فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی30، جلد 8، شماره 3، تابستان94، صفحه 69 تا 77

بررسی خاصیت سیتوتوکسیک عصاره های آبی و هیدروالکلی میوه گواوا (*Psidium guajava L.*) بر رده سلولی *DU*-145

شعله زعیمی برواتی[1]، **کهین شاهانی‌پور[1]**، رامش منجمی[2]
1- گروه بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان. ایران. ***shahanipur_k@yahoo.com***
2-گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد فلاورجان، اصفهان.ایران.

تاریخ دریافت: 94/2/19 تاریخ پذیرش:94/5/25

چکیده

مقدمه و هدف: سرطان پروستات دومین سرطان شایع در مردان پس از سرطان پوست محسوب می‌گردد. گیاهان به عنوان منبع مهم ترکیبات آنتی‌اکسیدان و فنل محسوب می‌شوند. گیاه گواوا(*Psidium guajava L.*) یکی از میوه‌های درختی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری آمریکای جنوبی است، در این پژوهش خاصیت سایتوتوکسیک عصاره‌های آبی و هیدروالکلی میوه گواوا بر سرطان پروستات انسانی (*DU145*) مورد مطالعه قرار گرفت.

روش کار: میوه گواوا پس از جمع آوری عصاره‌های آبی و هیدروالکلی آن تهیه شد. رده‌ی سلولی*DU-145* در محیط کشت *RPMI-1640* حاوی 10% سرم گاوی در انکوباتور با 5% CO_2 کشت و تحت تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی و هیدروالکلی طی 24، 48 و 72 ساعت انکوبه شد. درصد بقاء سلول‌ها در حضور و فقدان عصاره‌ها با روش*MTT* و به کمک دستگاه الایزا با طول موج 540 نانومتر محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار *SPSS* بررسی گردیدند($* = P\text{-}value < 0.05$, $N=12$).

یافته ها: نتایج نشان دهنده‌ی کاهش50 درصدی بقاء سلول‌ها بود.

نتیجه‌گیری: نتایج مشخص نمود که عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی میوه گواوا دارای اثر سیتوتوکسیک می‌باشند. علاوه بر این مطالعات نشان داد که تاثیر سیتوتوکسیک عصاره‌ی آبی بسیار قوی تر از عصاره‌ی هیدروالکلی است.

واژه‌های کلیدی: سیتوتوکسیک، میوه گواوا، رده سلولی *DU145*، سرطان پروستات.

مقدمه

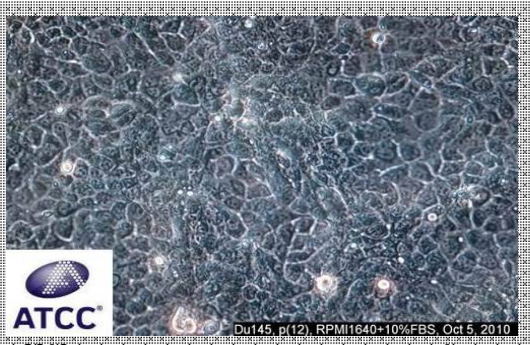
سرطان از شایع ترین علل مرگ و میر در جوامع بشری و طبق گزارش سازمان جهانی بهداشت، حدود 13 درصد از کل مرگ و میرها در سراسر جهان محسوب می باشد. سرطان پروستات شایع‌ترین نوع بدخیم در مردان و دومین علت مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان بعد از سرطان پوست و مرگ آورترین سرطان در مردان پس از سرطان ریه است، شیوع این سرطان در ایران کمتر از کشورهای اروپایی و آمریکایی می باشد. بیشتر از 95 درصد موارد سرطان پروستات از نوع آدنوکارسینوم و بقیه موارد را کارسینوم سلول‌های ترانزیشنال، کارسینوم نرواندوکرین و سارکوم تشکیل می‌دهد(4). فاکتورهای خطر در سرطان پروستات شامل سن، نژاد، وراثت و تاریخچه‌ی خانوادگی، عوامل ژنتیکی، رژیم غذایی، چاقی، عفونت و التهاب پروستات (پروستاتیت) و عوامل هورمونی می‌باشند(32).

سن: مهم‌ترین فاکتور موثر در سرطان پروستات است. احتمال ابتلا به سرطان پروستات بعد از سن 45 سالگی افزایش می‌یابد(3). نژاد: این نوع سرطان در مردان سیاه پوست آفریقایی-آمریکایی شایع‌تر از سایر نژادهاست. در این نوع نژاد، احتمال داشتن بیماری پیشرفته‌تر در زمان تشخیص و نیز مرگ‌ومیر ناشی از بیماری بیش‌تر است، این نوع سرطان در آسیایی‌ها کم‌تر دیده می‌شود. علت این تفاوت‌های نژادی مربوط به عوامل ژنتیکی، محیطی و یا ترکیبی از این دو

می‌باشد(5). وراثت و تاریخچه خانوادگی: احتمال ابتلا به سرطان پروستات در مردانی که خویشاوندان درجه اول آن‌ها مبتلا به سرطان پروستات هستند،(پدر و برادر) احتمال ابتلا آن‌ها به‌ویژه اگر خویشاوندان در سنین پایین به این بیماری دچار شده‌اند، بسیار بالاتر است از طرفی ژن‌های وراثتی متعددی شناسایی شده است که احتمال ابتلا به سرطان پروستات را افزایش می‌دهند(23). رژیم غذایی و چاقی: مردانی که مقدار زیاد گوشت قرمز و فرآورده‌های لبنی پرچرب مصرف می‌کنند، ریسک بالاتری برای ابتلا به سرطان پروستات دارند، این مردان معمولاً میوه و سبزیجات کم‌تری در رژیم غذایی خود دارند، مطالعات، بیان‌کننده این هستند که مردان چاق، ریسک بالاتری برای ابتلا به سرطان پروستات پیشرفته و مرگ ناشی از آن دارند(27). عفونت و التهاب پروستات: هم چنین التهاب غده پروستات با افزایش ریسک و احتمال سرطان پروستات همراه است(5). عوامل هورمونی: هورمون‌های مردانه به ویژه دی هیدروکسی تستوسترون نقش مهمی در رشد و گسترش سلول‌های سرطانی پروستات ایفا می‌کنند(25). سرطان پروستات یک بیماری چند عاملی است. سرطان پروستات با الگوهای رشد هتروژن مشخص می‌شود و محدوده‌ای است که شامل تومورهایی با رشد آهسته تا آسیب‌های متاستاتیک با رشد بسیار زیاد است(6). سرطان پروستات در واقع توموری وابسته به آندروژن است که محرومیت از آندروژن اغلب به‌عنوان اولین درمان برای بیماران دارای سرطان پیشرفته بکار می‌رود اما در 20 درصد موارد بیماران نسبت به درمان مقاوم می‌گردند به طوری که در مدت سه سال سرطان آن‌ها تبدیل به کارسینومای غیر وابسته به آندروژن می‌گردد که سریعاً منجر به مرگ می‌شود. سلول‌های غیر وابسته به آندروژن مانند *DU-145* می‌توانند در ایجاد آن دخیل باشند(12). جهت تشخیص سرطان پروستات معاینه غده پروستات به کمک معاینه انگشتی رکتوم(*Digital rectal examination*) که از الگوهای غربالگری سرطان پروستات، انجام می شود. در این روش پزشک از طریق مقعد، غده پروستات را معاینه می‌کند. وجود سطح خشن و نامنظم بافت از علایم هشدار دهنده سرطان پروستات محسوب می‌شود. در حال حاضر تشخیص بر پایه آزمون‌های هیستوپاتولوژیکی و یا نمونه‌های سیتولوژی از غده پروستات است(9). تشخیص سریع سرطان پروستات با اندازه گیری آنتی ژن اختصاصی پروستات(*PSA*) که از آزمایش‌های غربالگری این بیماری است، صورت می‌گیرد، در مراحل بعدی آزمون‌های دیگری مانند تصویرنگاری مغناطیسی(*MRI*) و توموگرافی کامپیوتری(*CT*)، سونوگرافی و نمونه برداری از غده نیز انجام می گیرد(32). راهکارهای درمانی سرطان پروستات شامل جراحی و برداشتن کامل غده پروستات یا پروستاتکتومی، کرایوتراپی(جراحی سرد) که روشی موثر برای درمان مراحل اولیه بیماری است و احتمال آسیب دیدگی مثانه و التهاب دستگاه تناسلی از عوارض جانبی این روش است(12). شیمی درمانی نیز پس از جراحی استفاده می‌شود در این زمان به عنوان یک درمان کمکی به جراحی و پرتو درمانی اضافه می‌گردد(8). آندروژن درمانی اثرات سلولی آندروژن توسط گیرنده آندروژن اعمال می‌شود که سرانجام به استیله شدن هیستون‌ها و رونویسی چندین ژن منجر می‌شود، نظر به این که رشد سلول‌های سرطان پروستات در آغاز وابسته به آندروژن است، درمان بر اساس آندروژن، شامل حذف کردن آندروژن‌های موجود در گردش خون است که به شکل استفاده دراز مدت از آنتاگونیست‌های آزاد کننده هورمون، استروژن و یا آنتی آندروژن‌ها مانند فلوتامید، نیلوتامید، سیپروترون استات انجام می‌گیرد. این روش درمانی، بیماری را در بسیاری از موارد متوقف

می‌کند، اما معمولاً برگشت بیماری دو تا سه سال بعد آغاز می‌شود که جزئیات آن ناشناخته است(11).

در بانک سلولی *ATCC* رده‌ی سلولی سرطان متاستاتیک پروستات به نام *DU-145* موجود است این رده سلولی توسط استون و همکارانش در سال 1978 از یک مرد بیمار 69 ساله‌ی قفقازی مبتلا به سرطان آدنوکارسینوم متاستاتیک پروستات جدا شد(شکل1).



شکل 1رده سلولی *DU-145* بانک سلولی*ATCC* 2010

این رده سلولی 90 بار در شرایط آزمایشگاهی پاساژ و در طی دو سال این سلول‌های اپی‌تلیالی در شرایط ایزوله رشد داده شدند. تجزیه و تحلیل کاریوتایپی آن نشان می‌دهد که این سلول‌ها دارای 64 کروموزوم بوده و بسیار متاستاتیک و غیر حساس به آندروژن هستند و وجود *mRNA* و پروتئین *PTEN* در آن آشکار گردیده است، کد رده‌ی سلولی مورد استفاده بر اساس کاتالوگ سلولی *NCBI* که در بانک سلولی انستیتو پاستور نیز منتشر شده است برابر*C*428 بوده و از لحاظ مورفولوژی جزء سلول‌های اپی تلیالی است و به‌صورت تک لایه رشد می‌نماید. محیط کشت اختصاصی آن *DMEM* (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) است. اما در محیط حاوی 90 درصد *RPMI*1640 و 10 درصد *FBS* به خوبی رشد می‌کند و باید هر 3 روز یک بار واکشت داده شود. این سلول‌ها قادر هستند در موش نری که سیستم ایمنی آن سرکوب شده، موجب ایجاد تومور و متاستاز می شود. سلول‌های*DU*-145 بلافاصله پس از قرارگیری در محیط کشت و قبل از چسبیدن به کف فلاسک منظره‌ای گرد و شناور دارند. این سلول‌ها پس از 24 ساعت قرار گرفتن در محیط کشت در صورت مناسب بودن شرایط به کف فلاسک می‌چسبند و شروع به تقسیم شدن می‌کنند. سلول‌های*DU*-145 پس از 48 ساعت به طور کامل به کف ظرف چسبیده و کشیده شده و ظاهر آن سنگفرشی می شود(7). 40 تا 50 درصد از مبتلایان بـه سرطان پروستات در ایران، در مـراحل ابتدایی تشخیص داده می‌گردد، اما صرف هزینه‌های زیاد برای پرتودرمانی، دارو درمانی و جراحی بافت مهاجم مشکلات زیادی را برای بیماران به وجود می‌آورد، لذا جایگزین کردن روش‌ها و ترکیبات جدید کم هزینه با اثرات جانبی کمتر می‌تواند بسیار حائز اهمیت باشد. تاکنون گیاهان دارویی متعددی شناسایی شده‌اند که دارای ویژگی‌های درمانی متنوعی می‌باشند(26). گیاهان دارویی می‌توانند در حفظ سلامت بدن نقش مهمی داشته باشند و از آن در مقابل انواع بیماری‌ها از جمله سرطان با عوارض جانبی کمتر محافظت نمایند(21). گیاه گواوا با نام علمی *Psidium guajava L.* یکی از میوه‌های درختی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری و بومی آمریکای جنوبی، آمریکای مرکزی، پرو، برزیل و مکزیک است و به سیب گرمسیری(*Tropical apple*) مشهورمی باشد(31). زادگاه اصلی این گیاه برزیل بوده

ولی سال‌ها قبل به ایران وارد شده و به گونه پرورشی بیشتر در جنوب ایران کاشته می‌شود. کشت این درخت درایران، در استان‌های هرمزگان و سیستان و بلوچستان از گذشته بسیار دور صورت گرفته و در میان مردم بومی این مناطق میوه آن به زیتون محلی یا گووین معروف می باشد، میوه گیاه گواوا دارای انواع ترپنوئیدها، پکتین، روغن فرار و تانن است(19). هر 100 گرم از این میوه دارای 70 درصد آب، 6 درصد پروتئین، 2 درصد کربوهیدرات، 1درصد چربی اشباع، 2 درصد چربی غیر اشباع، 5 درصد سدیم، 6 درصد پتاسیم، 1 درصد کلسیم، 1 درصد فسفر، 1 درصد آهن، 5 درصد لیکوپن و ویتامین های *A*،*B*1،*B*2 و *C* است(14). روش *MTT* روشی کمی، حساس و قابل اطمینان است، این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که ماده‌ی زرد رنگ و محلول در آب *MTT* را به کریستال‌های فورمازان به رنگ آبی تیره و نامحلول در آب تبدیل می کند. این روش به طور گسترده‌ای در ارزیابی میزان بقاء سلول در آزمون‌های غربالگری *NCI*(*National Cancer Institute*) به کار رفته است و این امکان را فراهم می‌آورد که تعداد زیادی نمونه را با استفاده از دستگاه الایزا ریدر(*Elisa Reader*) با دقت بالا پردازش نمود. میزان فورمازان تولید شده مستقیماً به نسبت سلول‌های زنده رده سلولی وابسته است، در این روش رسم منحنی استاندارد جذب در مقابل تعداد سلول‌ها ضروری می باشد. حلال مناسب برای حل کردن کریستال‌های فورمازان دی متیل سولفاکساید(*Dimethyl sulfoxide*) است که پس از استفاده از آن و حل کردن کریستال‌ها جذب محلول رنگی به وسیله دستگاه الایزا در طول موج 490 تا 600 نانومتر خوانده می‌شود. این روش نسبت به سایر روش‌های بررسی پرولیفراسیون سلولی ساده‌تر بوده و با امکانات موجود در اغلب آزمایشگاه‌ها قابل اجراست (13). در این پژوهش اثر سایتوتوکسیک عصاره های آبی و هیدروالکلی میوه گواوا بر روی رده سلولی پروستات*DU*145 می باشد.

مواد وروش ها

تهیه پودر میوه و عصاره‌ها

میوه گیاه گواوا(*Psidium guajava L.*) از طریق مرکز جهاد کشاورزی سیستان و بلوچستان تهیه و در تاریکی در مجاورت هوا به طور کامل در زیر سایه خشک و آسیاب شد. عصاره گیری با حلال های اتانول و آب به روش خیساندن انجام گرفت

روش تهیه عصاره‌ی آبی: برای تهیه عصاره آبی 10 گرم از پودر گواوا در 50 میلی لیتر آب دیونیزه استریل غوطه ور و به مدت 24 ساعت در تاریکی و در شرایط تکان مداوم روی شیکر با دور 120 قرار گرفت. محلول صاف شد در شرایط دمایی مطلوب خشک و عصاره‌ها در ویال‌های در بسته در تاریکی و در یخچال قرار داده شد.

روش تهیه عصاره‌ی هیدروالکلی: برای تهیه عصاره هیدروالکلی 10 گرم از پودر گواوا در 35 میلی‌لیتر اتانول 80 درصد و 15 میلی لیتر آب دیونیزه استریل به مدت 24 ساعت در تاریکی و در شرایط تکان مداوم روی شیکر با دور 120 قرار گرفت. محلول صاف شده تحت شرایط دمایی مطلوب خشک و در ویال‌های در بسته در تاریکی در یخچال قرار داده شد(29).

کشت سلول

رده سلولی*DU*-145 به‌صورت فلاسک از انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت*RPMI*1640 حاوی 10% سرم جنین گاوی(*FBS*) و آنتی بیوتیک کشت داده شد. محیط کشت*RPMI*1640 با نام تجاری *Roswell Park Memorial Institute medium* به صورت آماده از شرکت ایده زیست، تهیه و به منظور کامل شدن آن جهت استفاده در پژوهش به محلول*RPMI* 1640 با حجم 500 میلی‌لیتر، 5 میلی‌لیتر از محلول دو آنتی بیوتیک استرپتومایسین و پنی سیلین صاف شده و 50 میلی‌لیتر

سرم گوساله(*Fetal Bovine Serum*) اضافه و *pH* محیط کشت تهیه شده با *NaOH* و *HCl* بین 7/3 تا 7/6 تنظیم و در دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری گردید، سپس سلول‌ها در انکوباتور CO_2 دار و دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه، تعویض محیط کشت هر 2 روز یک بار انجام گردید(28).

بررسی اثر سیتوتوکسیک به روش *MTT*

در این پژوهش اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های تهیه شده بر روی سلول‌های سرطان پروستات انسانی*DU-*145 با روش رنگ سنجی*MTT*(*3-(4-5dimethyl thiazoly1)-2,5 diphenyl tetraxolium bromide* و از طریق مقایسه با گروه کنترل بررسی شد. این روش بر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده استوار است که محلول زرد رنگ *MTT* را به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌کند، که می‌توان پس از حل کردن در محلول دی متیل سولفوکساید(*DMSO*) با دستگاه الایزا ریدر سنجش نمود(17). به طور خلاصه 200 میکرولیتر سوسپانسیون سلولی(5×10^4 سلول در هر میلی لیتر محیط کشت) در میکروپلیت‌های 96 خانه کشت داده و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس 20 میکرولیتر غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌ها به آن اضافه شد. برای تهیه غلظت های مختلف عصاره ها بدین ترتیب عمل گردید، ابتدا 0/01 گرم از هر عصاره با *PBS* به حجم 10 میلی لیتر رسانده و غلظت 1000 میکروگرم بر میلی لیتر از هر عصاره به دست آمد. سپس با رقیق سازی توسط *PBS* غلظت های 100، 200، 500، 750 و 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر از هر عصاره تهیه و با 4 بار تکرار در 3 زمان مختلف به چاهک‌ها اضافه گردید. دوکسوروبیسین به‌عنوان کنترل مثبت و به-عنوان کنترل منفی از محیط کشت فاقد عصاره استفاده گردید. میکروپلیت‌های حاوی عصاره و سلول در بازه زمانی ۲۴،۴۸،۷۲ ساعت انکوبه گردیدند. سپس 20 میکرولیتر محلول *MTT* به هر چاهک اضافه و به مدت 3 ساعت انکوبه شد. 200 میکرولیتر *DMSO* جایگزین محیط انکوبه شده با *MTT* و برای حل کردن کریستال‌های فورمازان به آرامی با پیپت اضافه و جذب نوری در طول موج 560 نانومتر با دستگاه الایزا ریدر در سه بازه زمانی سنجیده و درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی 100 منظور شد(22). جهت شمارش سلول‌ها از سوسپانسیون سلولی تهیه شده 100 میکرولیتر برداشته و با 300 میکرولیتر محیط کشت و 100 میکرولیتر تریپان بلو در ویال مخلوط و چندین بار پیپتاژ شد. از این سوسپانسیون 20 میکرولیتر بر روی لام هموسیتومتر ریخته و با بزرگ نمایی 10 با 4 بار تکرار منطقه تعداد سلول ها شمارش گردید. در مورد سلول‌هایی که روی قسمت خارجی خطوط حایل خانه قرار می‌گیرند فقط سلول‌هایی که روی خطوط بالا و سمت راست قرار می‌گیرند، شمارش می‌شوند. سلول‌هایی که رنگ نمی‌گیرند را به-عنوان سلول‌های زنده در نظر گرفته می شود. از آن‌جایی که سوسپانسیون سلولی پنج بار رقیق شده مجموع سلول های 4 خانه را برابر تعداد سلول‌های موجود در سوسپانسیون (n) در نظر گرفته، در نتیجه تعداد سلول‌ها در هر میلی لیتر معادل $n \times 10^4$ می‌باشد(10). درصد بقاء سلول‌هایی که تحت تاثیر غلظتی خاص از دارو قرار گرفته اند با تقسیم جذب چاهک های تیمار شده به جذب کنترل منفی ضرب در 100 محاسبه شد. غلظتی از ترکیب مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف تقلیل دهد به‌عنوان *LD50* در نظر گرفته و مقدار آن را از روی نمودار با استفاده از نرم افزار اکسل تعیین گردید(24).

تحلیل آماری

برای انجام آنالیز آماری اطلاعات گروه‌های آزمایشی مختلف از نرم افزار *SPSS* استفاده شد. نتایج گروه‌های

مختلف با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. سطح معنی دار بودن اختلافات $P<0/05$ در نظر گرفته ,جداول مورد نظر،پس از انجام آزمون توکی و آنالیز واریانس رسم گردید.

نتایج

مورفولوژی سلول‌های *DU* 145

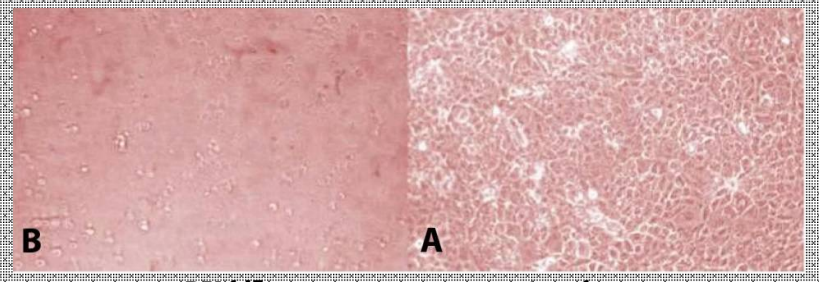
سلول‌های *DU*145 بلافاصله پس از قرارگیری در محیط کشت و قبل از چسبیدن به کف منظره‌ای گرد و شناور دارند. این سلول‌ها پس از 24 ساعت قرارگرفتن در محیط کشت در صورت مناسب بودن شرایط به کف فلاسک می‌چسبند و شروع به تقسیم شدن می‌کنند(شکل 2).

اثر سیتوتوکسیک عصاره‌های مختلف بر سلول‌های سرطان پروستات انسانی (*DU*145)

نمونه‌هایی که باعث حداقل مهار رشدی معادل 50 درصد گردیدند به عنوان نمونه‌های سیتوتوکسیک در نظر گرفته شدند. نتایج حاصل از این مطالعه این گونه بیان می کند که عصاره‌ی آبی میوه گواوا در طی 72 ساعت بیشترین تاثیر سیتوتوکسیسیته را از خود نشان داده و به ترتیب عصاره‌های 48 و 24 ساعته از میزان سیتوتوکسیسیته کمتر برخوردار می‌باشند(جدول 1). نتایج حاصل از این مطالعه بیان می کند که عصاره‌ی هیدرو الکلی پس از 24 ساعت بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته را روی سلول های سرطانی گذاشته است و به ترتیب عصاره‌های 48 و 72 ساعته اثر سیتوتوکسیسیته روی سلول های سرطانی داشته‌اند(جدول 2).

بحث و نتیجه گیری

امروزه گیاهان دارویی نقش حیاتی در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان دارند. گیاهان تنها دیگر فقط در طب سنتی مطرح نیستند بلکه آن‌ها توانسته اند، یک خط صنعتی از فرآورده‌های طبیعی را نیز به خود اختصاص دهند(1).



شکل 1-مورفولوژی سلول های رده سلولی*DU*-145

A) منظره سلول ها پس از چسبیدن به کف فلاسک *B*) منظره سلول ها قبل از چسبیدن به کف فلاسک

جدول 1-اثر عصاره آبی (با غلظت های مختلف) میوه گیاه گواوا بر میانگین درصد بقاء در طی ٤٨،٢٤و72 ساعت

زمان(ساعت) / غلظت(میکروگرم/میلی لیتر)	24	48	**72**
100	83/97 ±/06[b]	63/52±5/69*	**46/80±6/93***
250	89/93±5/72	72/20±5/46*	**50/81±7/22***
500	88/44±1/91	75/32±3/53*	**54/55±7/69***
750	85±9/17	79/95±7/50*	**56/08±5/64***
1000	94/58±1/37	73/88±5/91*	**60/18±2/99***

[b] میانگین درصد بقاء ± انحراف استاندارد

* معناداری اختلاف میانگین درصد بقاء با میانگین گروه کنترل در سطح 5%

جدول 2-اثر عصاره هیدروالکلی(با غلظت های مختلف) میوه گیاه گواوا بر میانگین درصد بقاء در طی ٤٨،٢٤و72 ساعت

زمان(ساعت) / غلظت(میکروگرم/میلی لیتر)	24	48	72
100	67/16 ±1/24*[b]	93/79±7/74	**98/01±5/8**
250	69/84±2/81*	92/40±9/68	**104/60±3/5**
500	71/82±5/15*	93/10±4/96	**98/08±7/86**
750	70/85±1/26*	93/96±10/95	**94/45±7/16**
1000	81/29±4/74*	86/30±6/41*	**100/31±5/8**

[b] میانگین درصد بقاء ± انحراف استاندارد

* معناداری اختلاف میانگین درصد بقاء با میانگین گروه کنترل در سطح 5%

این ایده که بسیاری از داروهای مفید در درمان سرطان از گیاهان دارویی ساخته می‌شوند تا اثر جانبی کمتری داشته باشند.

بیان بالای آنزیم 15لیپواکسیژناز-1(*15-LOX-1*) در تومورهای پروستات گزارش شده است. مشتقات کومارین با داشتن اثر مهاری بر این آنزیم، فعالیت ضد سرطانی دارند. اثرات ضد سرطانی دو ترکیب سنتزی 8 و 5- فارنسیل اکسی کومارین بر سلول‌های سرطان پروستات رده*DU*-145 و رده سلولی نرمال*HFF*3، با تکنیک *MTT* بررسی شده و تفاوت *LD50* حاصل در این دو نوع سلول بیان‌گر نقش ضد سرطانی این دو ترکیب است. تغییر ساختار شیمیایی این ترکیبات و یا هم افزایی آن‌ها ممکن است نقش مؤثرتری در خاصیت ضد سرطانی آن‌ها در بررسی‌های *in vivo* و*in vitro* داشته باشد (2). از آن‌جایی که میوه گواوا دارای ترکیبات کومارینی(محصولات متابولیسم ثانویه رایج در واکوئل سلول‌های گیاهی) می‌باشد و این ترکیبات از خانواده ترکیبات فنلی رایج در گیاهان بشمار می‌روند، انتظار می‌رود که این مواد فنلی که از نظر فیزیولوژیکی فعال هستند و بر سلول‌های سرطانی اثرات سمی دارند، با ایجاد اختلال در تقسیم هسته‌ای و مهار رشد سلول های سرطانی عمل کرده و مهار رشد سلول‌های سرطانی را در مطالعه‌ی حاضر نشان دهد. در بررسی که توسط لیسبوا و همکارانش در سال 2011 انجام شد فعالیت ضد تکثیری گواوا را بر سلول‌های فیبروبلاست و در محیط*MCF*-7 و *CaCO*3 بررسی کردند وآن را به اثبات رساندند(20). در مطالعه ای که به بررسی اثرات ضد سرطانی عصاره متانولی گواوا، بر سلول های سرطانی پستان انسان *MDA-MB*231 و *MCF*7 انجام گرفت، بررسی های سیتوتوکسیک و نتایج حاصل از آزمون *MTT* نشان‌دهنده اثر مهاری این عصاره بر رشد سلول های سرطانی بوده است (16). در بررسی اثر عصاره‌های آبی، دی کلرومتان و متانولی ریشه کاسنی بر سرطان پروستات در شرایط آزمایشگاهی بر روی سه دودمان سلولی سرطان پروستات(*PC*-3، *DU*-145 و *AT3B*-1) مشخص گردید که این عصاره ها دارای اثرات ضد سرطانی هستند(30). از آن جایی که نتایج حاصل از مطالعه فوق با نتایج حاصل از مطالعه حاضر مشابه می‌باشند انتظار می‌رود وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان مشترک موجود در عصاره‌های این دو گیاه باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی شده است. در مطالعه حاضر میزان مهار رشد سلول‌های رده سلولی *DU*-145 با عصاره‌های آبی، هیدروالکلی میوه گیاه گواوا مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از این مطالعه، این گونه بیان می کند که عصاره‌ی آبی میوه گواوا در طی 72 ساعت بیشترین تاثیر سیتوتوکسیسیته را از خود نشان داده است و به ترتیب عصاره‌های 48 و 24 ساعته از میزان سیتوتوکسیسیته کمتر برخوردار بودند که نشان می‌دهد که ترکیبات

سیتوتوکسیک جدا شده در عصاره آبی با گذشت زمان اثر مهاری بیشتری بر رشد سلول ها داشته است و پس از گذشت مدت زمان بیشتر از 24 ساعت اثر سیتوتوکسیسیته آن افزایش یافته است پس می توان این گونه استنباط کرد که عصاره آبی این گیاه به مرور زمان اثر سیتوتوکسیک بیشتری بر روی سلول های سرطانی داشته است در نتیجه می توان از این خاصیت در درمان سرطان پروستات بهره مند شود. آب یکی از بهترین حلال های موجود در طبیعت می‌باشد لذا زمانی که یک ترکیب ضد سرطانی محلول در آب قادر به از بین بردن سلول های ضد سرطانی می باشد این ترکیب می تواند در علم داروسازی بسیار حائز اهمیت باشد زیرا عوارض جانبی بسیار کمتری بر سلول های سالم بدن داشته و می توان راحت تر از آن به عنوان یک ترکیب ضد سرطان استفاده کرد و عصاره آبی نسبت به سایر عصاره ها ارجحیت دارد(18). عصاره‌ی هیدرو الکلی برعکس عصاره آبی عمل کرده و نتایج حاصل از آن این گونه نشان می‌دهد که پس از 24 ساعت بیشترین اثر سیتوتوکسیسیته را بر روی سلول های سرطانی گذاشته و به ترتیب عصاره‌های 48 و 72 ساعته اثر سیتوتوکسیسیته روی سلول های سرطانی داشته‌اند که نتایج فوق نشان می‌دهد اتانول موجود درعصاره هیدروالکلی باعث ناپایداری ترکیبات موجود در عصاره شده و تاثیر آن را پس از24 ساعت کاهش یافته است. پس می‌توان نتیجه گرفت که ترکیبات ضد سرطانی موجود در این میوه در مجاورت با اتانول ناپایدار می‌شوند و در 24 ساعت اول بیشترین تاثیر را داشته اند و پس از آن به دلیل فرار بودن از ترکیب جداشده اند پس می توان از این عصاره نیز برای درمان استفاده کرد اما در بازه زمانی کمتری اثر این عصاره مشاهده می‌شود در نتیجه این نکته باید در روند درمان سرطان پروستات به کمک عصاره‌ی هیدروالکلی مد نظر قرار گرفته شود(20). به طور کلی عصاره‌ی آبی و هیدروالکلی میوه گواوا دارای اثر سیتوتوکسیک می‌باشند. علاوه بر این مطالعات نشان دادند که تاثیر سیتوتوکسیک عصاره‌ی آبی بسیار قوی تر از عصاره‌ی هیدروالکلی است.

منابع

1- جاهد، م. 1388. مطالعه اثر سیتوتوکسیک میوه گیاه *Ecballium elaterium* بر روی سه رده مختلف سلولی سرطانی. پایان نامه دکترای حرفه‌ای، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه اردبیل.52-60.

2- حسینی مهر، م.، مقدم متین، م.، بهرامی، ا.، صادقیان، ح.، صبور ملکی، ص. 1391. بررسی اثرات ضد سرطانی دو ترکیب 8 و 5-فارنسیل اکسی کومارین در رده سلولی *DU145* در شرایط *in vitro*. هفدهمین کنفرانس سراسری و پنجمین کنفرانس بین المللی زیست شناسی ایران. دانشگاه شهید باهنر کرمان. صفحه112-102.

3- عبدالحسینی، ع.، توتونچی صراف، ک.، ایرانلو، ع.، جعفری مقدم، ن. 1391. رابطه بین سرم آنتی ژن اختصاصی پروستات *PSA* با اندازه پروستات و توده بدنی *BMI* . مرکز تحقیقات بیمارستان رضوی دانشگاه علوم پزشکی مشهد. شماره 56. ص30-26.

4- نیازی، ع.، عبدالصمد شیخ زاده، ب.، نارویی، ح. 1388. بررسی فراوانی نقاط *AgNOR* در افتراق هایپرپلازی پروستات از آدنوکارسینوم پروستات. فصلنامه علمی پژوهشی فیض. شماره .25 ص 28-14.

5- وصال زاده، م.، نوری دلویی، ر. 1388. ژنتیک مولکولی، تشخیص، پیشگیری و ژن درمانی در سرطان پروستات. مجله علوم پزشکی دانشگاه تهران.شماره 29. ص14-1.

6.*Abascal, J.M., Hevia, S.M, Garcia, J.M .(2007). Brachyterapy in localized prostate cancer. Actas Urol Esp, 31; 617-625.*

7.*ATCC Cell Bank. (2012). Morphology of DU-145. Available from:http : // www. atcc. org/ Products/ All/ HTB-81. aspx#documentation.*

8.Cansino, J.R., Martinez, L. (2006). Molecular biology in prostate cancer. Clin Transl Oncol, 8; 48-62.

9.Charrier, J.P. (1999). Two-dimensional antigen in sera of men with prostate cancer or benign prostate hyperplasia. Electrophoresis, 20(10); 75-81.

10. Davis, J.M. (2010). Basic Cell Calture. 2nd ed. London Oxford University Press,P; 112-123.

11. Damber, J.E., Aus, G. (2008). Prostate cancer.2nd ed .Lancet, P; 10-51.

12. Elsadek, B., Graeser, R.N., Esser, N., Schafer, O.C.,Tsurumi, C., Abuajaj, K. (2011). In vivo evaluation of a novel albumin-binding prodrug of doxorubicin in an orthotopic mouse model of prostate cancer (LNCaP). Prostate Cancer and Prostatic Diseases, 14; 14-21.

13. Freshney, R.I. (2005). Culture of animal cells.5th ed. Wiley;.P.46-62.

14. Fuenmayor, M.E.P., Montero, N.J.M. (1997). In vitro clonal propagation of guava (Psidium guajava L.) stem shoot of cv Mara, Journal of Ethnopharmacology, 425; 47-52.

15. Kaighn, M.E. (1979). Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC3). Invest, 17; 16-23.

16. Kaileh, M.,Vanden, B., Berghe, W., Boonec, E., Essawib, T., Haegemana, G. (2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti inflammatory and cytotoxic activity. Journal of Ethnopharmacology,113; 510-516.

17. Khanavi, M., Moshteh, M., Manayi, A., Shams Ardekani, M.R., Vazirian, M., Ajani, Y. (2011). Cytotoxic activity of Lythrum salicaria L. Research Journal of Biological Sciences, 6 (2); 55-57.

18. Lampronti, I., Saab, A., Gambari, R. (2005). Medicinal plants from Lebanon effects of essential oils from Pistacia palaestina on proliferation and erythroid differentiation of human leukemic K562 cells. Minerva biotec, 17;153-158.

19. Lee,W.C., Roziahanim, M., Pillai, S., Perumal, S. (2012). Antioxidant activities of essential oil of Psidium guajava L. leaves. APCBEE Procedia, 2; 86-91.

20. Lisboa, A., Haas, L. I. R.,Chaves, F.C., Salvador, M. (2011). Araca (Psidium cattleianum Sabine)fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. Food Chemistry, 128; 916–922.

21. Madhuri, S., Pandey, G. (2009). Some anticancer medicinal plants of foreign origin. Current Science, 96;779-783.

22. Meshkini, A.,Yazdanparast, R. (2007). Induction of megakaryocytic differentiation in chronic myelo genous leukemia cell k562 by 3-hydro genkwada phnin, Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 40(6); 944-951.

23. Miller,G.J. (2000). Prostate cancer among the Chinese pathologic epidemiologic and nutritional considerations in Resnick MI, Thompson IM, Advanced Therapy of Prostate Disease. London Decker, 20; 18-27.

24. Miao, S., Shi, X., Zhang, H., Wang, S. (2011). Proliferation-attenuating and apoptosis-inducing effects of tryptanthrin on human chronic myeloid leukemia k562 cell line in vitro. International Journal of Molecular Sciences, 12; 331-345.

25. Muehlenbein, M.P., Bribiescas, R.G. (2005). Testosterone mediated immune functions and male life histories. Am J Hum Biol, 17; 52-58.

26. Singh, S.P. (2011). Postharvest biology and technology of tropical and subtropical fruits: cocona to mango. A volume in Wood head Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition; 213-245.

27. Sonoda, T., Nagata, Y., Mori, M., Miyanaga, N., Takashima, N., Okumura, K.(2004). A case control study of diet and prostate cancer in Japan possible protective effect of traditional Japanese diet. Cancer Sci, 95(2); 38-49.

28. Spector, D.L., Goldman, D., Leinwan, L.A. (1998). Cells. first ed. cold spring harbor laboratory press; P.1-25.

29. Subhash, C., Vivekananda, M., Anup Kumar Das, T. (2014). Essentials of Botanical Extraction. 2nd ed. Principles and Applications, 83-136.

30. Toyang, N., Waboc, H.K., Atehb, E.N., Davis, H., Tanec, P., Kimbud, S.F. (2012). In vitro anti-prostate cancer and ex vivo antiangiogenic activity of Vernonia guineensis Benth. (Asteraceae) tuber extracts. Journal of Ethnopharmacology, 41; 66-75.

31. Vos, J.E., Schoeman, H., Barjak, P., Watt, M.P.,Toerien, A.J. (2000). In vitro selection and commercial release of guava wilt resistant rootstocks. Acta Hort, 513; 69-79.

32.Wilkinson, A.N., Brundage, M.D., Siemens, R. (2008). Approach to primary care follow-up of patients with prostate cancer. Can Fam Physician, 54; 12-25.