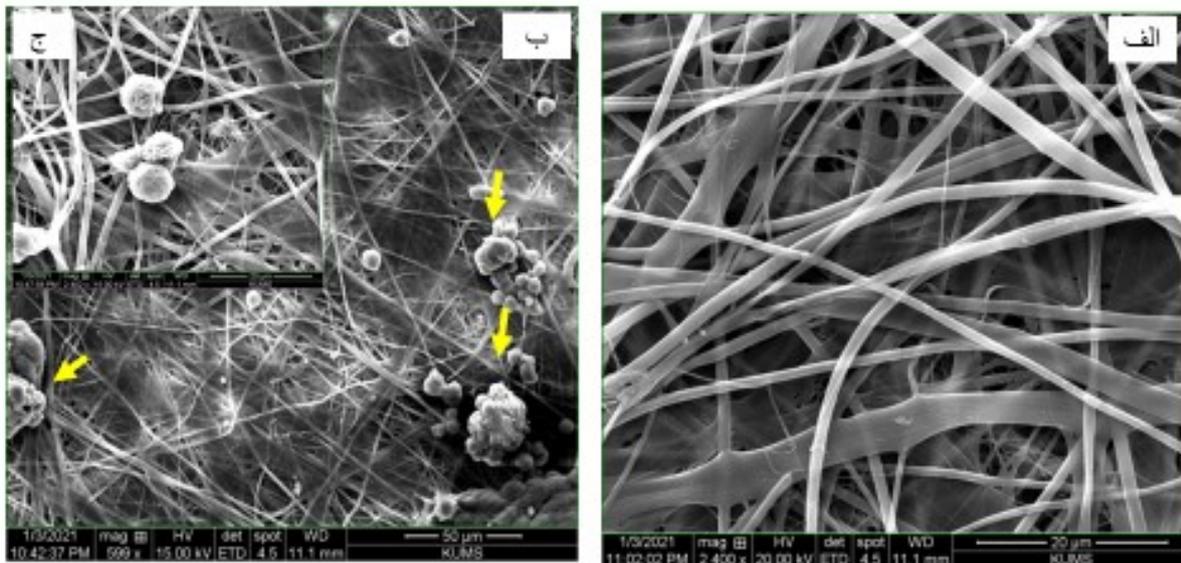
### ۳- آنالیز آماری

داده‌های به‌دست آمده، با کمک نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون one-way ANOVA و پس آزمون Tukey انجام شد. نمودارها با کمک نرم افزار Excel 2016 رسم شد. تمام آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.  $p < 0.05$  به‌عنوان اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌ها در نظر گرفته شد.

#### ۴- نتایج

#### مورفولوژی داربست نانورشته الکتروریسی شده PCL/Gelatin و سلول‌های کشت شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)

نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی سه بعدی داربست نانوفیبروزی فاقد سلول و حامل سلول‌های Ht-29 با استفاده از میکروگراف‌های تهیه شده توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره، نشان دهنده خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل مناسب داربست تهیه شده و همچنین رشد، تکثیر (کلونی‌های سلولی) و ایجاد مورفولوژی طبیعی سه‌بعدی مشابه با شرایط درون‌تنی سلول‌های مورد مطالعه و ارتباط و سالم بودن آن‌ها بود (شکل ۱).



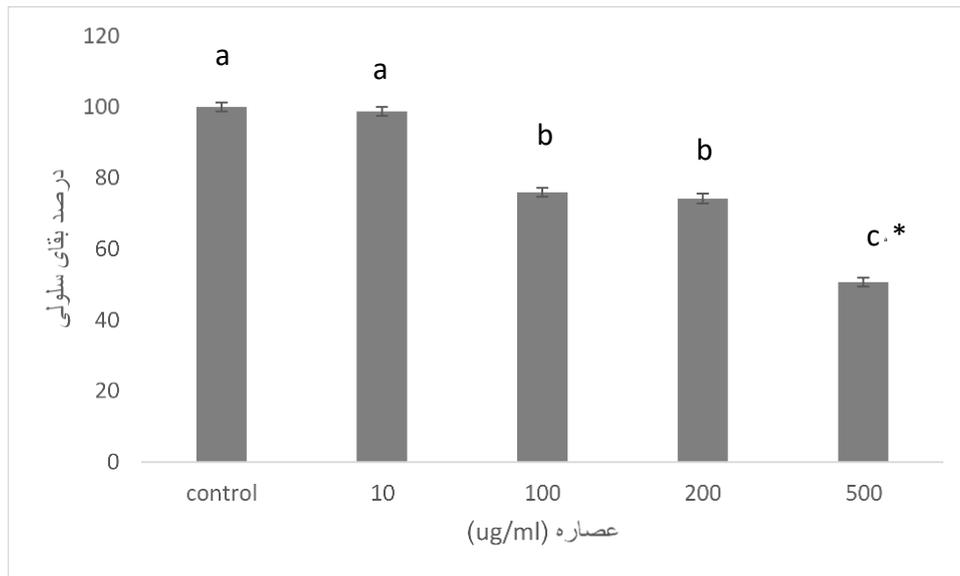
شکل ۱: مورفولوژی داربست نانورشته الکتروریسی شده PCL/Gelatin و سلول‌های کشت شده بر آن زیر میکروسکوپ الکترونی نگاره. الف) داربست بدون سلول را نشان می‌دهد. ب) مورفولوژی سلول‌ها روی داربست را نشان می‌دهد. همچنین، در این تصویر، چسبندگی سلول‌ها به داربست و ارتباطشان با داربست نشان داده شده است. روی داربست کلونی‌های سلولی تشکیل شده است (پیکان). ج) سلول‌ها را با بزرگنمایی بیشتر روی داربست نشان می‌دهد.

#### نتایج آزمون MTT

#### الف- تعیین غلظت IC50 عصاره هلیله سیاه پس از ۲۴ ساعت در محیط کشت دو بعدی

پس از ۲۴ ساعت تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مورد مطالعه عصاره، نتایج حاصل از مقایسه میانگین جذب نوری سلول‌های Ht-29 تحت تیمار با غلظت‌های ذکر شده با میانگین جذب نوری سلول‌های گروه کنترل که با عصاره تیمار نشدند، به‌دست آمد. داده‌ها توسط نرم افزار اکسل به نمودار تبدیل شد و IC50 برای رده سلولی Ht-29 تحت تیمار، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر

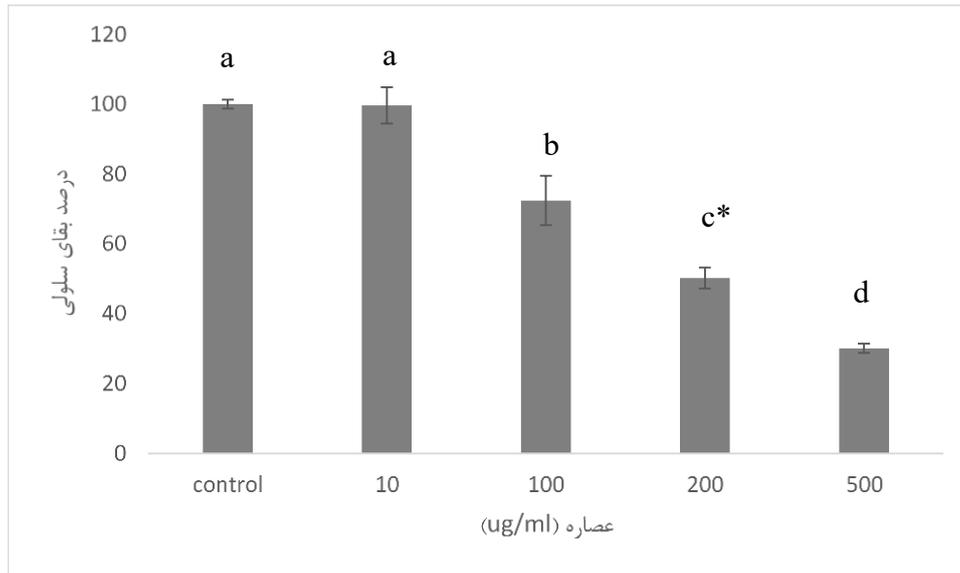
تعیین شد. همان طور که از نتایج حاصل از آزمون MTT مشاهده می شود، با افزایش غلظت عصاره هلیله سیاه، درصد بقا سلول ها کاهش یافته است که نشان دهنده اثر وابسته به غلظت عصاره بر سلول های مورد مطالعه است (نمودار ۱).



نمودار ۱: نمودار اثر غلظت های مختلف عصاره ی هلیله سیاه بر بقای سلول های HT-29 کشت شده محیط کشت دوعدی پس از تیمار ۲۴ ساعته (تعداد تکرار=۳)، بیانگر بقای وابسته به غلظت سلول هاست. غلظت ۵۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به عنوان IC50 عصاره تعیین شد (\*). حروف مختلف نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار درصد بقا بین غلظت های مختلف عصاره در سطح اطمینان  $p < 0.05$  می باشد.

#### ب- تعیین غلظت IC50 عصاره هلیله سیاه پس از ۲۴ ساعت کشت بر داربست

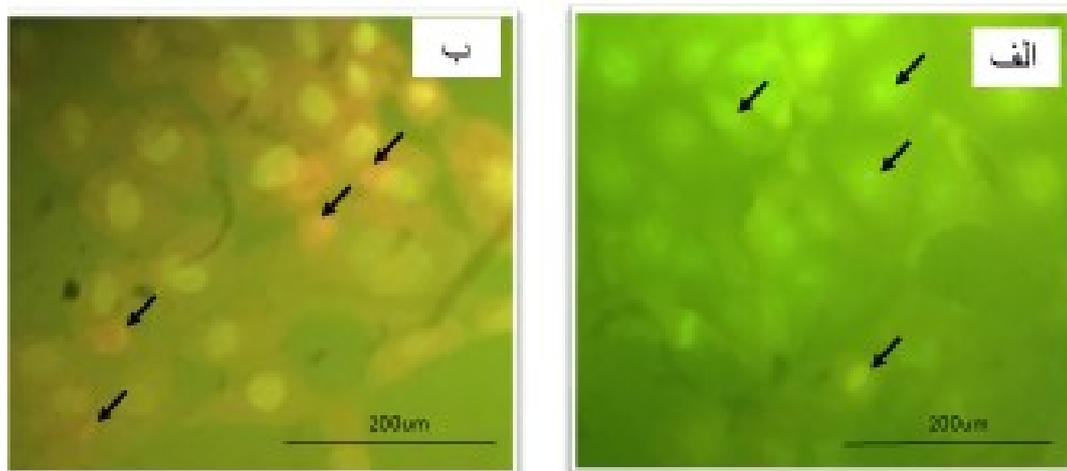
پس از ۲۴ ساعت نتایج حاصل از مقایسه میانگین جذب نوری سلول های HT-29 تحت تیمار با غلظت های ذکر شده با میانگین جذب نوری سلول های گروه کنترل که با عصاره تیمار نشدند، به دست آمد. داده ها توسط نرم افزار اکسل به نمودار تبدیل شد و غلظتی از عصاره که منجر به مهار رشد ۵۰ درصدی می شود، برای رده سلولی HT-29 تحت تیمار، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تعیین شد. نتایج حاصل از آزمون MTT نشان داد که با افزایش غلظت عصاره هلیله سیاه، درصد بقای سلول ها کاهش یافته که نشان از وابسته به غلظت بودن اثر عصاره بر روی سلول های HT-29 است (نمودار ۲).



نمودار ۲: نمودار اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هلپله سیاه بر بقای سلول‌های HT-29 کشت شده بر داربست نانوفیبر پس از تیمار ۲۴ ساعته (تعداد تکرار=۳)، بیانگر بقای وابسته به غلظت سلول‌هاست. غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به‌عنوان IC50 عصاره تعیین شد (\*). حروف مختلف نشان دهنده وجود تفاوت معنی‌دار درصد بقا بین غلظت‌های مختلف عصاره در سطح اطمینان  $p < 0.05$  می‌باشد.

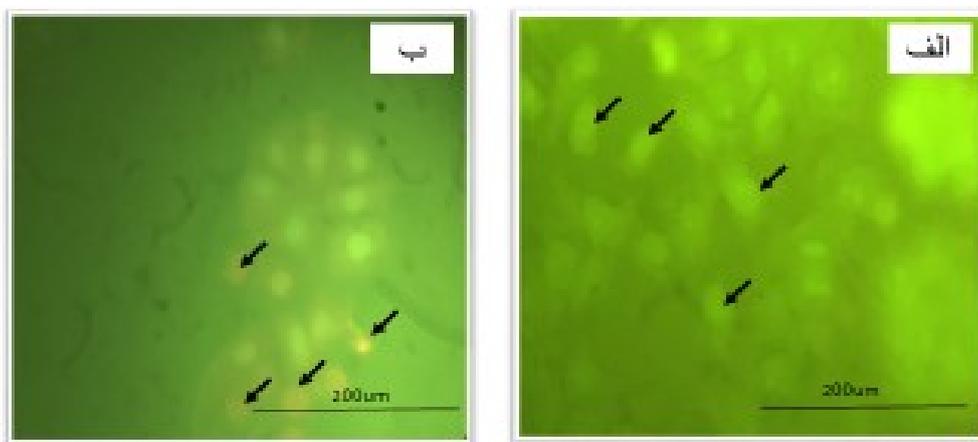
#### بررسی وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های HT-29 با استفاده از رنگ‌آمیزی اکریدین اورنج/اتیديوم برمايد

اکریدین اورنج با عبور از غشای سلولی، هسته سلول‌های زنده را سبز رنگ می‌کند، در حالی که اتیديوم برمايد با عبور از غشاهای آسیب‌دیده، هسته سلول‌های آپوپتوزیس شده را نارنجی و در مراحل نهایی آپوپتوزیس، قرمز و قطعه‌قطعه می‌کند. سلول‌های HT-29 در محیط کشت دو بعدی، پس از تیمار با غلظت 500 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه هلپله سیاه با اکریدین اورنج/ اتیديوم برمايد رنگ‌آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ فلئوئورسنس با فیلتر آبی بررسی شدند. در گروه تیمار شده با عصاره، هسته سلول‌ها به‌صورت منفرد در مقایسه با گروه کنترل که هسته سلول‌ها در کنار هم و به شکل مجموعه‌اند، درآمدند. همچنین هسته سلول‌های گروه کنترل گرد، درشت، شفاف و سبز رنگ که نشان دهنده زنده بودن آن‌ها و سلول‌های گروه تحت تیمار با عصاره، با هسته نارنجی منفرد، فشرده و متراکم که تاییدی بر مرگ سلولی در آن‌هاست (شکل ۲).



شکل ۲: مورفولوژی سلول‌های HT-29 نمونه کنترل و تیمار شده با غلظت IC50 عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه به کمک رنگ آمیزی آکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید در شرایط کشت در محیط دو بعدی. الف) گروه کنترل و ب) گروه تیمار شده با عصاره. در گروه کنترل هسته سلول‌ها کروی و سبز مشاهده می‌شود در حالی که در گروه تیمار شده با عصاره، درصد قابل توجهی از سلول‌ها آپوپتوزیسی با کروماتین نارنجی رنگ و قطعه قطعه قابل مشاهده است (پیکان‌ها هسته‌ها را نشان می‌دهند).

سلول‌های HT-29 در محیط کشت سه بعدی، پس از تیمار با غلظت ۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره گیاه هلیله سیاه با آکریدین اورنج / اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی شدند. تصاویر حاصل از میکروسکوپ فلورسانس نشان داد که در سلول‌های تیمار شده با عصاره، هسته‌ها نارنجی شدند و نقاط درخشانی در آن‌ها دیده شد که ناشی از متراکم شدن DNA می‌باشد و نشان دهنده وقوع مرگ سلولی از نوع آپوپتوزیس است (شکل ۳).



شکل ۳: مورفولوژی سلول‌های HT-29 نمونه کنترل و تیمار شده با غلظت IC50 عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه به کمک رنگ آمیزی آکریدین اورنج - اتیدیوم بروماید در شرایط کشت بر داربست نانورشته الکتروریسی شده PCL/Gelatin. الف) گروه کنترل و ب) گروه تیمار شده با عصاره. در گروه کنترل هسته سلول‌ها کروی و سبز مشاهده می‌شود در حالی که در گروه تیمار شده با عصاره، درصد قابل توجهی از سلول‌ها آپوپتوزیسی با کروماتین نارنجی رنگ و قطعه قطعه قابل مشاهده است (پیکان‌ها هسته‌ها را نشان می‌دهند).

## ۵- بحث

راه‌کارهای درمانی سرطان به شدت و نوع بدخیمی سرطان در زمان تشخیص بستگی دارد و شامل جراحی، پرتودرمانی و شیمی درمانی است. شیمی درمانی، روشی درمانی با هدف معکوس یا متوقف کردن سرطان‌زایی است. داروهای شیمی درمانی فعلی

قادر به تفکیک بین ریشه کن کردن سرطان و سلول‌های طبیعی نیستند و باعث آسیب به سلول‌های طبیعی می‌شوند که متأسفانه، هیچ عاملی برای دستیابی به داروی استاندارد در حال حاضر در دسترس نیست (۱۲). از جمله عوارض جانبی متداول ناشی از شیمی درمانی مشکلات دستگاه گوارش (حالت تهوع، استفراغ و اسهال)، سرکوب مغز استخوان، ناباروری، کم خونی و آلپوسی هستند (۱۳). جلوگیری از تکثیر و رشد سلول‌های سرطانی و عدم وجود عوارض جانبی به‌عنوان یک هدف حیاتی برای درمان شناخته شده است (۱۴). یافتن ترکیباتی که بتوان از آن‌ها به‌عنوان دارو در ترکیب با داروهای موجود برای از بین بردن سلول‌های سرطانی استفاده کرد، گام مهمی در درمان سرطان است. یکی از علل مؤثر در ایجاد سرطان، ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن است که ناشی از کاهش دفاع آنتی‌اکسیدانتی یا افزایش عوامل اکسید کننده است. بنابراین، چنین به‌نظر می‌رسد که عوامل آنتی‌اکسیدانت نقش مهمی در پیشگیری و یا درمان سرطان داشته باشند (۱۵). وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانت در گیاهان باعث شده است تحقیقات زیادی برای تولید داروهای ضد سرطان روی داروهای گیاهی صورت گیرد. آنتی‌اکسیدانت‌ها مولکول‌هایی هستند که رادیکال‌های آزاد آسیب‌رسان را از بین می‌برند و از این راه سلول‌ها را از آسیب اکسیداتیو DNA و مرگ حفاظت می‌کنند (۱۶). درمان‌های ضد سرطان رایج باعث مرگ یا آپوپتوزیس سلول‌های سرطانی می‌شوند. در سال‌های اخیر تلاش برای شناسایی مواد طبیعی با عوارض جانبی کمتر که قادر به مهار رشد یا ایجاد تاخیر در روند تکثیر سلول‌های سرطانی شود، انجام شده است. بسیاری بر این باورند که عصاره‌های گیاهی قادرند خطر سرطان را کاهش دهند. در این خصوص مطالعات گسترده‌ای روی گیاهان مختلف صورت گرفته است و اثرات سمی و ضدتوموری آن‌ها مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفته است (۱۷).

در مطالعه حاضر، اثر عصاره هیدروالکلی هلیله سیاه روی بقای سلول‌های سرطان روده بزرگ HT-29 در محیط کشت دو بعدی و سه بعدی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره مورد مطالعه به‌صورت وابسته به غلظت باعث مهار تکثیر سلول‌ها شد که نشان دهنده سمیت سلولی عصاره است و همچنین باعث القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی HT-29 شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده از آزمون MTT که معیاری برای بقای سلول‌های زنده است، بعد از ۲۴ ساعت، میزان جذب نوری در غلظت ۱۰ میکروگرم در میکرولیتر عصاره با گروه کنترل اختلاف معنی‌دار نداشت که نشان می‌دهد در این غلظت عصاره اثر کشندگی روی سلول‌ها نداشته است در حالی که عصاره در غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میکرولیتر باعث کاهش میزان جذب نوری توسط سلول‌ها شد که نشان دهنده کاهش تعداد سلول‌ها و اثر کشندگی آن است. با افزایش غلظت عصاره به ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر، باز هم میانگین جذب نوری کاهش یافت و در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میکرولیتر، میانگین جذب نوری به اندازه‌ای کاهش یافت که نصف میزان جذب نوری گروه کنترل بود و به‌عنوان IC50 عصاره در نظر گرفته شد. این نتایج، نشان دهنده اثر کشندگی وابسته به غلظت عصاره روی سلول‌های سرطانی مورد مطالعه است.

جهت تعیین نوع مرگ سلولی، از رنگ آمیزی اکریدین اورنج/ اتیدیوم بروماید استفاده شد. نتایج نشان داد که در گروه‌های تیمار شده، تعداد سلول‌های آپوپتوزیس یافته بیشتر از سلول‌های سالم گروه کنترل بود. در سلول‌های سرطانی HT-29 تیمار شده با عصاره، هسته‌ها منفرد، کوچک، متراکم و نارنجی رنگ در مقایسه با تجمع هسته‌های بزرگ، شفاف و سبزرنگ گروه کنترل، بیانگر وقوع آپوپتوزیس در سلول‌های تیمار یافته بود که می‌تواند نشان دهنده فعال شدن روند آپوپتوزیس در سلول‌ها به‌دنبال تیمار با عصاره باشد.

بر اساس مطالعات انجام شده قبلی، مکانیسم‌های متعددی برای اثر مهاری عصاره هلیله سیاه روی رشد سلول‌های سرطانی پیشنهاد شده است. عصاره هلیله سیاه می‌تواند با ایجاد اختلال در مراحل مختلف چرخه سلولی، از تکثیر بی‌رویه سلول‌های سرطانی جلوگیری کند، یا برخی از ترکیبات موجود در هلیله سیاه می‌توانند فعالیت آنزیم‌های کلیدی که در رشد و متاستاز سرطان نقش دارند را مهار کنند و یا این که عصاره هلیله سیاه می‌تواند از تشکیل عروق جدید (آنژیوژنز) در تومور جلوگیری

کرده و در نتیجه رشد تومور را محدود کند. یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های ضد سرطانی عصاره هلیله سیاه، القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی است. آپوپتوزیس یک فرآیند طبیعی و تنظیم شده برای حذف سلول‌های آسیب دیده یا غیرضروری از جمله سلول‌های سرطانی است. عصاره هلیله سیاه می‌تواند با فعال کردن مسیرهای مختلف آپوپتوزیسی، باعث مرگ سلول‌های سرطانی شود بدون این‌که آسیب قابل توجهی به سلول‌های سالم وارد کند. اثرات ضد سرطانی هلیله سیاه به‌وجود ترکیبات فعال مختلفی از جمله تانن‌ها (مانند جبولینیک اسید، الاژیک اسید و گالیک اسید)، فلاونوئیدها و سایر ترکیبات فنلی نسبت داده می‌شود. این ترکیبات می‌توانند از طریق مکانیسم‌های مختلفی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانتی، ضد التهابی و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ سلولی، اثرات ضد سرطانی خود را اعمال کنند (۸).

در مطالعه‌ای مشابه، توتیوسانا و همکاران (۱۸) به بررسی ترکیبات شیمیایی عصاره هیدروالکلی میوه هلیله سیاه و فعالیت ضد سرطانی آن در برابر سلول‌های سرطان کولون رده HCT 116 پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد که عصاره فعالیت ضد سرطانی قابل توجهی را نشان داد و آپوپتوزیس را در سلول‌های HCT 116 القا کرد. سلیم و همکاران (۱۹) اثر مهارکنندگی عصاره هلیله سیاه را روی تکثیر چندین رده سلول سرطانی بررسی و اثر کشندگی آن روی سلول‌های سرطانی را گزارش کردند. کومار و همکاران (۲۰) اثر چولایژیک اسید استخراج شده از هلیله سیاه را روی سلول‌های رتینوبلاستوما بررسی کردند و اعلام نمودند که عصاره قادر بود به‌صورت معنی‌دار تکثیر سلول‌ها را مهار کند و باعث القای آپوپتوزیس در آن‌ها شود. وانی و همکاران (۲۱) با هدف بررسی فعالیت ضدسرطانی داروهای هومیوپاتی موجود در بازار، توانستند فعالیت ضد سرطانی هلیله سیاه در قالب نانوذره علیه سرطان پستان را گزارش کنند. این نتایج اولیه مطالعات مکانیکی بیشتری را در دو سطح *in vitro* و *in vivo* برای ارزیابی پتانسیل هلیله سیاه به‌عنوان نانو دارو در سرطان پستان پیشنهاد کرده‌اند. شانکارا و همکاران (۲۲) با بررسی اثر عصاره هلیله سیاه روی چندین رده سلول سرطانی بیان کردند که عصاره دارای اثرات کشندگی سلولی روی تمام رده‌های سلولی بود و بیشترین اثر را روی سلول‌های سرطانی ریه انسان داشت. لی و همکاران (۲۳) اثر عصاره *Terminalia bellerica* را روی سلول‌های سرطانی بررسی کردند که نتایج آن‌ها نشان دهنده اثر ضد سرطانی این عصاره به‌ویژه روی سلول‌های سرطانی سینه و کولون بود.

در مطالعه حاضر، نتایج حاصل از کشت سلول‌ها در محیط کشت سه بعدی (بر روی داربست) نیز نشان داد که عصاره به‌صورت وابسته به غلظت سبب مهار رشد و القای سمیت سلولی در سلول‌ها شد به‌طوری‌که عصاره در غلظت‌های ۱۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر در مقایسه با گروه کنترل اثر کشندگی معنی‌دار نداشت ولی در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر باعث مهار رشد ۵۰ درصدی سلول‌ها شد و این غلظت به‌عنوان IC50 عصاره در محیط سه بعدی در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از رنگ آمیزی آکریدین اورنج/اتیديوم بروماید در محیط سه بعدی نیز نشان دهنده وقوع تغییرات آپوپتوزیسی در هسته سلول‌ها مشابه محیط کشت دوبعدی بود.

کشت سلول‌ها بر داربست‌ها و محیط‌های سه بعدی سبب فراهم آوردن شرایطی می‌شود که از جنبه‌های مختلف همچون مورفولوژی و پروفایل بیان ژنی بسیار نزدیک به سلول‌ها در درون بدن می‌باشند. داربست‌های نانوفیبری الکترورسی شده از جمله بسترهای مورد استفاده برای ایجاد محیط کشت سه بعدی شبیه درون بدن جهت کشت سلول‌ها در آزمایشگاه است (۵). در این مطالعه از داربست نانوفیبری الکترورسی شده PCL/gelatin برای کشت سلول‌های سرطانی کولورکتال استفاده شد. نتایج حاصل از سنجش بقای سلولی در مطالعه حاضر نشان داد که تاثیر عصاره بر بقای سلول‌ها در هر دو محیط به‌صورت وابسته به غلظت بود. نکته قابل توجه در رابطه با اثر کشندگی عصاره در محیط سه بعدی در مقایسه با محیط کشت دو بعدی این بود که IC50 عصاره در

محیط کشت سه بعدی ۲۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر بود در حالی که در محیط کشت دو بعدی ۵۰۰ میکروگرم بر میکرولیتر بود. به عبارت دیگر عصاره با غلظت کم‌تری در محیط کشت سه بعدی در مقایسه با محیط کشت دو بعدی قادر به مهار رشد سلول‌ها و القای آپوپتوزیس در آن‌ها بود که می‌توان چنین استنباط کرد که استفاده از داربست اثر کشندگی عصاره را افزایش داده است و عصاره توانسته است با غلظت کم‌تری در مقایسه با محیط کشت دو بعدی اثر خود را اعمال کند. تعداد مطالعاتی که به بررسی اثر فاکتورهای ضد سرطان روی سلول‌های سرطانی کشت شده روی داربست پرداخته‌اند محدود است. با این حال، در یک مطالعه مشابه، گوپرو و همکاران (۲۴) سلول‌های سرطانی سینه را روی داربست نانوفیبر الکترورسی شده PCL کشت دادند و اثر داروی ضد سرطان کربوپلاتین را روی آن‌ها بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که داربست باعث کاهش رفتار تهاجمی سلول‌ها شد و باعث شد آن‌ها به وضعیت خفته در بیابند. از این‌رو می‌توان این فرضیه را مطرح نمود که احتمالاً یک قابلیت کشندگی عصاره در غلظت پایین‌تر در محیط کشت سه بعدی می‌تواند به اثر داربست در کاهش رفتار تهاجمی سلول‌ها نسبت داده شود که می‌تواند تاییدی بر نتایج مطالعه حاضر باشد. همچنین، کازانتسوا و همکاران (۲۵) چهار نوع سلول سرطانی (سینه، کولورکتال، ملانوما و نوروبلاستوما) را روی داربست‌های متخلخل سه بعدی هیبریدی متشکل از نانوالیاف سرامیکی خودآراسته و بسیار هم‌راستا کشت دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که نانوالیاف تقویت‌شده با گرافن با نسبت ابعاد بسیار بالا و نانوتوپولوژی سفارشی می‌توانند به‌طور قابل توجهی بر بیان ژن سلول‌های سرطانی تاثیر بگذارند. نکته قابل توجه این است که جهت‌گیری و مورفولوژی نانوالیاف به تنهایی و بدون هیچ محرک خارجی، باعث تنظیم بالا و پایین انتخابی گروه‌های نشانگر ژنی خاص برای هر نوع سلول سرطانی می‌شود. علاوه بر این، نشان داده شده است که این داربست می‌تواند برای آزمایش داروهای ضد سرطان مورد استفاده قرار گیرد، زیرا تغییرات در بیان ژن پس از درمان سلول‌های سرطان سینه با میتوماکسین C قابل تشخیص است. این پژوهش نشان می‌دهد که داربست‌های نانوالیافی می‌توانند ابزاری قدرتمند برای مطالعه مکانیسم‌های رشد سرطان و تشکیل تومور و همچنین برای آزمایش داروهای ضد سرطان باشند، زیرا امکان دستکاری انتخابی رفتار سلول‌های سرطانی از طریق طراحی ساختار نانوالیاف فراهم می‌شود.

ریجال و همکاران (۲۶) نیز بیان کردند کشت سلول‌های سرطانی روی داربست پلیمری سنتتیک منفذ دار ملزومات پایه‌ای مطلوب برای کشت سه بعدی سلول‌ها در آزمایشگاه و در داخل بدن را فراهم می‌کند. بر اساس نتایج به‌دست آمده در این مطالعه مشخص شد که داربست نانورشته‌ای برای چسبندگی، قطبیت و مورفولوژی سلول مناسب است. گفته شده است برخلاف کشت سلول‌های سرطانی در ماتریکس ژلی یا اسفروئید تومور، کار کردن با مدل داربست سه بعدی راحت‌تر است. علاوه بر استفاده آن در ایمونوهیستوشیمی، فرصت مناسبی برای مطالعه عوامل محلول در محیط کشت فراهم می‌کند. به‌عنوان مثال، در داربست نانوفیبری فضای خالی بین توده سلول‌ها اجازه می‌دهد مواد شیمیایی محلول و پروتئین‌های ترشح شده منتشر شوند. همچنین، داربست نانوفیبر امکان فراهم نمودن شرایط کشت اختصاصی مانند افزودن فاکتورهای رشد و کموکین‌ها و رهایش تدریجی آن‌ها فراهم می‌کند و به این ترتیب می‌تواند اطلاعات جدیدی در خصوص مکانیسم‌هایی که تکثیر و متاستاز تومور را تنظیم می‌کنند فراهم کند. می‌توان فرآورده‌های سلولی محلول ترشح شده از داربست را جمع‌آوری نمود و توسط آزمون الایزا شناسایی کرد. وجود داربست، نیروهای مکانیکی، بیان ژن و تنظیم سیگنال‌دهی سلول را تغییر می‌دهد. داربست سختی مناسب سوپسترا که برای اعمال سلول زنده حیاتی است را فراهم می‌کند. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که سختی ماتریکس می‌تواند روی تمایز سلول بنیادی، مهاجرت سلول‌ها از طریق گیرنده‌های غشای سلول و فعال‌سازی اکتین اسکلت سلولی اثر بگذارد (۵).

## ۶- نتیجه‌گیری

طی سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به محصولات طبیعی به‌عنوان داروی جایگزین برای درمان انواع سرطان به‌واسطه خواص درمانی آن‌ها شده است. در این رابطه بر اساس نتایج مطالعه حاضر و مطالعات مشابه، استفاده از روش‌های *in vitro* روشی مطمئن برای تایید اثر ضد سرطانی میوه گیاه هلپله سیاه و یا سایر گیاهان با قابلیت ضد سرطانی است. بر اساس نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر، عصاره هیدروالکلی هلپله سیاه توانست روی سلول‌های سرطانی به‌صورت وابسته به غلظت اثر کشندگی داشته باشد و این اثر در محیط سه بعدی بیشتر از محیط دو بعدی بود. لذا، کشت سلول‌های سرطانی در محیط کشت سه بعدی می‌تواند مدلی مناسب از شبیه‌سازی سرطان در آزمایشگاه را فراهم کند و می‌توان تاثیر عوامل ضد سرطان روی سلول‌ها را در شرایطی شبیه درون بدن بررسی کرد. از سوی دیگر این روش می‌تواند برای درک بهتر مکانیسم‌های سلولی و مولکولی مرتبط با سرطان کارآمدتر از محیط کشت دوبعدی باشد که لازم است در مطالعات آینده مورد بررسی قرار گیرد.

## ۷- منابع

1. Roshandel G, Ghasemi-Kebria F, Malekzadeh R. Colorectal Cancer: Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Cancers (Basel)*. 2024; 17; 16(8):1530. doi: 10.3390/cancers16081530.
2. Canellas-Socias A, Sancho E, Battle E. Mechanisms of metastatic colorectal cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2024; 21(9): 609-625. doi: 10.1038/s41575-024-00934-z.
3. Eng C, Yoshino T, Ruíz-García E, Mostafa N, et al. Colorectal cancer. *Lancet*. 2024; 20; 404 (10449): 294-310. doi: 10.1016/S0140-6736(24)00360-X.
4. Ferro Y, Maurotti S, Tarsitano MG, Lodari O, et al. Therapeutic Fasting in Reducing Chemotherapy Side Effects in Cancer Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*. 2023; 8; 15(12): 2666. doi: 10.3390/nu15122666. PMID: 37375570; PMCID: PMC10303481.
5. Chen, S., Boda, S.K., Batra, S.K., Li, X., et al. Emerging Roles of Electrospun Nanofibers in Cancer Research. *Adv Healthc Mater*. 2018; 7(6): e1701024. doi:10.1002/adhm.201701024.
6. Afewerki S, Sheikhi A, Kannan S, Ahadian S, et al. Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering: Towards natural therapeutics. *Bioeng Transl Med*. 2018; 28; 4(1):96-115. doi: 10.1002/btm2.10124.
7. Youn BY, Kim JH, Jo YK, Yoon S, et al. Current Characteristics of Herbal Medicine Interventions for Cancer on Clinical Databases: A Cross-Sectional Study. *Integr Cancer Ther*. 2023; 22:15347354231218255. doi: 10.1177/15347354231218255. PMID: 38099482; PMCID: PMC10725141.
8. Hassan Bulbul MR, Uddin Chowdhury MN, Naima TA, Sami SA, et al. A comprehensive review on the diverse pharmacological perspectives of Terminalia chebula Retz. *Heliyon*. 2022; 14; 8(8): e10220. doi: 10.1016/j.heliyon. 2022. e10220.
9. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007; 35(4): 495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.
10. Safarzadeh E, Sandoghchian Shotorbani S, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment. *Adv Pharm Bull*. 2014; 4(Suppl 1): 421-7. doi: 10.5681/apb.2014.062.

11. Sims-Mourtada J, Niamat RA, Samuel S, Eskridge C, et al. Enrichment of breast cancer stem-like cells by growth on electrospun polycaprolactone-chitosan nanofiber scaffolds. *Int J Nanomedicine*. 2014; 19(9): 995-1003. doi: 10.2147/IJN.S55720.
12. B, Ezeogu, L., Zellmer, L, Yu, B., et al. Protecting the normal in order to better kill the cancer. *Cancer medicine*. 2015; 4(9): 1394-1403.
13. Azmi, A. Adopting network pharmacology for cancer drug discovery. *Current drug discovery technologies*. 2013; 10(2): 95-105.
14. Ciardiello F, Ciardiello D, Martini G, Napolitano S, et al. Clinical management of metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2022; 72(4): 372-401. doi: 10.3322/caac.21728.
15. Alcindor T, Beauger N. Oxaliplatin: a review in the era of molecularly targeted therapy. *Current oncology*. 2011; 18(1): 18.
16. Hayes JD, Dinkova-Kostova AT, Tew KD. Oxidative Stress in Cancer. *Cancer Cell*. 2020; 38(2): 167-197.
17. Njoya EM. Medicinal plants, antioxidant potential, and cancer. Academic Press. 2021; chapter21: 249-357.
18. Thoithoisana Devi S, Devika Chanu K, Singh NB, Chaudhary SK, et al. Chemical Profiling and Therapeutic Evaluation of Standardized Hydroalcoholic Extracts of Terminalia chebula Fruits Collected from Different Locations in Manipur against Colorectal Cancer. *Molecules*. 2023; 23; 28(7): 2901. doi: 10.3390/molecules28072901.
19. Saleem, A, Husheem, M, Härkönen P, Pihlaja, K. Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of Terminalia chebula retz. fruit. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 81(3): 327-336.
20. Kumar N, Gangappa D, Gupta G, Karnati R. Chebulagic acid from Terminalia chebula causes G1 arrest, inhibits NFκB and induces apoptosis in retinoblastoma cells. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014; 14(1): 1-10.
21. Wani K, Shah, N, Prabhune A, Jadhav A, et al. Evaluating the anticancer activity and nanoparticulate nature of homeopathic preparations of Terminalia chebula. *Homeopathy*. 2016; 105(4): 318-326.
22. Shankara B, Ramachandra R, Y, Rajan SS, Ganapathy PS, et al. Evaluating the anticancer potential of ethanolic gall extract of Terminalia chebula (Gaertn.) Retz. (Combretaceae). *Pharmacognosy research*. 2016; 8(3): 209.
23. Li S, Ye T, Liang L, Liang W, et al. Anti-cancer activity of an ethyl-acetate extract of the fruits of Terminalia bellerica (Gaertn.) Roxb. through an apoptotic signaling pathway in vitro. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*. 2018; 5(4): 370-379.
24. Guiro K, Patel SA, Greco SJ, Rameshwar P, et al. Investigating breast cancer cell behavior using tissue engineering scaffolds. *PloS one*. 2015; 10(4): e0118724.
25. Kazantseva J, Ivanov R, Gasik M, Neuman T, et al. Graphene-Augmented Nanofiber Scaffolds Trigger Gene Expression Switching of Four Cancer Cell Types. *ACS Biomater Sci Eng*. 2018; 14; 4(5): 1622-1629. doi 10.1021/acsbiomaterials.8b00228.
26. Rijal G, Bathula C, Li W. Application of synthetic polymeric scaffolds in breast Cancer 3D tissue cultures and animal tumor models. *International Journal of Biomaterials* 2017; 2017:8074890. doi: 10.1155/2017/8074890.