Cell and Tissue Journal 14(4) (2023) 293 – 308

Journal of Cell and Tissue
http://jct.araku.ac.ir

Evaluation of the Effect of Ashwagandha (*Withanaia somnifera*) Extract on Survival Rate and Expression of *P53* Gene in Ovarian Cancer (A2780 cell line)

Mahya Modaresi M [a], Nikunahad Lotfabadi N [a]*, Haghirosadat F [b]

[a] Department of Biology, Faculty of Sciences, Science and Art University, Yazd, Iran

[b] Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, Faculty of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Original Article

Use your devi

ce to scan and read the article online

Citation: Modaresi M, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghirosadat F. Evaluation of the Effect of Ashwagandha (Withanaia somnifera) Extract on Survival Rate and Expression of P53 Gene in Ovarian Cancer (A2780 cell line). Journal of Cell and Tissue . 2023; 14(4): 293-308.

https://10.61186/JCT.14.4.293.

KEYWORDS

Ashwagandha
ovarian cancer
***P53* gene**
Withanaia somnifera

ABSTRACT

Aim: As the second leading cause of death worldwide, cancer has been a long-standing and rapidly evolving focus of biomedical research and practice. Ovarian cancer is one of the deadly malignancies of women, which is known as the "silent killer". Because its symptoms usually appear when the disease has reached advanced stages and is mostly incurable. On the other hand, currently common treatment methods are associated with various limitations, failures and side effects, which have made researchers pay more attention to the compounds extracted from plants as anti-tumor and anti-cancer agents in the last two decades. The studies conducted on the various properties of Ashwagandha (Withanaia somnifera) show that this plant has therapeutic effects and anti-cancer properties that can even be effective on the process of apoptosis mediated by different genes, including *P53*. Today, *P53* is known as a gene It has a key role in all types of cancers and mutations in this gene have been observed in 60% of ovarian cancers. Therefore, the aim of this study is to investigate the cytotoxic effects of the hydroalcoholic extract of Ashwagandha (*Withanaia somnifera*) and the changes in *P53* gene expression in response to this substance in ovarian cancer cells (cell line A2780).

Material and method: For this purpose, extraction of Ashwagandha plant was done using soaking method. Then, the compounds present in the extract were determined using standard phytochemical tests. Then A2780 cells were treated with different concentrations of Ashwagandha extract for 24, 48 and 72 hours. The effects of this extract on cell survival were evaluated using the MTT test, and IC50 was calculated. Then, A2780 cells were exposed to concentrations of 250 and 500 µg/ml for 24 and 48 hours, and the level of *P53* gene expression was investigated by Real-Time PCR. Finally, statistical analysis and data interpretation was done using GraphPad Prism software.

Results: MTT results showed that Ashwagandha extract at concentrations of 62.5, 125, 250, 500, and 750 µg/ml significantly decreased cell viability in a time- and concentration-dependent manner. The lowest percentage of survival rate is related to the concentration of 750 µg/ml and the time of 72 hours, while the highest percentage is related to the concentration of 62.5 µg/ml and the

* Corresponding author. Tel.: 05138437092
E-mail address: nikoonahah@sau.ac.ir
DOI: https://10.61186/JCT.14.4.293
Received: 26 May. 2023; Received in revised form: 25 Nov. 2023; Accepted: 13 Dec. 2023
Original Article
©Author

time of 24 hours. After 24, 48, and 72 hours, respectively, IC_{50} was obtained at concentrations of 512.6, 339, and 226.6 µg/ml, and Real-Time PCR results showed that the expression of the P53 gene during 24 hours of treatment with concentrations of 250 and 500 µg/ml of extract had increased significantly. Also, increasing the concentration of the extract had a significant effect on the expression of this gene.

Conclusion: The results of this study indicate the cytotoxic effect of Ashwagandha extract on ovarian cancer cells, and by increasing the expression of the P53 gene, it can induce anti-cancer effects. It is hoped that by knowing the mechanisms of action of this medicinal plant and designing new drugs, it will be possible to stop the progression of ovarian cancer and thus help to increase the life span of these patients against this silent killer.

سلول و بافت، دوره ۱۴، شماره ۴، سال ۱۴۰۲، صفحات ۲۹۳ تا ۳۰۸

سلول و بافت

تاثیر عصاره گیاه آشواگاندا (*Withanaia somnifera*) بر میزان بقا و بیان ژن *P53* در سرطان تخمدان (رده سلولی A2780)

سیده محیا مدرسی[۱]، نرگس نیکونهاد لطف آبادی[۱*]، فاطمه حقیرالسادات[۲]

[۱] گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه علم وهنر، یزد، ایران

[۲] گروه علوم و فناوری های نوین، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

واژگان کلیدی

آشواگاندا
سرطان تخمدان
ژن *P53*
Withanaia somnifera

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۰۵

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۲۲

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره هیدروالکلی آشواگاندا (*Withanaia somnifera*) و بررسی تغییرات بیان ژن *P53* در پاسخ به این ماده در سلولهای سرطان تخمدان (رده سلولی A2780) است.

مواد و روش ها: بدین منظور سلول‌های A2780 با غلظت‌های مختلف عصاره آشواگاندا به‌مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. اثرات این عصاره بر روی میزان بقای سلول‌ها با استفاده از MTT و میزان بیان ژن *P53* به‌روش Real-Time PCR مورد بررسی قرارگرفت. در نهایت آنالیز آماری و تفسیر داده‌ها با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism انجام شد.

نتایج: نتایج MTT نشان داد که عصاره آشواگاندا در غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ µg/ml به‌صورت وابسته به زمان و غلظت به‌طور معناداری موجب کاهش حیات سلولی شده است به‌ترتیب پس از گذشت ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت IC50 در غلظت‌های ۵۱۲/۶، ۳۳۹ و ۲۲۶/۶ میکروگرم بر میلی لیتر به‌دست آمد و همچنین نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن P53 طی ۲۴ ساعت تیمار با غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره به‌طور معناداری افزایش یافته است. همچنین افزایش غلظت عصاره بر روی میزان بیان این ژن تاثیر معناداری داشته است.

نتیجه گیری: نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر اثر سایتوکسیک عصاره آشواگاندا بر روی سلول‌های سرطان تخمدان بوده و با افزایش بیان ژن *P53* می تواند سبب القای اثرات ضد سرطانی باشد.

۱- مقدمه

سرطان به‌عنوان دومین عامل مرگ و میر در سراسر جهان، کانون تحقیقات و عمل بیومدیکال، طولانی مدت و به سرعت در حال تکامل بوده است (۱). واژه سرطان به یک بیماری اطلاق نمی‌شود، بلکه مجموعه‌ای از بیماری های مختلف را نشان می‌دهد که با کیفیت‌های خاصی مرتبط هستند. بسته به تعریف استفاده شده، می‌توان حداقل صد نوع مختلف سرطان را شناسایی کرد. سلول‌های سرطانی از سلول‌های طبیعی انسان مشتق می شوند و بنابراین بسیاری از ویژگی‌های سلول‌های اصلی را حفظ می‌کنند (۲). این بیماری با تکثیر سلولی کنترل نشده، تهاجم، متاستاز، رگزایی و مرگ برنامه ریزی شده سلولی

* نویسنده مسئول؛ تلفن: ۰۵۱۳۸۴۳۷۰۹۲

آدرس پست الکترونیک: nikoonahah@sau.ac.ir

(آپوپتوزیس) مشخص می‌شود (۳). فعال شدن انکوژن‌ها و غیرفعال سازی ژن‌های سرکوب کننده تومور از علائم مهم سرطان است. تغییرات و جهش‌های ژنومی در سلول‌های سرطانی به‌عنوان مهم‌ترین نقطه عطف پیشرفت سرطان در نظر گرفته می‌شود (۴). اولین ژن سرکوب‌گر تومور که شناسایی شده است *35P* است که اغلب در انواع مختلفی از سرطان‌های انسانی غیرفعال می‌شود (۵). تقریبا ۵۸ درصد سرطان‌ها در سلول‌های اپی‌تلیال رخ می‌دهد و به‌عنوان کارسینوماها دسته بندی می‌شوند. سرطان‌ها انواع مختلفی دارند که شایع‌ترین آن‌ها سرطان پستان، خون، ریه و تخمدان است (۶). سرطان تخمدان دومین بدخیمی شایع زنان در کشورهای توسعه یافته و سومین بدخیمی شایع زنان در کشورهای در حال توسعه است (۷) (۸). سرطان تخمدان به‌دلیل شروع آهسته و خوش خیم و بی خطر بودن آن، عوارض و مرگ و میر بالایی دارد زیرا ممکن است تا زمانی که متاستاز پیدا نکند، تشخیص داده نشود (۹). در سطح جهان، سالانه ۹۵۹۳۱۳ مورد جدید سرطان تخمدان تشخیص داده می‌شود که ۲۵۲۷۰۲ مورد مرگ ناشی از سرطان است (۱۰).

آپوپتوزیس مرگ برنامه ریزی شده ژنتیکی سلول‌هایی است که دیگر مورد نیاز نیستند یا تهدیدی برای ارگانیسم هستند. کاهش آپوپتوزیس منجر به افزایش نرخ بقای سلولی می‌شود که منجر به ایجاد سرطان می‌شود . جهش یا حذف ژن *P53* شانس ایجاد تومور را به‌طور چشمگیری افزایش می‌دهد، زیرا سلول‌های دارای DNA آسیب دیده به تقسیم کنترل نشده ادامه می‌دهند. مواد شیمیایی، تشعشعات و ویروس‌ها می‌توانند به *P53* آسیب برسانند (۱۱). علیرغم اکتشافات عمده در درمان سرطان، تاکنون، نرخ کلی مرگ و میر مرتبط با سرطان نسبتا ثابت مانده است. علاوه بر این، روش‌های سنتی و جدیدتر مورد استفاده برای درمان سرطان اثرات نامطلوبی دارند که بر کیفیت زندگی تاثیر منفی می‌گذارند. از این رو، جستجو برای درمان های موثرتر و قابل تحمل‌تر ادامه دارد (۱۲). بسیاری از روش‌ها و داروها برای درمان سرطان در دسترس هستند که بسیاری از آن‌ها در حال مطالعه هستند. برخی از آنها مانند جراحی و پرتودرمانی درمان‌های «موضعی» هستند که برای درمان یک تومور یا ناحیه خاصی از بدن استفاده می‌شوند. درمان‌های دارویی (مانند شیمی‌درمانی، هورمون درمانی، ایمنوتراپی یا درمان هدفمند) اغلب درمان‌های «سیستمیک» نامیده می‌شوند، زیرا می‌توانند کل بدن را تحت تاثیر قرار دهند. از دیگر روش‌ها می‌توان به پیوند سلول‌های بنیادی یا مغز استخوان، استفاده از لیزر برای درمان سرطان، انتقال و اهدای خون، طب مکمل و یکپارچه، مکمل‌های غذایی اشاره کرد (۱۳).

گیاهان دارویی بهترین جایگزین برای درمان و یا جلوگیری از عوارض جانبی مختلف جسمی ناشی از شیمی درمانی و پرتودرمانی می‌باشند. این گزینه درمانی می‌تواند از آسیب رساندن به سلول‌های سالم و طبیعی در نزدیکی سلول‌های سرطانی جلوگیری کند (۱۴). آشواگاندا یک گیاه دارویی آیورودا است که از عصاره ریشه های *Withania somnifera* ، درختچه ای همیشه سبز کم رشد که بومی هند و آسیای جنوب شرقی است، به دست می‌آید. *Withania somnifera* که به آن Ashwagandha، Indian cinseng یا IndianWinter نیز گفته می‌شود در مطالعات مختلف آزمایش شده است و ویژگی‌های ضد توموری قابل توجهی را نشان داده است که چندین عامل افزایش تومورزایی را هدف قرار می‌دهد (۱۵). تاکنون برای آشواگاندا ابعاد گسترده‌ای از فعالیت های دارویی مانند خواص آنتی اکسیدانتی، ضد باکتری، ضد قارچ، ضد سرطان، ضد التهاب، ضد استرس، ضد پارکینسون، ضد آلزایمر، محافظ قلبی، تقویت کننده سلامت عصبی و فیزیکی، آرام بخش، محافظت از سلول عصبی، ضد دیابت،داروی قابض، مقوی کبد، لاغری، آسم، برونشیت، زخم، افزایش قوای جنسی و تقویت حافظه ثبت شده است. پتانسیل آنتی اکسیدانتی بالای آن ممکن است به‌دلیل وجود فنل‌ها و فلاونوئیدها باشد، اما فعالیت درمانی آن عمدتا توسط ویتانولیدها اعطا می‌شود. پتانسیل آنتی اکسیدانتی نیز به‌طور مستقیم با پتانسیل ضد سرطانی آن در ارتباط است (۱۶).

این گیاه از خانواده گیاهان گل‌دار متنوع *Solanaceae* است (۱۷). دارای خواص آنتی اکسیدانتی قوی است که به محافظت در برابر آسیب سلولی ناشی از رادیکال‌های آزاد کمک می‌کند. طی تحقیقات اخیر مشخص شده است که ترکیبات موجود در این گیاه دارای اثرات ضد سرطانی بهتری نسبت به برخی از داروهای معمول مورد استفاده در شیمی درمانی می‌باشد. همچنین اخیرا به‌عنوان درمان اولیه در عفونت های ویروسی، عفونت مزمن ریه و HIV پیشنهاد شده است (۱۸). این گیاه مخزنی از ترکیبات گیاهی متنوع مانند آلکالوئیدها، استروئیدها، فلاونوئیدها، فنل‌ها، ترکیبات حاوی نیتروژن و عناصر کمیاب است. ترکیبات بیولوژیکی اصلی که از قسمت‌های مختلف گیاه یافت می‌شوند، تری‌ترپنوئیدهای لاکتون استروئیدی C-82 هستند که به ویتانولیدها نیز شناخته می‌شوند که بیشتر از ویتافرین A تشکیل شده‌اند (۱۹) ویتانولیدها، آلکالوئیدهای اصلی هستند که به‌دلیل ماهیت بسیار اکسیژن دار، پتانسیل ضد سرطانی خود را نشان می‌دهند. این گیاه در مبارزه با انواع سرطان‌ها بسیار موثر است. روده بزرگ، پستان، ریه، پروستات، پوست، خون، کبد و کلیه. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که این گیاه در برابر سرطان پستان و به‌دنبال آن سرطان روده بزرگ، ریه، پروستات و خون موثرتر است (۱۶). باتوجه به خواص ضد سرطانی و آنتی اکسیدانتی ترکیبات آشواگاندا، هدف از انجام این مطالعه بررسی اثر عصاره آشواگاندا بر بقا و بیان ژن *P53* در رده سلولی A2780 سرطان تخمدان می باشد.

۲- مواد و روش ها

این تحقیق از نوع تجربی آزمایشگاهی است که مراحل انجام آن به شرح ذیل می باشد.

عصاره گیری با روش خیساندن: جهت تهیه عصاره آشواگاندا از روش خیساندن استفاده شد. در ابتدا پودر ریشه آشواگاندا تهیه و به‌منظور گرفتن عصاره، گیاه پودر شده با حلال هیدروالکلی (با نسبت ۵۰/۵۰ شامل ۵۰ درصد اتانول ۹۶ درصد و ۵۰ درصد آب مقطر استریل) مخلوط شده و در دستگاه شیکر انکوباتور برای مدت زمان ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده سپس عصاره حاصله فیلتر شده، درون انکوبانور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا عصاره صمغ مانند به‌دست آید. بعد از گذشت ۲ روز عصاره خشک جمع آوری و در یخچال نگه‌داری شد.

تست‌های کیفی تشخیص حضور ترکیبات فیتو شیمیایی در عصاره گیاهی: با استفاده از تست‌های استاندارد فیتوشیمیایی وجود یا عدم وجود ترکیباتی شامل فلاونوئید، ترپنوئید، آلکالوئید، تانن، استروئید، ساپونین، استرول، گلیکوزید، پروتئین و ویتامین C در عصاره بررسی شد.

کشت سلول: رده سلولی سرطان تخمدان انسان (A2780) از بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شد. برا ی کشت سلول از محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) استفاده شد و سلول‌ها درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 و رطوبت ۹۵ درصد نگه‌داری شدند.

بررسی اثر سمیت سلولی عصاره آشواگاندا (تست MTT): در این مرحله تعداد ۱۰ هزار سلول A2780 در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت زمان دهی جهت چسبیدن سلول‌ها به کف، محیط کشت رویی تخلیه و ۲۰۰ میکرولیتر از عصاره با غلظت‌های ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر به هر چاهک اضافه و این تست برای بازه زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. پس از طی هر بازه زمانی سلول‌ها در معرض MTT و سپس DMSO (Dimethyl

sulfoxide) قرار داده شدند. در نهایت، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه الایزا مدل ELx800 (ساخت کمپانی Biotek آمریکا) بررسی شد. در تست MTT میزان بقای سلولی با فرمول زیر به دست می آید.

درصد بقای سلولی = جذب متوسط نمونه‌های تیمار شده/ جذب متوسط نمونه‌های کنترل ×۱۰۰

محاسبه IC_{50}: داده‌های به‌دست آمده طی زمان های ۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت به کمک نرم افزار Excel مورد بررسی قرار گرفته و میزان غلظت IC_{50} جهت به‌دست آوردن در صد توان حیاتی سلول‌های A2780 در مقابل دوز های مختلف تیمار با استفاده از نرم افزار prism محاسبه شد.

بررسی بیان ژن P53: ابتدا سلول‌ها به تعداد ۵۰۰ هزار عدد درون هر چاهک از پلیت ۶ خانه کاشته و پس از ۲۴ ساعت زمان‌دهی جهت چسبیدن سلول‌ها به کف، غلظت‌های۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره به هر چاهک اضافه شد. سلول‌ها با این غلظت‌ها به‌مدت ۴۲ و ۸۴ ساعت تیمار شدند سپس مطابق دستور العمل کیت (شرکت پارس توس زیست فن آور، مشهد، ایران) استخراج RNA انجام شد. جهت اطمینان از کیفیت RNA استخراج شده، نمونه‌ها روی ژل آگارز ۲ درصد مشاهده شدند. و برای تعیین میزان غلظت RNA استخراج شده، از دستگاه نانودراپ (ynamreG,aneJ acitylanA Analytica Jena,Germany) استفاده شد. جهت بررسی تغییرات بیان ژن در سطح رونویسی، DNA مکمل توسط آنزیم نسخه بردار معکوس از نمونه‌ی RNA ساخته می‌شود . جهت سنتز c DNA از کیت سنتز c DNA (شرکت پارس توس زیست فن آور، مشهد، ایران) استفاده شد. سپس طبق برنامه دمایی جدول ۱ با استفاده از دستگاه RCP سنتز ANDc انجام شد. جهت تکثیر قطعه ژنی مورد نظر، یک جفت آغازگر(Primer) اختصاصی برای ژن‌های *P53* و *GAPDH* طراحی شد که شامل آغازگرهای forward و Reverse است. توالی آغازگرها مطابق جدول ۲ می باشد. ژن *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی منظور شد. در واکنش RT-PCR، جهت تکثیر ژن هدف از آغازگرهای اختصاصی ژن *P53* استفاده شد و از ژن *GAPDH* به‌عنوان Housekeeping gene مورد استفاده قرار گرفت. هدف از انجام واکنش Real-time PCR سنجش میزان بیان ژن *P53* تحت تاثیر عصاره آشواگاندا می باشد. در این تحقیق از Hot Taq Sybergreen qPCP master Mix (n.k) ساخت شرکت پارس طوس (مشهد، ایران) استفاده گردید و طبق برنامه دمایی جدول ۳ واکنش در دستگاه ریل تایم انجام شد. پس از پایان واکنش به‌منظور تایید اختصاصی بودن محصول و عدم حضور محصولات غیر اختصاصی، آنالیز منحنی ذوب صورت گرفت. جهت ارزیابی تغییرات بیان ژن مورد نظر از روش $۲^{(TC\Delta\Delta)}$ استفاده شد.

جدول ۱: سیکل‌های دمایی سنتز c DNA

دما	زمان
۲۵ درجه سانتی‌گراد	۱۰ دقیقه
۴۷ درجه سانتی‌گراد	۶۰ دقیقه
۸۵ درجه سانتی‌گراد	۵ دقیقه
۴ درجه سانتی‌گراد	۲ دقیقه

جدول:۲ مشخصات آغازگرها

نام ژن	توالی	TM
P53 F	TGCAGCTGTGGGTTGATTCC	59
P53 R	AAACACGCACCTCAAAGCTGTTC	
GAPDH F	AGCCACATCGCTCAGACAC	60
GAPDH R	GCCCAATACGACCAAATCC	

جدول ۳: برنامه زمانی و دمایی واکنش Real Time PCR

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
Pre-denaturing	94°C	۱۰ دقیقه	۱
Denaturing	95°C	۱۵ ثانیه	۳۵
Annealing	57°C	۳۰ ثانیه	
Extension	72°C	۳۰ ثانیه	
Final extension	72°C	۵ دقیقه	۱

۳- آنالیز آماری

داده‌ها به‌صورت Mean ± SD گزارش شدند. آنالیز آماری داده های حاصل از این مطالعه با استفاده از نرم افزار Prism Graph Pad صورت گرفت. جهت بررسی تفاوت‌های ایجاد شده ناشی از عصاره آشواگاندا بر میزان بقای سلول‌های تخمدان (A2780) و بیان ژن *P53* در سلول‌های تیمار شده با عصاره آشواگاندا از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) و T- tset- در سطح معناداری ۰/۰۵ ($p \leq ۰/۵۰$) استفاده شد.

۴- نتایج

بررسی حضور ترکیبات فیتوشیمیایی در عصاره

آزمون های فیتوشیمیایی انجام شده بیانگر وجود ترکیبات متفاوتی مانند الکالوئیدها، تری ترپنوئید ها، ویتامین C، پروتئین‌ها، گلیکوزیدها، استرول ها، ساپونین ها، فلاونوئید، تانن ها و استروئیدها در عصاره ریشه آشواگاندا مطابق جدول ۴ می‌باشد.

جدول ۴: ترکیبات شیمیایی اصلی موجود در ریشه آشواگاندا

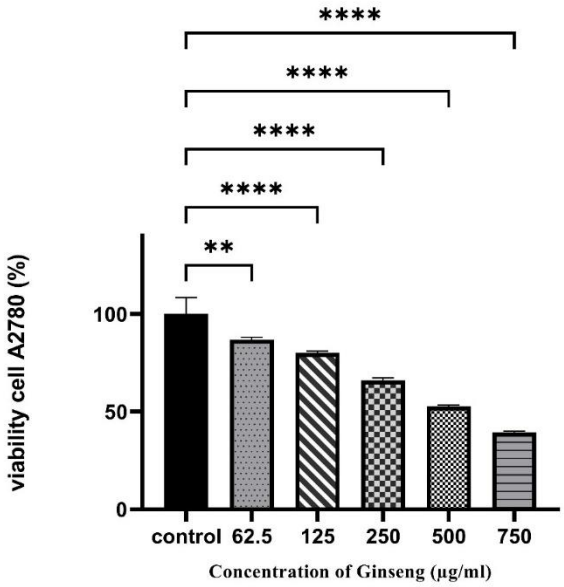
نام ترکیب شیمیایی	نتیجه آزمون عصاره‌ی ریشه آشواگاندا
ترکیبات فلانوئید	+
ترکیبات تری ترپنوئید	+
ترکیبات آلکالوئید	+
تانن	+
استروئید	+
ساپونین ها	+
استرول	+
گلیکوزید	+
پروتئین ها	+
ویتامین C	+

بررسی اثر عصاره آشواگاندا بر رشد رده ی سلولی A2780

با استفاده از آزمون MTT اثر عصاره بر بقای رده‌ی سلولی بررسی شد. بدین ترتیب، تاثیر عصاره بر درصد بقای سلولی در سه زمان ۲۴ ساعت (شکل ۱)، ۴۸ ساعت (شکل ۲) و ۷۲ ساعت (شکل ۳) به‌دست آمد. نتایج نشان داد که میزان سایتوتوکسیسیتی عصاره آشواگاندا وابسته به دوز و زمان می باشد. پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت، درصد بقای سلول (Viability) با افزایش غلظت عصاره، به‌طور معناداری کاهش یافت که این کاهش درصد بقای سلولی متناسب با افزایش غلظت عصاره بوده است ($P\leq$۰/۰۵). نتایج نشان می‌دهد که درصد بقای سلولی در مقایسه با گروه کنترل منفی در غلظت‌های ۶۲,۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ µg/ml کاهش معناداری نشان می‌دهد ($p \leq$۰/۰۵). کم‌ترین میزان بقای سلولی ۱۲/۳ درصد پس از ۲۷ ساعت در غلظت ۰۵۷ میکروگرم بر میلی لیتر بود. جدول ۵ میزان IC_{50} عصاره آشواگاندا پس از تاثیر بر سلول‌های A2780در زمان های ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت را نشان می‌دهد.

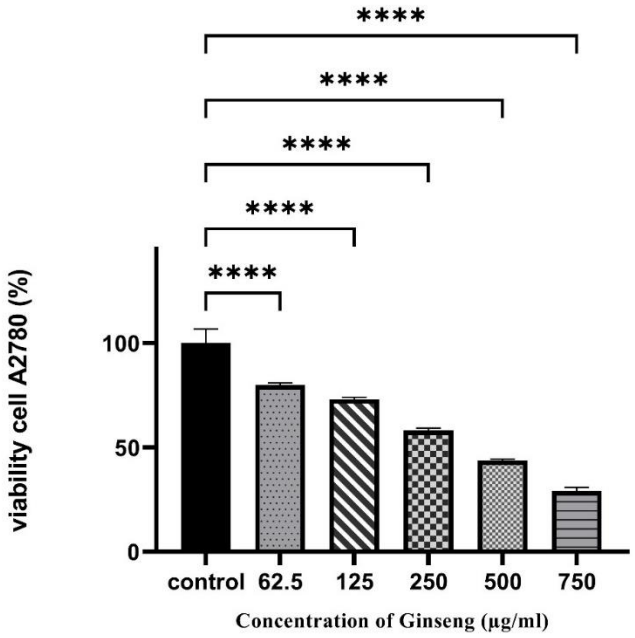
جدول ۴ : IC_{50} ناشی ازاثر گذاری عصاره آشواگاندا بر سلول‌های سرطان تخمدان

Time	IC_{50} (µg/ml)
۲۴ ساعت	۵۱۲/۶
۴۸ ساعت	۳۳۹
۷۲ ساعت	۲۲۶/۴



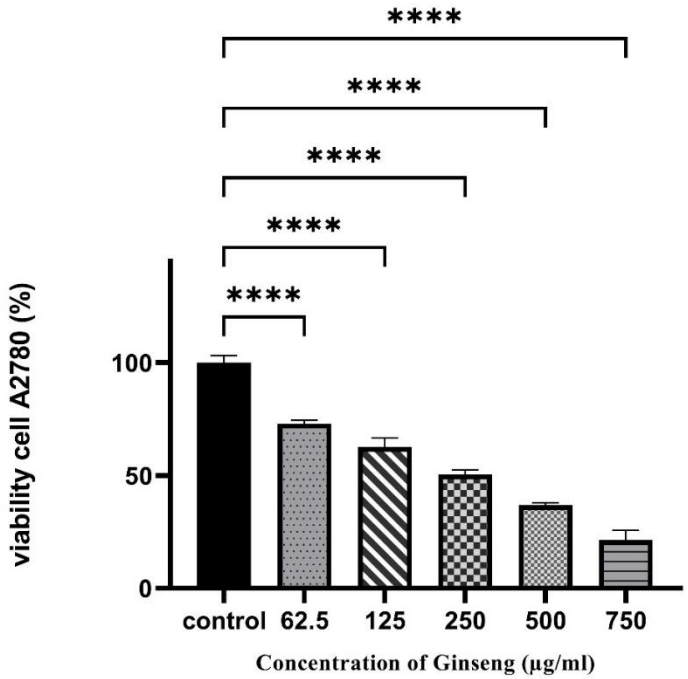
شکل ۱ تاثیر عصاره آشواگاندا بر درصد بقای سلولی در زمان ۲۴ ساعت

* ($p \leq$ ۰/۰۵) اختلاف معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.



شکل ۲: تاثیر عصاره آشواگاندا بر درصد بقای سلولی در زمان ۴۸ ساعت

* ($p \leq ۰/۰۵$) اختلاف معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.



شکل ۳: تاثیر عصاره آشواگاندا بر درصد بقای سلولی در زمان ۷۲ ساعت

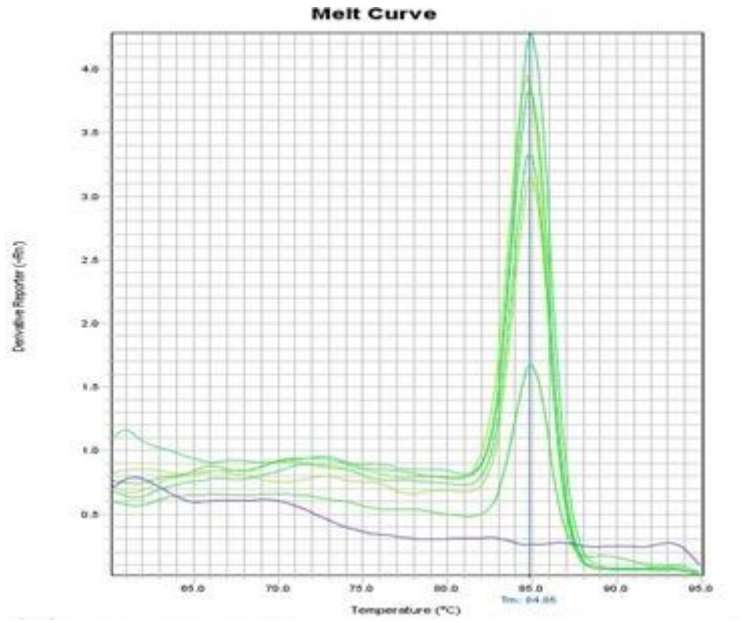
* ($p \leq ۰/۰۵$) اختلاف معنادار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.

نتایج استخراج RNA و بیان ژن P53 تحت تاثیر عصاره آشواگاندا

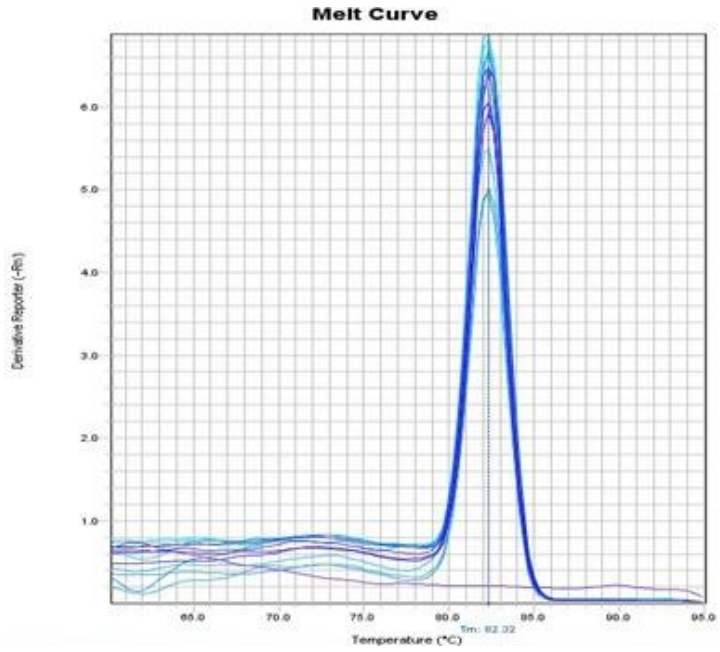
به‌منظور تعیین غلظت و خلوص RNA استخراج شده، با دستگاه نانودراپ جذب RNA گرفته شد و به‌عنوان رفرنس از DEPS Water استفاده شد. طبق جدول۶ نمونه های mRNA استخراج شده، از غلظت خوب برخوردار بودند. جهت اطمینان از دمایAnnealing آغازگرها، محصولات PCR حاصل از دماهای ۵۸ الی ۶۳ درجه سانتی‌گراد را بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد برده شد، باند مورد نظر مشاهده و دمای قطعی به‌دست آمد. به این‌صورت که دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای آغازگر در نظر گرفته شد. شکل های ۴ و ۵ منحنی ذوب هر یک از ژن ها را نشان می‌دهد که نمایان‌گر دمای یک محصول RCP است. با آنالیز منحنی ذوب می توان وجود باندهای غیراختصاصی و پرایمر دایمر را تشخیص داد که در این مطالعه با استناد به منحنی‌های ذوب به‌دست آمده محصولات کاملا اختصاصی و فاقد پرایمر دایمر می‌باشند. نتایج آنالیز بیان ژن *35P* در سلول‌های تیمار شده با عصاره آشواگاندا نشان از افزایش میزان بیان این ژن داشت. همان‌طور که در شکل ۶ نشان داده شده است بیان ژن *35P* با افزایش غلظت عصاره نسبت به گروه کنترل به‌طور معناداری افزایش یافته است ($p\leq ۰/۵۰$). بدین‌صورت که در غلظت ۰۰۵ میکروگرم برمیلی‌لیتر عصاره بیان ژن *35p* به‌طور قابل توجهی در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافته است.

جدول ۶: نتایج غلظت RNA استخراجی از سلول A۲۷۸۰

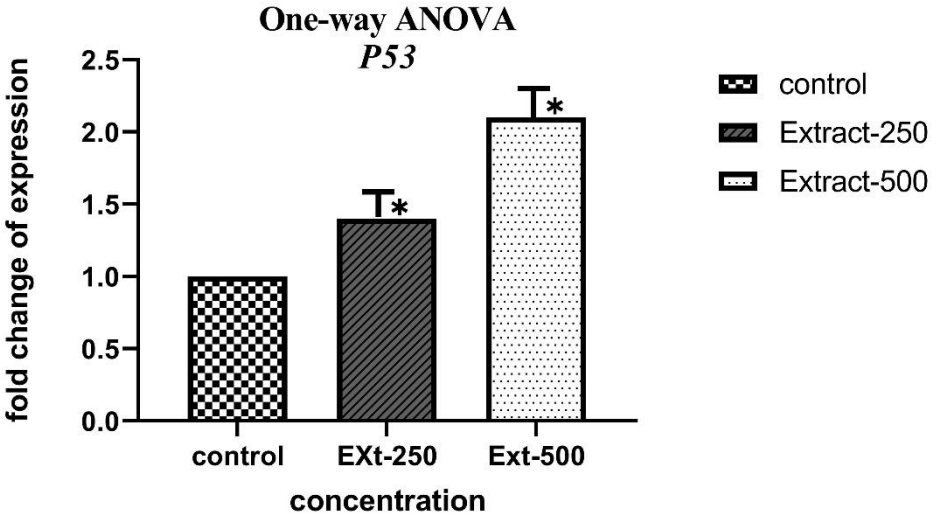
	۲۴H	۴۸H
کنترل	۱۳۹/۵	۵۱۰/۷۸
سلول‌های A۲۷۸۰ تیمار شده با عصاره ی آشواگاندا غلظت ۲۵۰mg/ml	۵۱۱/۲	۶۹۰/۳۲
سلول‌های A۲۷۸۰ تیمار شده با عصاره ی آشواگاندا غلظت ۵۰۰mg/ml	۲۸۱/۰۶	۲۹۱/۲۵



شکل ۴: منحنی ذوب ژن *p53* در سلول‌های تیمارشده با عصاره آشواگاندا



شکل ۵: منحنی ذوب ژن *GAPDH* در سلول‌های تیمارشده با عصاره آشواگاندا



شکل ۵: مقایسه بیان ژن P53 در سلول‌های تیمار شده با عصاره آشواگاندا در مقایسه با گروه کنترل

* ($P \leq ۰/۰۵$) اختلاف معنا دار با گروه کنترل را نشان می‌دهد.

۴- بحث

سرطان نگرانی رو به رشد بهداشتی در سراسر جهان است. در این بین، سرطان تخمدان یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های تشخیص داده شده در زنان و یکی از عوامل مرگ و میر در آن‌ها می باشد (۲۰) . مقاومت به شیمی درمانی سدی در برابر

درمان موفق سرطان تخمدان می باشد. بنابراین یافتن داروهایی موثرتر یا مکمل درمان، همراه با عوارض جانبی کمتر برای افزایش طول عمر این بیماران ضروری است. گیاهان دارویی سازگاری بهتری با بدن دارند و معمولا عوارض جانبی آن‌ها نیز کم‌تر است (۲۱). Darwish و همکار (۲۲) پس از تحلیل حجم عظیمی از داده‌های موجود در مورد منابع قومی-دارویی ضد سرطان بیان کردند که گیاهان دارویی غالب‌ترین فرمول قومی دارویی هستند که در میان بیماران سرطانی در شرق استفاده می‌شود. داده‌های به‌دست‌آمده برای اولین بار متداول‌ترین گیاهان دارویی در منطقه شرق از جمله *Withania somnifera* برای درمان سرطان را نشان می‌دهد که اهمیت آن‌ها را به‌عنوان عوامل ضد سرطان طبیعی مطرح می‌کند. بررسی آن‌ها نشان می‌دهد که *Withania somnifera* یکی از پرمصرف‌ترین گیاهان در میان بیماران سرطانی می‌باشد. روش‌های مولکولی که برای عصاره‌های گیاهی و ترکیبات جدا شده از شرق بررسی شده است شامل توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوزیس با مشارکت عاملان اصلی در این فرآیندها مانند پروتئین P53 و غیره است. آپوپتوزیس یک فرایند مرگ فعال است که از نظر ژنتیکی رمزگذاری شده است. شواهد اخیر نشان می‌دهد که شکست آپوپتوزیس ناشی از دارو ممکن است دلیل اصلی مقاومت در برابر دارو باشد. مکانیسم‌های مولکولی آپوپتوزیس ناموفق در سلول‌های سرطانی تخمدان مقاوم شیمیایی شامل جهش‌های *35p*، بیان غیر طبیعی پروتئین‌های خانواده Bcl-2 و گلیکوپروتئین‌های P و تنظیم زیاد دیگر مهارکننده‌های آپوپتوزیس است که کاسپازها را مسدود کرده و منافذ نفوذپذیری میتوکندری را تثبیت می‌کند. راه انداختن آپوپتوزیس یکی از استراتژی‌های بالقوه برای غلبه بر مقاومت شیمیایی است (۲۳).

P53 یکی از ژن‌های بسیار مهم در تنظیم فرایند آپوپتوزیس است. از آن‌جا که میزان و فعالیت *P53* یک عامل تعیین کننده در حساسیت به داروهایی نظیر سیس پلاتین در سلول‌های سرطانی از جمله سرطان تخمدان است، کاهش فعالیت و مقدار *P53* می‌تواند در مقاومت به شیمی درمانی نقش داشته باشد (۲۱). در مطالعات مختلف آزمایش شده است که آشواگاندا ویژگی‌های ضد توموری قابل توجهی را نشان داده، که چندین عامل افزایش تومورزایی را هدف قرار می‌دهد (۱۵). همچنین مشخص شده است که بسیاری از مارکرهای proapoptotic و antiapptotic توسط *W. somnifera* برای تحریک مرگ برنامه ریزی شده سلول‌های سرطانی تعدیل شده‌اند. *W. somnifera* بر فرآیندهای اصلی مولکولی درگیر در توسعه و پیشرفت سرطان اثر می‌گذارد. *W. somnifera* پتانسیل چند مدلی را برای الف) ارتقا مرگ سلولی، ب) تداخل در سیگنالینگ سلول سرطانی و ج) مهار پیشرفت متاستاتیک فراهم می‌کند. خاصیت آداپتوژنیک *W. somnifera* به‌عنوان یک عامل تعدیل کننده بیماری است و ثابت شده است که *W. somnifera* یک کمکی برای درمان های معمول سرطان است. عصاره *W. somnifera* باعث بهبود فعالیت دارویی پاکلیتاکسل در شیمی درمانی در مدل حیوانی شده است. از این‌رو، فعالیت‌های چند حالته *W. somnifera* آن را به‌عنوان یک محصول طبیعی ضد سرطان غالب ارائه می‌دهند (۴). همچنین Palliyaguru و همکاران (۱۷) اعلام کردند *W. somnifera* به‌عنوان یک گیاه مبتنی بر آیورودا، توانایی جلوگیری از نشانه‌های علائم سرطان را دارد. همان‌طور که در این تحقیق عصاره هیدروالکلی ریشه این گیاه وابسته به غلظت و زمان باعث مرگ سلول‌های سرطانی گشت. طی یک مطالعه Halder و همکاران (۳) برای اولین بار اثر سایتوتوکسیک عصاره ریشه گیاه آشواگاندا را بر سلول‌های ملانومای بدخیم انسانی (رده سلولی A375) بررسی کردند. نتایج نشان داد که عصاره خام ریشه Wtihania این قدرت را دارد که تعداد سلول های زنده را از نظر دوز و همچنین به روشی وابسته به زمان کاهش دهد. آپوپتوز در سلول‌های رنگ‌آمیزی شده با DAPI در زیر میکروسکوپ فلورسانس و نردبانی از DNA تکه تکه شده در سلول های تیمار شده مشاهده شد. بنابراین می توان گفت که عصاره *Withania somnifera* دارای اثر سایتوتوکسیک قوی بر سلول های ملانومای بدخیم انسان است (۳). با توجه به مطالعات گذشته، در این تحقیق برای بررسی تاثیر و تعیین سمیت عصاره الکلی آشواگاندا بر سلول های سرطانی

تخمدان در محیط کشت از آزمون MTTکه یک ازمون استاندارد برای ارزیابی میزان بقاء سلول به شمار می رود؛ استفاده شد. نتایج حاصل از این پژوهش به طور کلی، اثرات مهاری عصاره آشواگاندا را بر رده سلولی سرطان تخمدان از نظر وابسته به دوز و زمان نشان داد. نتایج تحقیقات اخیر نشان دهنده این است که آشواگاندا و مشتقات آن گسترش برخی از سلول های توموری را مهار می کند در سال ۴۱۰۲، miK و hgniS تاثیر درمان با ویتافرینA (WA)، یک لاکتون استروئیدی مشتق شده از گیاه *Withania somnifera* ، درمهار رشد سرطان پستان در یک مدل موش تراریخته را بررسی کردند و WA را به‌عنوان یک عامل قوی ضد سرطان پستان گزارش کردند که منجر به مهار قابل‌توجهی از بار تومور پستانی و همچنین بروز متاستاز در موش‌های تراریخته بدون هیچ گونه عوارض جانبی آشکاری شد (۲۴). در نتیجه Withaferin A(WA) که یک جزء فعال زیستی اصلی گیاه هندی *Withania somnifera* است باعث مرگ سلولی (آپوپتوزیس/نکروزیس) در انواع مختلف سلول‌های تومور می‌شود (۵۲). در این مطالعه ما نیز با توجه به آنالیز شیمیایی انجام شده بر روی گیاه آشواگاندا متوجه حضور ترکیبات فلاونوئید، تری ترپنوئید، آلکالوئید، استروئید، ساپونین‌ها، استرول، تانن، گلیکوزید، پروتئین‌ها، ویتامین c و دیگر ترکیبات مفید و موثر شدیم که به اعمال بیولوژیکی آن، به ویژه خاصیت ضد سرطانی کمک می کنند. Kakar و همکاران (۲۶) عنوان کردند Withaferin A(WA) به تنهایی یا به‌ویژه در درمان ترکیبی، در درمان سرطان تخمدان اثربخشی فوق‌العاده‌ای نشان داده است. همچنین YM gnoF و همکاران (۲۷) در سال ۲۱۰۲ گزارش کردند در اثر درمان ترکیبی دوکسوروبیسین با WA برای سرطان تخمدان منجر به افزایش تولید ROS و اتوفاژی ناشی از آن می شود. همچنین در مدل موشهای زنوگرافت ، هنگامی که دوکسوروبیسین و WA در موش‌های آزمایش نسبت به گروه شاهد یا حیواناتی که با هر دو دارو تحت درمان قرار گرفتند، ۰۷ تا ۰۸ درصد کاهش در حجم تومور وجود داشت.

Dom و همکاران (۲۸) در مطالعه پروتئومیک در سلول‌های میلوما نشان دادند که اهداف پروتئینی ویتافرین A با آپوپتوز مرتبط است. Tang و همکاران (۲۹) اظهار کردند برخی مطالعات گزارش داده اند که *W. somnifera* و ترکیبات فعال آن با کاهش نشانگرهای ضد آپوپتوتیک و فعال سازی نشانگرهای پرواپوپتوتیک در انواع مختلف سرطان و مدل های مختلف، فعالیت آپوپتوز را دوباره برنامه ریزی می کنند. نتایج این مطالعات با یافته های این پژوهش که نشان دهنده توان ترکیبات آشواگاندا در تغییر میزان بیان ژن پروآپوپتوتیک و افزایش مرگ سلول های سرطان تخمدان می باشد، مطابقت دارد. Sundar و همکاران (۳۰) در طی مطالعه‌ای گزارش کردند که ویتانولید ها که اصلی ترین آلکالوئید های گیاه آشواگاندا هستند می تواند فعالیت عملکردی جهش *P35* در سلول های سرطانی کبد را بازسازی کند. در این تحقیق نتایج آنالیز بیان ژن *P35* در سلول های تیمار شده با عصاره آشواگاندا بیانگر افزایش میزان بیان این ژن می باشد. بنابراین نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که عصاره آشواگاندا به طور قابل توجهی سبب افزایش میزان بیان ژن *P35* می شوند. یافته های مطالعات گذشته با نتایج پژوهش مطابقت دارد. البته شایان ذکر است محدودیت مطالعه حاضر، عدم بررسی اثر بخشی ترکیب مورد استفاده در شرایط *in vivo* می باشد.

۶- نتیجه گیری

نتایج حاصل از تحقیق انجام شده، نشان می‌دهد که احتمالا مصرف گیاه آشواگاندا به‌دلیل وجود ترکیباتی همچون ویتانولیدها به‌صورت قابل توجهی منجر به افزایش بیان ژن مولد آپوپتوزیس *P53* و احتمالا محدود کردن رشد تومورهای سرطانی می‌شود. در این مطالعه تیمار با عصاره آشواگاندا باتوجه به ویژگی آنتی اکسیدانیش خاصیت کشندگی بر روی سلول‌های رده A2780 و اثر بر کاهش بقای این سلول‌های سرطانی را تایید کرد و نشان داد که ترکیبات موجود در آشواگاندا دارای فعالیت توکسیک

علیه سلول‌های سرطان تخمدان بوده و در کشتن سلول‌های سرطانی در محیط کشت نقش دارد. به علاوه، این عصاره احتمالا می‌تواند دارای خاصیت آپوپتوتیک باشد و به‌عنوان عامل موثری در نابودی سلول‌های سرطانی در سرطان تخمدان معرفی شود. با در نظر گرفتن پتانسیل ضد سرطانی این گیاه، مطالعات بیشتری برای بررسی دقیق تر اثرات بالینی آن لازم به‌نظر می‌رسد. هم چنین در مطالعات بعدی می‌توان اثر بخشی عصاره آشواگاندا را بر سایر ژن‌های آپوپتوتیک و مسیر سیگنالینگ دیگری در هر دو شرایط in vitro و in vivo مورد بررسی قرار داد.

۷- تشکر و قدردانی

از دانشگاه علم و هنر به خاطر فراهم کردن امکانات این مطالعه صمیمانه تشکر می‌شود .

۸- منابع

1. Yin W, Wang J, Jiang L, James Kang Y. Cancer and stem cells. Exp Biol Med (Maywood). 2021;246(16):1791-801.]

2. Fung DJ. The Cancer Code: A Revolutionary New Understanding of a Medical Mystery. 1 ed: Thorsons; Harper Wave; 2020. 400 p.

3. Halder B, Singh S, Thakur SS. Withania somnifera Root Extract Has Potent Cytotoxic Effect against Human Malignant Melanoma Cells. PLoS One. 2015;10(9):e0137498.

4. Saggam A, Tillu G, Dixit S, Chavan-Gautam P, et al. Withania somnifera (L.) Dunal: A potential therapeutic adjuvant in cancer. J Ethnopharmacol. 2020;255:112759.

5. Jain AK, Barton MC. p53: emerging roles in stem cells, development and beyond. Development. 2018;145(8):dev158360.

6. Pecorino L. Molecular Biology of Cancer Mechanisms, Targets, and Therapeutics2021. 472 p.

7. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin. 2015;65(2):87-108.

8. Epithelial carcinoma of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: Clinical features and diagnosis [Internet]. 2022.

9. Chacón E, Dasí J, Caballero C, Alcázar JL. Risk of Ovarian Malignancy Algorithm versus Risk Malignancy Index-I for Preoperative Assessment of Adnexal Masses: A Systematic Review and Meta-Analysis. Gynecol Obstet Invest. 2019;84(6):591-8.

10. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209۴۹/-

11. Akhtar F, Bokhari SRA. Apoptosis. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.; 2022.

12. Mun EJ, Babiker HM, Weinberg U, Kirson ED, et al. Tumor-Treating Fields: A Fourth Modality in Cancer Treatment. Clin Cancer Res. 2018;24(2):266-75.

13. Jovčevska I, Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. BioDrugs. 2020;34(1):11-26.

14. Kurra P. Natural and Herbal Remedies for Cancer Treatment. Inventi Impact: Planta Activa. 2016۷/-۲۰۱۶:۱۴۰;

15. Hsu JH, Chang PM, Cheng TS, Kuo YL, et al. Identification of Withaferin A as a Potential Candidate for Anti-Cancer Therapy in Non-Small Cell Lung Cancer. Cancers (Basel). 2019;11.(۷)

16. Singh N, Yadav SS, Rao AS, Nandal A, et al. Review on anticancerous therapeutic potential of Withania somnifera (L.) Dunal. J Ethnopharmacol. 2021;270:113704.

17. Palliyaguru DL, Singh SV, Kensler TW. Withania somnifera: From prevention to treatment of cancer. Mol Nutr Food Res. 2016;60(6):1342-53.

18. Singh N, Bhalla M, de Jager P, Gilca M. An overview on ashwagandha: a Rasayana (rejuvenator) of Ayurveda. Afr J Tradit Complement Altern Med. 2011;8(5 Suppl):208-13.

19. Dutta R, Khalil R, Green R, Mohapatra SS, et al. Withania Somnifera (Ashwagandha) and Withaferin A: Potential in Integrative Oncology. International Journal of Molecular Sciences. 2019;20(21):5310.

20. Kasper DL. Harrison's principles of internal medicine. edition t, editor: New York : McGraw Hill Education Medical, [2015]; 2015.

21. Vahedi F, Fathi Najafi M, Bozari K. Evaluation of inhibitory effect and apoptosis induction of Zyzyphus Jujube on tumor cell lines, an in vitro preliminary study. Cytotechnology. 2008;56(2):105-11.

22. Abu-Darwish MS, Efferth T. Medicinal Plants from Near East for Cancer Therapy. Front Pharmacol. 2018;9:56.

23. Tu Y, Kim E, Gao Y, Rankin GO, et al. Theaflavin-3, 3'-digallate induces apoptosis and G2 cell cycle arrest through the Akt/MDM2/p53 pathway in cisplatin-resistant ovarian cancer A2780/CP70 cells. Int J Oncol. 2016;48(6):2657-65.

24. Kim S-H, Singh SV. Mammary Cancer Chemoprevention by Withaferin A Is Accompanied by In Vivo Suppression of Self-Renewal of Cancer Stem Cells. Cancer Prevention Research. 2014۴۷٪-۷۳۸:(۷)۷;

25. Nishikawa Y, Okuzaki D, Fukushima K, Mukai S, et al. Withaferin A Induces Cell Death Selectively in Androgen-Independent Prostate Cancer Cells but Not in Normal Fibroblast Cells. PLOS ONE. 2015;10(7):e0134137.

26. Kakar SS, Parte S, Carter K, Joshua IG, et al. Withaferin A (WFA) inhibits tumor growth and metastasis by targeting ovarian cancer stem cells. Oncotarget. 2017;8(43):74494-505.

27. Fong MY, Jin S, Rane M, Singh RK, et al. Withaferin A synergizes the therapeutic effect of doxorubicin through ROS-mediated autophagy in ovarian cancer. PLoS One. 2012;7(7):e42265.

28. Dom M, Offner F, Vanden Berghe W, Van Ostade X. Proteomic characterization of Withaferin A-targeted protein networks for the treatment of monoclonal myeloma gammopathies. J Proteomics. 2018;179:17-29.

29. Tang Q, Ren L, Liu J, Li W, et al. Withaferin A triggers G2/M arrest and intrinsic apoptosis in glioblastoma cells via ATF4-ATF3-CHOP axis. Cell Prolif. 2020;53(1):e12706.

30. Sundar D, Yu Y, Katiyar SP, Putri JF, et al. Wild type p53 function in p53(Y220C) mutant harboring cells by treatment with Ashwagandha derived anticancer withanolides: bioinformatics and experimental evidence .J Exp Clin Cancer Res. 2019;38(1):103.