(مقالهٔ پژوهشی)

بررسی فیتوشیمیایی و مقایسهٔ اثر انواع عصاره‌های بافت اسفنجی انار بر روی سلول‌های سرطانی روده Caco-2

مریم کلاهی[۱]، بابک مختاری[۲]، ندا میرزایی[۳*]

۱-استادیار گروه زیست‌شناسی.
۲-دانشیار گروه شیمی.
۳-کارشناس‌ارشد شیمی آلی.

چکیده

زمینه و هدف: هدف مطالعهٔ حاضر بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی چهار نوع عصارهٔ بافت اسفنجی انار (*Punica granatum* L.) بر روی سلول‌های سرطان روده Caco-2 بود.

روش بررسی: ترکیبات بافت اسفنجی انار با روش‌های فیتوشیمی مورد شناسایی قرار گرفت. به منظور بررسی خواص سیتوتوکسی‌سیتی و آنتی‌اکسیدانی، عصاره‌های اتانولی و ان_هگزانی بافت اسفنجی انار به دو روش سوکسله و خیساندن تهیه گردید. اثر این عصاره‌ها بر روی سلول‌های Caco-2 سرطان روده به وسیلهٔ آزمون‌های MTT، NBT ، TBA و میزان آنزیم کاتالاز (CAT) مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: بررسی‌های فیتوشیمیایی، حضور ترکیب‌های فلاونوئیدی، تانینی، آلکالوئیدی، ترپنوئیدی، آلدهیدی، کتونی و ویتامین C و عدم حضور ترکیب‌های استروئیدی، ساپونینی و پروتئینی را در بافت اسفنجی انار تأیید می‌کند. نتایج به دست آمده از بررسی میزان بقای سلولی با استفاده از روش MTT نشان داد که کم‌ترین بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده مربوط به عصارهٔ ان_هگزانی به روش سوکسله بوده-است. نتایج آزمون NBT بیانگر خاصیت پراکسیدانی عصارهٔ ان_هگزانی به روش سوکسله می‌باشد، تیمار سلول‌های سرطانی با این عصاره منجر به مرگ سلولی ناشی از آپوپتوز می‌شود. از طرف دیگر نتایج پراکسیداسیون غشایی نشان داد که بیشترین میزان تخریب غشایی سلول‌های تیمار شده به ترتیب مربوط به عصاره‌های ان_هگزانی به روش سوکسله و اتانولی به روش ماسراسیون بود. بالاترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به تیمار با عصارهٔ اتانولی به روش ماسراسیون بود.

نتیجه‌گیری: وجود ترکیبات مختلف شناسایی شده با ویژگی های پروآپوپتوزی در بافت اسفنجی انار نشان می‌دهد که به کار بردن ترکیبات این عصاره به تنهایی و یا همراه با داروهای ضدسرطان شیمیایی می‌تواند راه‌کاری نوین برای درمان سرطان باشد.

کلیدواژگان: آنتی‌اکسیدانی، انار، فیتوشیمیایی، سرطان روده.

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
۲و۳-گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

*نویسندهٔ مسؤول: ندا میرزایی؛ گروه شیمی، دانشکدهٔ علوم پایه، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۳۰۹۶۹۴۴
Email: nmirzaei56@yahoo.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۵/۱ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۵/۱/۱۶ اعلام قبولی: ۱۳۹۵/۱/۳۰

مقدمه

امروزه سرطان یکی از بیماری‌های شایع می‌باشد. بر اساس آخرین بررسی‌های آماری و اپیدمیولوژیک در ایران، سالانه بیش از ۳۰ هزار نفر در اثر سرطان جان می‌بازند و تخمین‌زده می‌شود که سالانه بیش از ۷۰ هزار مورد جدید سرطان در کشور رخ دهد. سرطان روده سومین سرطان پر شیوع در جهان بوده و دومین سرطان کشنده پس از سرطان ریه محسوب می‌شود. این سرطان در زنان در رتبهٔ سوم و در مردان در رتبهٔ پنجم قرار دارد (۱). از آن‌جا که بیشتر سرطان‌ها در افراد مسن بروز می‌کند و کشور ایران جمعیت نسبتاً جوانی دارد، با افزایش امید به زندگی انتظار می‌رود که در آیندهٔ نزدیک میزان بروز و مرگ‌ومیر این بیماری مهلک در کشور به سرعت افزایش یابد. بنابراین با توجه به اهمیت مبارزه با این بیماری مهلک (سرطان)، وجود برنامهٔ کنترل در کشور ضرورت دارد (۲).

راه‌های درمانی مختلف نظیر شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و جراحی علاوه بر هزینهٔ بالا، عوارض مختلفی دارند. استفاده از گیاهان دارویی به منزلهٔ درمان به صورت روز افزون رو به افزایش است. ترکیبات گیاهی (phytochemicals) قابلیت کاهش بروز تعدادی از تومورها را دارا می‌باشند (۳).

گیاهان دارویی به واسطهٔ داشتن طیف وسیعی از ترکیبات زیستی فعال، به عنوان یک منبع بالقوه از داروهای شیمی‌درمانی جدید مورد توجه ویژه هستند؛ گیاهان طی متابولیسم ثانویه، گروه‌های متعددی از فراورده‌های طبیعی از قبیل آلکالوئیدها، ترکیبات پلی فنولی، ترپنوئیدها و کومارین‌ها را تولید می‌کنند، که صرف‌نظر از نقش آنها در خود گیاه، در درمان بیماری-های انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴، ۵).

انار با نام علمی *Punica granatum* L. و نام انگلیسی Pomegranate گیاهی متعلق به خانوادهٔ Punicaceae است. متابولیت‌های موجود در قسمت‌های مختلف میوه و درخت انار شامل انواع قندها، اسیدهای آلی، آلکالوییدها، پلی‌فنل‌ها، فلاوونوییدها، آنتوسیانین‌ها، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و نظایر آن است. قندهای عمدهٔ موجود در عصارهٔ انار شامل: گلوکز، فروکتوز، ساکاروز و مالتوز (۶) و ویتامین‌های موجود در آن B2، B1، C و بتاکاروتن هستند، همچنین اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید سوکسینیک، اسید تارتاریک، اسید فوماریک، اسید اگزالیک در زمرهٔ مهم‌ترین اسیدهای آلی انار هستند (۶). انواع ترکیبات فنلی و تانینی در انار عبارت اند از: الاژیک اسید، گالیک اسید، پونیکالاژین، پونیکالین، کلروژنیک اسید، هیدروکسی سینامیک اسید، پروتوکاتچیک اسید، هیدروکسی بنزوئیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوماریک اسید، فلوریدزین، کوئرستین، کاتکین، پ-کوماریک اسید و او- کوماریک اسید (۶).

مطالعات فیتوشیمیایی و فارماکولوژیکی انار بیانگر این است که بیشتر ترکیبات انار، طیف وسیعی از کاربردهای بالینی برای درمان و پیش‌گیری از سرطان و همچنین بیماری‌های التهابی را دارا می‌باشند (۶).

در این میان عصارهٔ پوست انار دارای قابلیت و ظرفیت مهار یا ممانعت بیشتری در مقابل آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پروکسیل بوده و قدرت محدود کردن اکسیداسیون لیپوپروتئین‌های با دانسیتهٔ پایین توسط عصارهٔ پوست انار نسبت به سایر بخش‌های آن مثل میوهٔ درونی بیشتر است. تحقیقات انجام گرفته نشان داده است که عصارهٔ پوست انار دارای خواص ضدباکتریایی، ضد ویروسی، ضد جهش‌زایی و آنتی اکسیدانی بوده است (۷).

هدف از این تحقیق شناسایی فیتوشیمیایی ترکیبات تشکیل‌دهندهٔ بافت اسفنجی میوهٔ انار و بررسی خواص ضدسرطانی و آنتی اکسیدانی چهار نوع عصارهٔ اتانولی و ان- هگزانی به دو روش سوکسله و ماسراسیون بود.

روش بررسی

آماده‌سازی نمونه

بخش‌های اسفنجی میوهٔ انار رقم شیرین پوست نازک خوزستان به مدت یک هفته به دور از تابش مستقیم نور خورشید خشک شد، سپس نمونه‌ها به آسیاب منتقل شد. پس از ۱۵ دقیقه محتویات درون آسیاب از الک با مش ۲۵۰ میکرون عبور داده شد.

بررسی‌های فیتوشیمیایی

آزمون‌های فیتوشیمیایی مقدماتی بر روی نمونه‌های پودر شده با استفاده از روش‌های استاندارد جهت شناسایی متابولیت‌های ثانویه انجام گرفت (۸). این آزمون‌ها جهت بررسی ترکیبات گیاهی شامل: آلکالوئیدها، ساپونین‌ها، فلانوئیدها، تانن‌ها و استروئیدها، تری‌ترپنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، ویتامین C و پروتئین صورت گرفت.

شناسایی آلکالوئید

۰/۵ گرم از پودر گیاهی توسط ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک، به مدت ۵ دقیقه درون حمام آب گرم، حرارت داده شد. پس از صاف کردن، بر روی یک قطره از محلول نمونه تهیه شده معرف مایر (۹) و بر روی قطرهٔ دیگر معرف واگنر (۹) اضافه شد. در صورت وجود آلکالوئید رسوب ایجاد می‌گردد (۸، ۱۰).

شناسایی تانن

الف - واکنش رنگی با محلول آهن (III) کلرید

۰/۲ گرم از عصاره در ۵ میلی‌لیتر آب رقیق شد. سپس با چند قطره محلول آهن (III) کلرید ۵٪ تست شد. تغییر رنگ محلول به آبی یا سبز، نشان‌دهندهٔ تانن است.

ب- واکنش ایجاد رسوب با محلول استات سرب

۰/۱ گرم از عصاره با چند قطره محلول استات سرب ۱۰٪ حجمی_وزنی مورد ارزیابی قرار داده شد. ایجاد رسوب زرد رنگ نشان‌دهندهٔ حضور ترکیبات تاننی است (۸).

شناسایی استروئیدها

عصاره را با مقداری کلروفرم رقیق نموده و بعد ۲ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ به آن اضافه شد. تشکیل رنگ قرمز نشانهٔ وجود عصارهٔ حاوی استروئید می‌باشد (۱۱).

شناسایی ترپنوئید

۱) آزمون لیبرمن بورشارد (Liebermann – Burchard test): عصاره را با کلروفرم رقیق کرده و سپس چند قطره استیک انیدرید و سولفوریک‌اسید اضافه گردید. تشکیل لایهٔ قهوه‌ای رنگ نشان‌دهندهٔ حضور ترپنوئیدها است (۱۲).

۲) آزمون سالکوسکی (Salkowski's test): عصاره را با کلروفرم رقیق کرده و سپس چند قطره سولفوریک اسید غلیظ اضافه شد. تشکیل لایهٔ قهوه‌ای رنگ مایل به قرمز نشان‌دهندهٔ حضور ترپنوئیدها می‌باشد (۱۳).

شناسایی ساپونین

۰/۵ گرم از پودر گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر آب جوش مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه تکان داده شد. با ایجاد کف پایدار به ارتفاع حداقل ۱ سانتی‌متر جواب آزمون مثبت است (۸).

شناسایی فلاونوئیدها

الف) ۰/۵ گرم عصاره را در ۱/۵ میلی‌لیتر اتانول حل نموده و به آن ۰/۵ گرم پودر روی و ۵ قطره اسید کلریدریک غلیظ اضافه می‌نماییم. وجود رنگ قرمز، نشان‌دهندهٔ وجود آنتوسیانین و ترکیب‌های فلاونوئیدی است.

ب) چند قطره محلول سدیم هیدروکسید را به عصاره اضافه کردیم. ایجاد رنگ زرد، نشان‌دهندهٔ حضور ترکیبات فلاونوئیدی می‌باشد (۱۴).

شناسایی پروتئین‌ها

برای شناسایی پروتئین‌ها در عصاره از معرف Biuret (محلول سدیم هیدروکسید به همراه ۲ قطره محلول مس سولفات ۱٪) استفاده شد. تشکیل رنگ بنفش نشانه وجود پروتئین است (۱۳).

شناسایی ویتامین C

شناسایی ویتامین C با استفاده از آزمون DNPH (محلول سولفوریک اسید غلیظ در ۲ و ۴ دی نیتروفنیل هیدرازین) انجام شد. ایجاد رسوب زرد نشان‌دهندهٔ ویتامین c در عصاره می‌باشد (۱۲).

شناسایی آلدهید و کتون

با اضافه کردن معرف ۲ و ۴- دی‌نیتروفنیل هیدرازین، تشکیل رسوب زرد رنگ نشان‌دهندهٔ حضور ترکیبات آلدهیدی و کتونی در عصاره می‌باشد (۱۵).

شناسایی کربوهیدرات

عصاره در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. سپس با استفاده از دو آزمون مولیش (محلول آلفا نفتول) و فهلینگ شناسایی کربوهیدرات صورت گرفت (۱۶).

عصاره‌گیری از گیاه

پس از شناسایی مواد شیمیایی اصلی بافت اسفنجی انار، به منظور بررسی اثر عصاره این میوه بر بقای سلول‌های سرطانی روده، دو روش ماسراسیون و سوکسله توسط دو حلال اتانول و ان_هگزان مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش ماسرسیون: تهیهٔ عصاره‌ها با روش غوطه‌وری در دو حلال اتانول ۹۶٪ و ان_هگزان انجام گرفت. بدین منظور ۵۰ میلی‌لیتر حلال به ۱۵ گرم از پودر بخش‌های اسفنجی میوهٔ انار در یک ارلن دربسته، افزوده و مخلوط حاصل به مدت ۷۲ ساعت توسط همزن مغناطیسی محلول همزده شد. پس از مدت زمان فوق عصاره‌های حاصل به وسیلهٔ کاغذ صافی معمولی از بخش جامد جدا شدند. عصاره‌های اتانولی و ان_هگزانی ابتدا به وسیلهٔ تبخیرکنندهٔ چرخان و تحت خلاء تغلیظ و تا زمان استفاده در ویال‌های شیشه‌ای کهربایی در فریزر ºC ۲۵- قرار گرفتند (۱۷).

روش استخراج مداوم (سوکسله): مقدار ۱۵ گرم از پودر بخش‌های اسفنجی میوهٔ انار به دقت وزن شد و در انگشتانه دستگاه سوکسله ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد، سپس با استفاده از ۲۵۰ میلی‌لیتر از حلال‌های اتانول ۹۶٪ و ان_هگزان عمل عصاره‌گیری به مدت ۸ ساعت انجام گردید. پس از کامل شدن فرآیند عصاره‌گیری، حلال تحت خلاء تبخیر گردید. عصاره‌های استخراج شده تا زمان استفاده در ویال‌های شیشه‌ای کهربایی در فریزر ºC ۲۵- نگه‌داری شدند (۱۷).

کشت سلولی

ردهٔ سلولی آدئوکارسینومای اپی‌تلیال رودهٔ بزرگ انسانی Caco-2، (NCBI code: C139) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی (FBS) در فلاسک کشت سلولی $25\ cm^2$ (Nunc دانمارک) و در شرایط مناسب در انکوباتور ۳۷ ℃ و CO_2 ۵ درصد کشت داده شدند (۱۸).

بررسی تیمار و سمیت عصارهٔ بافت اسفنجی انار با روش MTT assay

به منظور بررسی اثر عصارهٔ بافت اسفنجی انار بر رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی، از روش رنگ-سنجی MTT استفاده شد. این روش بر اساس توانایی سلول‌های زنده در تبدیل نمک تترازولیوم به فورمازان نامحلول بنا شده است. جهت انجام آزمایش، سلول‌های Caco-2 در پلیت ۹۶ خانه‌ای و در هر خانه ۴×۱۰^۳ سلول در حجم µL ۱۵۰ محیط DMEM کشت داده شدند. پس از تیمار سلول‌ها با انواع عصاره‌های بافت اسفنجی انار به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها تریپسینه و پس از سانتریفیوژ، رسوب داده شدند. ۵۰ میکرولیتر رسوب سلولی (تست) و ۵۰ میکرولیتر بافر PBS (بلانک) به‌صورت جداگانه به پلیت‌های ۹۶ خانه منتقل و سپس ۱۰ میکرولیتر MTT (۵mg/ml، ۰/۰۰۵ گرم MTT در ۱۰۰۰ میکرولیتر PBS) افزوده و حداقل ۳/۵ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر دی‌متیل‌سولفوکسید افزوده و ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شدند و پس از آن جذب در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر اساس مقایسهٔ جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۵۶۰ نانومتر نسبت به گروه کنترل

گزارش گردید. همهٔ آزمایش‌ها به صورت سه تکرار انجام شد (۱۸).

تست NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

سلول‌های Caco-2 با غلظت ۲×۱۰^{۵} در میلی‌لیتر در پلیت‌های ۲۴ حفره در محیط DMEM حاوی FBS ۱۰٪ کشت داده شدند. جهت انجام این تست به ۱۰۰ میکرولیتر نمونهٔ سلولی لیز شده (تست) و ۱۰۰ میکرولیتر بافر PBS (بلانک) به‌صورت جداگانه، ۲۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین افزوده و سپس دو بار با دور ۵۰۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام گردید. سپس به رسوب باقی‌مانده ۱۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین و ۱۰۰ میکرولیتر NBT ۰/۰۱ درصد (۰/۰۱ گرم در ۱۰۰ میلی-لیتر فسفات بافر سالین) که به نسبت ۱ به ۱۰ با PBS رقیق شده اضافه و به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس به نمونه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر فسفات بافر سالین افزوده و با دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. پس از جداسازی مایع رویی، ۶۰ میکرولیتر دی متیل‌سولفوکسید و ۶۰ میکرولیتر پتاسیم هیدروکسید ۲ مولار به رسوب حاصل از مرحلهٔ قبل اضافه، و جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر اساس میزان جذب فورمازون تولید شده گزارش گردید (۱۹).

نحوهٔ اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی به روش TBA

مالون‌دی‌آلدهید یکی از موادی که در اثر پراکسیداسیون اسیدهای چرب در سلول‌ها تولید می شود، این ماده در معرض تیوباربیتوریک اسید (TBA) تشکیل پیوند می‌دهد و کمپلکس این دو ماده (TBA-MDA-) در نمونه‌ها قابل تشخیص است.

سلول‌های کشت شده در پلیت‌های ۶ خانه‌ای به-مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با عصاره‌های مختلف قرار گرفتند. محلول حاوی ۱۵٪ TCA، ۰/۳۷۵٪ تیوباربیوتیک اسید و هیدروکلریدریک اسید ۱۵ نرمال به مایع روئی سلول‌های هموژنه شده اضافه گردید؛ پس از هم‌زدن، وارد لوله‌های سانتریفیوژ شده و ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. درب لوله‌ها بسته و در دمای ۹۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۵ تا ۶۰ دقیقه انکوبه گردید؛ لوله‌ها برداشته شد و با استفاده از ظرف یخ به دمای اتاق رسید، نمونه‌ها در ۳۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی از لوله‌ها جمع‌آوری شده در داخل کوبت اسپکتروفوتومتر ریخته و میزان جذب در طول موج نوری ۵۳۲ نانومتر سنجیده شد (۲۰).

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

به ۱۰۰ میکرومولار از مایع رویی سلول‌های هموژنه شده تحت تیمار، بافر Tris-HCl mM ۰/۰۵ (اسیدیته۷/۸) و $H_۲O_۲$ (۱۰ mM) اضافه گردید و پس از ده دقیقه به مخلوط بالا ۵۰۰ میکرومولار مولیبدات-آلومینیوم افزوده شد. فعالیت کاتالاز با توجه به روند تجزیه $H_۲O_۲$ و در نتیجهٔ کاهش جذب در nm ۴۱۰ سنجیده و به ازای میلی‌گرم پروتئین عصارهٔ آنزیمی محاسبه شد (۲۰).

سنجش پروتئین

اندازه‌گیری پروتئین با استفاده از سنجش برادفورد (۱۹۷۶) انجام شد. در این روش برای تعیین مقادیر پروتئین از منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های معین پروتئین استفاده می‌شود.

آنالیز آماری دادها

آزمون نرمال داده‌های به دست آمده با نرم افزار SPSS انجام گردید، مقایسهٔ میانگین داده‌ها با روش دانکن انجام شد. نمودار های مقایسه میانگین با نرم‌افزار Excel رسم شدند (۲۱).

یافته‌ها

نتایج به دست‌آمده از بررسی‌های مقدماتی فیتوشیمیایی، حضور ترکیب‌های فلاونوئیدی، تاننی، آلکالوئیدی، ترپنوئید، آلدهید و کتون‌ها و ویتامین C (به مقدار کم) را در بافت اسفنجی انار تأیید می‌کند. در حالی که ترکیب‌های استروئیدی، ساپونینی و پروتئینی در این

میوه یافت نشد. نتایج این بررسی‌های فیتوشیمیایی در جدول ۱ ارائه شده است.

نتایج مورفولوژی سلول‌های تحت تیمار

نتایج مورفولوژی با استفاده از میکروسکوپ نوری نشان می‌دهد که سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصارهٔ بافت اسفنجی انار نسبت به نمونهٔ کنترل، تغییرات مورفولوژیکی داشته اند. اثر عصارهٔ وابسته به نوع حلال و روش استخراج قابل مشاهده بود. تغییرات مورفولوژی در سلول‌های Caco-2 تیمار شده در زمان ۲۴ ساعت، بیشترین اثرات سایتوتوکسیک را در عصارهٔ ان_هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله نشان دادند. سلول‌های تحت تیمار نشان‌دهندهٔ تغییرات مورفولوژیکی بارز از جمله تغییرات در حالت طبیعی غشای سلولی و گرانوله شدن سلول‌ها، چروکیده شدن غشای هسته و کاهش حجم سلول را نشان دادند. در ضمن تعدادی از سلول‌ها از کف فلاسک جدا شده و شناور بودند (شکل۱).

نتایج سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT

از مقایسهٔ داده‌های به دست‌آمده از سنجش درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصارهٔ اتانولی و عصارهٔ ان_هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین درصد زنده مانی سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمارشده با سه عصارهٔ (اتانولی به روش سوکسله و ان_هگزانی به دو روش سوکسله و ماسراسیون) نسبت به گروه کنترل در سطح $p<$ ۰/۰۵ معنادار بود. اما گروه تیمار شده با عصارهٔ اتانولی ماسراسیون نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری نداشت. میانگین زیستی سلول‌های تیمار شده با عصاره اتانولی به روش سوکسله اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه تیمار با عصاره ان- هگزانی به روش ماسراسیون در اندازه‌گیری درصد بقا سلول نشان نداد. بیشترین و کمترین میزان ممانعت کنندگی سلول‌ها بترتیب مربوط به گروه های تیمار شده با عصارهٔ ان_هگزانی به روش سوکسله و اتانولی به روش ماسراسیون بود ($p <$ ۰/۰۵) (شکل۲).

نتایج اندازه‌گیری درصد رادیکال‌های آزاد NBT (Nitro Blue Tetrazolium)

از مقایسهٔ داده‌های به دست‌آمده از میزان درصد رادیکال‌های آزاد سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصارهٔ اتانولی و عصارهٔ ان_هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین میزان کاهش NBT بعنوان عامل اکسیدان در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح $p<$۰/۰۵ معنادار بود. میزان تولید رادیکال‌های آزاد در گروه‌های تیمار شده با عصاره اتانولی به روش سوکسله نسبت به عصاره‌های ان- هگزانی به روش‌های سوکسله و ماسراسیون اختلاف معنی‌داری داشتند. میزان تولید رادیکال‌های آزاد در گروه‌های تیمار شده با عصاره اتانولی به روش ماسراسیون با اختلاف معنی‌داری بیشتر از سایر عصاره‌ها و همچنین گروه کنترل بود. همچنین تولید رادیکال‌های آزاد در گروه‌های تیمار شده با عصاره ان_هگزانی به روش ماسراسیون و سوکسله کمترین مقدار را نشان دادند ($p<$۰/۰۵) (شکل۳).

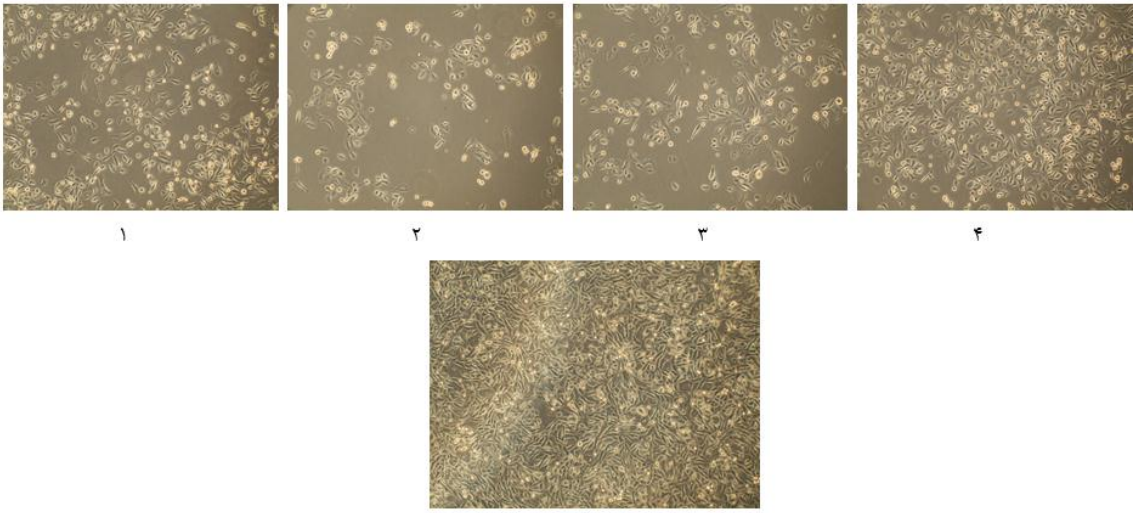
نتایج اندازه‌گیری میزان پراکسیداسیون لیپیدی به روش TBA

از مقایسهٔ داده‌های به دست‌آمده از میزان پراکسیداسیون غشایی سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصارهٔ اتانولی و عصارهٔ ان_ هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله، مشخص شد که تفاوت میانگین درصد میزان پراکسیداسیون غشایی سلول‌های سرطانی در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمار شده، نسبت به گروه کنترل معنادار بود. میانگین میزان پراکسیداسیون غشایی سلول‌های تیمار شده با عصارهٔ اتانولی به روش سوکسله اختلاف معناداری نسبت به گروه تیمار با عصارهٔ ان_هگزانی به روش ماسراسیون نشان نداد. اما میانگین میزان پراکسیداسیون غشایی سلول‌های تیمار شدهٔ عصارهٔ اتانولی به روش سوکسله نسبت به گروه‌های تیمار شده با عصاره‌های ان_هگزانی

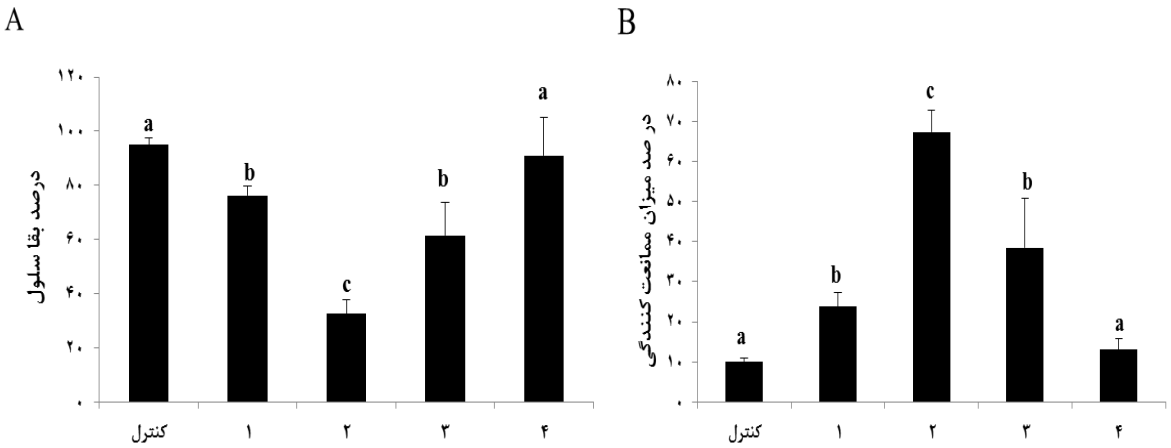
به روش سوکسله و اتانولی به روش ماسراسیون اختلاف معناداری داشت. بیشترین میزان پراکسیداسیون مربوط به گروه‌های تیمار شده با عصارهٔ اتانولی به روش ماسراسیون و ان_ هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله بود ($p<۰/۰۵$) (شکل۴).

نتایج اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاتالاز

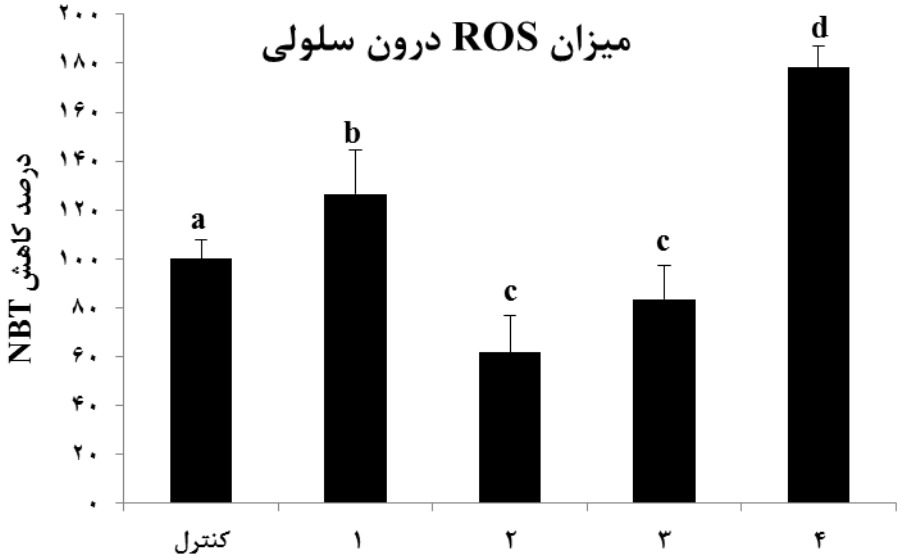
از مقایسهٔ داده‌های به دست‌آمده، میزان فعالیت آنزیم در سلول‌های سرطانی تیمار شده با عصارهٔ اتانولی و عصارهٔ ان_هگزانی به روش‌های ماسراسیون و استفاده از دستگاه سوکسله، تفاوت میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز سلول‌ها در زمان ۲۴ ساعت در گروه‌های تیمار نسبت به گروه کنترل در سطح ($P<۰/۰۵$) معنادار بود. فعالیت آنزیم کاتالاز سلول‌های تیمار شدهٔ عصارهٔ اتانولی به روش سوکسله اختلاف معناداری نسبت به گروه تیمار با عصارهٔ ان_هگزانی به روش سوکسله نشان نداد. اما میانگین فعالیت آنزیم کاتالاز سلول‌های تیمار شده با عصارهٔ اتانولی به روش سوکسله نسبت به گروه‌های تیمار شده با عصاره‌های اتانولی و ان_هگزانی به روش ماسراسیون اختلاف معناداری داشت. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه‌های تیمار شده با عصاره‌های اتانولی به روش ماسراسیون بود ($p < ۰/۰۵$) (شکل۵).



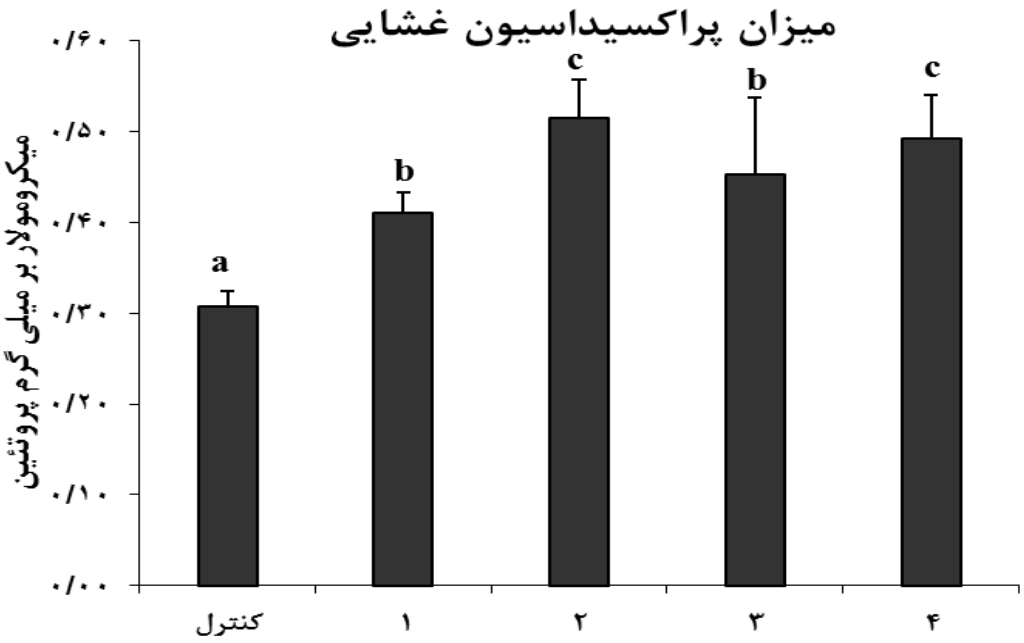
شکل ۱: ارزیـابی مرفولـوژی سلول های سرطانی تیمار شده با عصارهٔ اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصارهٔ ان_هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصارهٔ ان_هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصارهٔ اتانولی به روش ماسراسیون(۴) بافت اسفنجی انار.



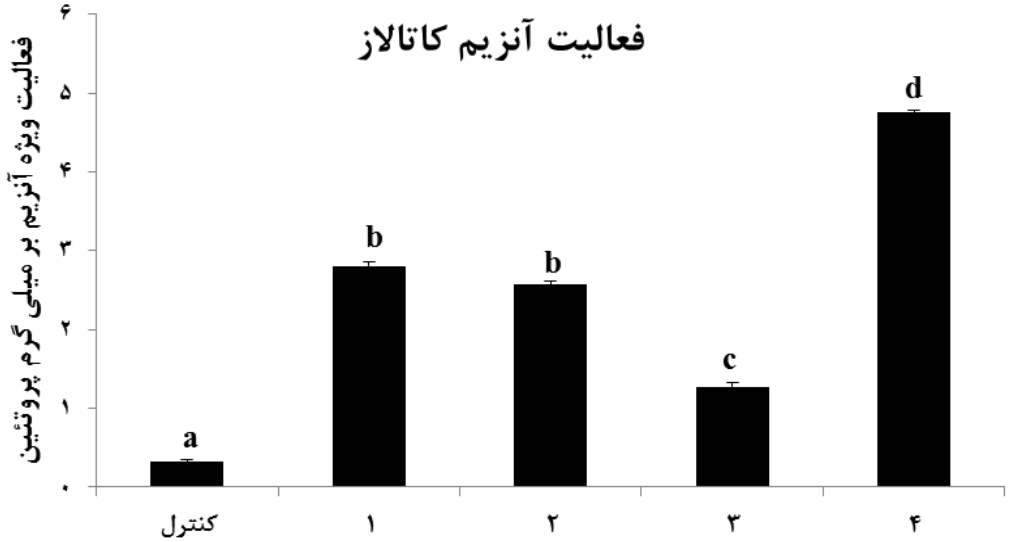
شکل ۲: سنجش توانایی زیستی سلول‌ها به روش MTT در سلول های سرطانی های تیمار شده با عصاره اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصاره ان- هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصاره ان- هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصاره اتانولی به روش ماسراسیون (۴) بافت اسفنجی انار. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح $p < ۰/۰۵$ است.



شکل ۳: درصد کاهش NBT در سلول های سرطانی های تیمار شده با عصارهٔ اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصارهٔ ان_هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصارهٔ ان_ هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصارهٔ اتانولی به روش ماسراسیون (۴) بافت اسفنجی انار. حروف متفاوت نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار در سطح $p < ۰/۰۵$ است.



شکل ۴: میزان پراکسیداسیون غشایی در سلول های سرطانی های تیمار شده با عصارۀ اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصارۀ ان_ هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصارۀ ان_ هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصارۀ اتانولی به روش ماسراسیون (۴) بافت اسفنجی انار. حروف متفاوت نشان‌دهندۀ تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ > p است.



شکل ۵: درصد فعالیت آنزیم کاتالاز در سلول های سرطانی های تیمار شده با عصارۀ اتانولی با استفاده از دستگاه سوکسله (۱)، عصارۀ ان_هگزانی با استفاده از دستگاه سوکسله (۲)، عصارۀ ان_هگزانی به روش ماسراسیون (۳) و عصارۀ اتانولی به روش ماسراسیون (۴) بافت اسفنجی انار. حروف متفاوت نشان‌دهندۀ تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵ >p است.

جدول ۱: بررسی‌های فیتوشیمیایی بافت اسفنجی انار

مواد موثره	آلکالوئید		فلانوئید		ترپنوئید	ساپونین		تانن	استروئید	ویتامین C	پروتئین	کربوهیدرات‌ها		آلدهید و کتون‌ها
آزمون‌های انجام شده	آزمون مایر	آزمون واگنر	آزمایش Pew	آزمون سدیم هیدروکسید	آزمون لیبرمن بورشارد	آزمون سالکوسکی	آزمون کف کنندگی	آزمون استات سرب	آزمون کلروفریک	استفاده از اسیدسدلفوریک	آزمون DNPH	معرف Biuret	آزمون مولیش	معرف فهلینگ	۲ و ۴- دی نیترو فنیل هیدرازین
بافت اسفنجی انار	+	+	+	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−	+

بحث

گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویهٔ متعددی هستند که ساختارهای متفاوتی دارند. استخراج این ترکیبات به عوامل متعددی بستگی دارد که مهم‌ترین آن‌ها حلال و روش استخراج می‌باشند. انتخاب حلال و روش استخراج بستگی به قسمت‌های مختلف یک گیاه و نیز مواد تشکیل‌دهندهٔ آن دارد. هدف این مطالعه، شناسایی مقدماتی ترکیبات فیتوشیمیایی بافت اسفنجی انار و بررسی مقایسه‌ای تأثیر عصاره‌های اتانولی و ان-هگزانی آن به دو روش سوکسله و ماسراسیون بر روی ردهٔ سلولی Caco-2 سرطان روده بود.

مطالعات زیادی نشان می‌دهند که انار یکی از بهترین و مغذی‌ترین میوه‌ها برای حفظ سلامت عمومی بدن است. یافته‌های کلینیکی نشان می‌دهند که بین ترکیبات فنلی انار و اثرات مثبت آن در تقویت سیستم ایمنی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، مشکلات قلبی عروقی و اختلالات اسکلتی_عصبی انسان و حیوان ارتباط مستقیمی وجود دارد (۷، ۲۲).

آزمون‌های فیتوشیمیایی انجام شده بیانگر وجود ترکیب‌های فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، تانني، ترپنوئید، آلدهید و کتون‌ها و ویتامین C (به مقدار کم) در بافت اسفنجی انار بود. مقایسهٔ ترکیبات استخراج شده از بافت اسفنجی انار در این مطالعه با سایر تحقیقات انجام شده نشان می‌دهد که با توجه به تکنیک استخراج و نوع حلال مقادیر متفاوتی از ترکیبات فلاونوئیدی، تانني، اسیدهای چرب و ویتامین C گزارش شده است که به لحاظ آماری قابل مقایسه می‌باشند (۲۳). تمامی عصاره‌های به دست آمده از بافت اسفنجی انار خواص سیتوکسی سیتی خوبی نشان دادند. بررسی تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها نیز با استفاده از میکروسکوپ نوری معکوس خواص سیتوکسی سیتی عصاره‌ها را تأیید کرد که دلیلی بر وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که عصارهٔ متانولی پوست انار طیف وسیعی از فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی دارد که به روش‌های DPPH و FRAP ارزیابی شدند (۲۴، ۲۵).

مطالعهٔ عصارهٔ اتیل استاتی انار نشان داد که عصارهٔ پوست انار در مقایسه با سایر بخش‌ها، دارای بیشترین اثر باز دارندگی رشد سلول‌های سرطانی شش می‌باشد. نحوهٔ اثر این عصاره بر سلول‌های سرطانی به روش آنکسین شناسایی شد (۲۶).

پژوهشگران در سال ۲۰۰۷، پلی فنل‌های موجود در پوست میوه، برگ، گل و میوهٔ انار را به عنوان بهترین آنتی‌اکسیدان معرفی کردند و نشان دادند که این ترکیبات نقش مهمی در پیش‌گیری و درمان تصلب شرایین، فشار خون و مخصوصاً جلوگیری از رسوب رگ‌های قلبی در مدل انسانی و حیوانی دارد (۲۷).

نتایج حاصل از سنجش توانایی زیستی نشان می‌دهد که کمترین بقای سلول‌های سرطانی تیمار شده مربوط به عصارهٔ ان_هگزانی به روش سوکسله بوده است. در روش سوکسله حرارت باعث تخریب برخی ترکیبات آلی عصاره شده که بر روی درجهٔ حلالیت ترکیبات مؤثره تأثیرگذار می‌باشند. حلال ان_هگزان دمای جوش بین ۶۳ تا ۶۹ درجهٔ سانتی‌گراد داشته و علاوه بر آن حلالیت مواد روغنی، اسیدهای چرب و تانن‌ها در آن بالا می‌باشد (۲۸). به نظر می‌رسد، وجود شرایطی چون گردش حلال، حرارت (جوشش حلال) در روش سوکسله (با حلال ان_ هگزان) باعث می‌شود که میانگین میزان استخراج اسیدهای چرب و ترکیبات تانني از جمله پونیک اسید بیشتر از روش خیساندن باشد (۲۸). بر اساس یافته‌های محققان این ترکیبات مادهٔ مؤثر اصلی انار است، که دارای اثر ممانعت کنندگی بر رشد و حیات انواع سلول‌های سرطانی است (۶).

تیمار سلول‌های سرطان شش به مدت ۷۲ ساعت توسط عصارهٔ میوهٔ انار، چرخهٔ سلولی را در فاز G ۰/۵۱ متوقف کرد و باعث کاهش بیان پروتئین‌های سیکلین شد. القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان سینهٔ موش بعد از

تزریق عصارهٔ انار به‌واسطهٔ افزایش فعالیت کاسپاز ۳ مشاهده شد (۲۹). تحقیقات انجام شده نشان دادند که ترکیبات لینوئیک اسید و پونیسیک اسید موجود در آب و دانهٔ انار دارای اثر ضدسرطانی هستند (۶). الاژی تانن‌ها و تانن‌های هیدرولیز شده موجود در انار و همچنین الاژیک اسید باعث القای آپوپتوز در سلول‌های سرطان رودهٔ نوع Caco-2 شده‌اند (۳۰).

محققان در بررسی اثر ضد سرطانی عصارهٔ انار به درمان سرطان پستان در مدل حیوانی پرداختند و نشان دادند که به ترتیب آب و پوست میوه به دلیل سرشار بودن از فلاونوئیدهایی مانند: لوتئولین، روتین، کوئرستین و کامفرول و همچنین ترکیبات فنلی مثل: الاژیک اسید و گالیک اسید خاصیت ضدسرطانی دارد (۳۱).

پلی‌فنول‌ها انواعی از آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که با اعمال مختلف از جمله خنثی کردن رادیکال‌های آزاد در جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها از جمله در سرطان نقش دارند، این ترکیبات بسیار متنوع هستند و اثرات متفاوتی دارند (۳۲).

در بررسی میزان کاهش رادیکال آزاد در سلول‌های تیمار شده به روش NBT مشخص شد که عصارهٔ انار دارای فعالیت به‌دام اندازی رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید است که این ویژگی مربوط به آنتوسیانین‌ها و ترکیبات پلی‌فنلی موجود در عصاره می‌باشد (۳۳)، این ترکیبات علاوه بر این توان کلایته کردن فلزات را دارند (۳۴).

همچنین نتایج آزمون NBT نشان می‌دهد که عصارهٔ اتانولی به روش ماسراسیون دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. در این روش حلال اتانول به دلیل قطبی بودن بسیاری از ترکیبات پلی فنولی و فلاونوئیدی را در خود حل می‌نماید، که این ترکیبات نقش مهمی در جذب رادیکال‌های آزاد سلول‌ها دارند. حضور انواع آنتوسیانین‌ها و فلاونوئیدها در آب انار و روغن دانهٔ آن گزارش شده است و مشخص شده است که عصارهٔ آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی سه برابر چای سبز دارد. (۳۴، ۳۵).

نتایج پژوهش ما نشان داد که عصارهٔ ان- هگزانی به روش سوکسله دارای خاصیت پراکسیدانی می‌باشد که با افزایش میزان رادیکال‌های آزاد در سلول‌های سرطانی، سلول را به مسیر آپوپتوز می‌برد. طبق تحقیقات انجام شده روش سوکسله با حلال ان-هگزان در استخراج ترکیبات اسیدهای چرب موثرتر می‌باشد. که این امر در حلالیت ترکیبات پلی‌فنولی تأثیرگذار می‌باشد و در نتیجه ترکیبات متفاوتی را نسبت به سایر روش‌ها استخراج می‌کند (۶).

طبق نتایج این مطالعه، میزان پراکسیداسیون غشایی در عصاره اتانولی به روش ماسراسیون بیشتر بوده است. روش سوکسله سبب استخراج اسیدهای چرب غیر اشباع بیشتر و روش ماسراسیون سبب استخراج اسیدهای چرب اشباع بیشتر می‌گردد (۲۴). عصارهٔ میوهٔ انار و پونیک اسید، یک اسید چرب غیر اشباع چند زنجیره شناسایی شده در انار باعث القای آپوپتوز در سلول سرطانی سینهٔ حساس به استروژن (MDA- MB-231) به واسطه پراکسیداسیون لیپیدی شد (۳۶).

کاتالاز یک آنزیم آنتی‌اکسیدانی شاخص است که در سلول‌های تیمار شده با انواع عصارهٔ انار میزان آن افزایش یافته است. بیشترین فعالیت آنزیم کاتالاز مربوط به عصارهٔ اتانولی به روش ماسراسیون است که به دلیل استخراج بیشتر ترکیبات فلاونوئیدی با حلال اتانولی، و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها است که باعث راه‌اندازی سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان در سلول‌ها می‌شود. در استخراج عصاره با حلال اتانول و به روش سوکسله، حرارت باعث تخریب بسیاری از ترکیبات فنلی و کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی شده است.

عصارهٔ ان- هگزانی به روش ماسراسیون دارای کمترین میزان فعالیت آنزیم کاتالاز می‌باشد که به دلیل درصد استخراج پایین ترکیبات فلاونوئیدی و همچنین استخراج اسیدهای چرب که در حلالیت این ترکیبات

تأثیرگذار می‌باشند، و نهایتاً خاصیت پرواکسیدانی این ترکیبات است.

طبق بررسی‌های انجام شده در این پژوهش، حضور ترکیبات فلاونوئیدی، آلکالوئیدی، تاننی در بافت اسفنجی انار با فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه این عصاره هم‌سو است. همچنین نتایج با تأیید تحقیقات دیگر نقش پر اهمیت قطبیت حلال‌ها در استخراج ترکیبات پلی‌فنولیکی از بخش اسفنجی انار را نشان می‌دهد که البته آنتوسیانین‌ها نیز جزئی از همین ترکیبات است (۲۶). همچنین تحلیل داده‌های روش‌های مختلف استخراج نشان داد در استخراج و جداسازی اسیدهای چرب، ترپن‌ها (که در مقابل حرارت پایدارند) از بافت اسفنجی انار، روش سوکسله مناسب‌تر می‌باشد. ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با طبیعت قطبی و داشتن فراریت، کارایی خود در دماهای بالا را تا حدودی از دست می‌دهند (۳۷) بنابراین روش ماسراسیون در استخراج این ترکیبات مؤثرتر بود.

یافته‌های ما نشان می‌دهد که به کار بردن ترکیبات موجود در بافت اسفنجی میوهٔ انار به تنهایی و یا همراه با داروهای ضد سرطان شیمیایی می‌تواند راهکاری نوین برای درمان سرطان باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به لحاظ تامین هزینه‌های این پژوهش (پژوهانه های شماره ۸۴۶۷۰ /۹۳/۳/۲ و ۳۱۵۷۹ /۹۳/۴/۱۲) تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1-Yonkers KA, O'Brien PM, Eriksson E. Premenstrual syndrome. Lancet 2008Apr; 371(9619): 1200-10.doi:10.1016/S0140-6736(08)60527-9.

2-Freeman EW. Premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder: definitions and diagnosis. Psychoneuroendocrinology 2003Aug; 28 (Suppl 3): 25-37.

3-Silva CM, Gigante DP, Minten GC. Premenstrual symptoms and syndrome according to age at menarche in a 1982 birth cohort in southern Brazil. Cadernos Saúde Pública 2008; 24(4): 835-44.

4-Delara M, Ghofranipour F, Azadfallah P, Tavafian SS, Kazemnejad A, Montazeri A. Health related quality of life among adolescents with premenstrual disorders: a cross sectional study. Health Qual Life Outcomes 2012Jan; 10: 1. doi: 10.1186/1477-7525-10-1

5-Ozisik Karaman HI, Tanriverdi G, Degirmenci Y. Subjective sleep quality in premenstrual syndrome. Gynecol Endocrinol 2012Aug; 28(8): 661-4. doi: 10.3109/09513590.2011.650769.

6-Cheng SH1, Shih CC, Lee IH, Hou YW, Chen KC, Chen KT, "et al". A study on the sleep quality of incoming university students. Psychiatry Res 2012May; 197(3): 270-4. doi: 10.1016/j.psychres.2011.08.011.

7-Gold EB, Bair Y, Block G, Greendale GA, Harlow SD, Johnson S, "et al". Diet and lifestyle factors associated with premenstrual symptoms in a racially diverse community sample: Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). J Women's Health (Larchmt)2007; 16(5): 641-56.

8-Healthy Weight - it's not a diet, it's a lifestyle. CDC. Online. Available at: http://www.cdc.gov/healthyweight/. Accessed Apr 24, 2016.

9-Amiri Farahani L, Heidari T, Narenji F, Asghari Jafarabadi M, Shirazi V. [Relationship between pre menstrual syndrome with body mass index among university students]. Hayat 2011; 17(4): 85-95. [In Persian]

10-Mohammadi V, Shidfar F, Keshtkar Aghababaee S, Mokhtari P, Mohammadi R, Gohari MR. [The relationship of anthropometric indices with PMS and it's severity in female students of Tehran University of Medical Sciences]. RJMS 2013; 20(109): 87-94. [In Persian]

11-Rapkin A. A review of treatment of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder. Psychoneuroendocrinology 2003Aug; 28(Suppl 3): 39-53.

12-Shobeiri F, Jenabi E. [The Effects of Vitamin E on Muscular Pain Reduction in Students Affected by Premenstrual Syndrome]. Iran J Obstetrics, Gynecol Infertil 2014; 17(96): 1-5. [In Persian]

13-Willett WC, Koplan JP, Nugent R, Dusenbury C, Puska P, Gaziano TA. Prevention of chronic disease by means of diet and lifestyle changes. IN: Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, "et al", editors. Disease control priorities in developing countries. 2nd edition. Washington (DC): World Bank; 2006. P. 833-50

14-Dietary guidelines for Americans. 2010. ODPD. Online. Available at: www.dietaryguidelines.gov. Accessed Apr 24, 2016.
15-Safavi SM. Omidvar N. Djazayery A. Minaie M. Hooshiarrad A, "et al". Development of Food-Based Dietary Guidelines for Iran: A Preliminary Report. Ann Nutr Metabol 2007; 51(Suppl 2): 32–5.
16-ACOG. ACOG practice bulletin: premenstrual syndrome. Obstet Gynecol 2010Dec; 116(6): 1492-503.
17-Erbil N, Karaca A, Kiris T. Investigation of premenstrual syndrome and contributing factors among university students. Turk J Med Sci 2010; 40 (4): 565-73.
18-Rasheed P, Saad Al-Sowielem L. Prevalence and predictors of premenstrual syndrome among college-aged women in Saudi Arabia. Ann Saudi Med 2003Nov-Dec; 23 (6): 381-7.
19-Lissner L, Björkelund C, Heitmann BL, Seidell JC, Bengtsson C. Larger hip circumference independently predicts health and longevity in a Swedish female cohort. Obes Res 2001Oct; 9(10): 644-6.
20-Zhang E, Li X, Zhang B, Cai L, Tao X, Xing W, "et al". Relationship between obesity and menstrual disturbances among women of productive age. Heart 2012; 98(Suppl 2): E156. doi: 10.1136/heartjnl-20
21-Himes JH, Park K, Styne D. Menarche and assessment of body mass index in adolescent girls. J Pediatr 2009Sep; 155(3): 393-7. doi: 10.1016/j.jpeds.2009.03.036.
22-Lee SE, Yang JY, Lee JH, Kim HW, Kim HS, Lee HJ, "et al". Relationship of age at menarche on anthropometric index and menstrual irregularity in late adolescent girls in Seoul. Ann Pediatr Endocrinol Metabol 2013Sep; 18(3): 116-21. doi: 10.6065/apem.2013.18.3.116.
23-Bakhshani N, Hasanzadeh Z. [Relationship of Premenstrual Syndrome and Nutritional Style]. Med J Mashhad Uni Med Sci 2012; 55(3):151-7. [In Persian]
24-Darabi F, Rasaie N, Jafarirad S. The relationship between premenstrual syndrome and food pattern in university student girls. Jentashapir J Health Res 2014; 5(6): e26656 , doi: 10.5812/jjhr.26656

A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of Pomegranate Extracts Spongy Tissue on Colon Cancer Cells Caco-2

Maryam Kolahi[1*], Babak Mokhtari[2], Neda Mirzaee[3*]

1-Assistant Professor of Biology.
2-Associated Professor of Chemistry.
3-M.Sc of Organic Chemistry.

1-Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
2,3-Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

**Corresponding author:*
Neda Mirzaee; Department of Chemistry, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.
Tel:+989163096944
Email:nmirzaei56@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: The goal of this studying was evaluation of anticancer and anti-oxidant properties of four types of extracts from Pomegranate (*Punica granatum* L) spongy tissue on colon cancer cells Caco-2.

Subjects and Methods: The phytochemicals of spongy tissues of pomegranate were identified by phytochemical methods. In order to evaluate cytotoxic and anti-oxidant characteristics, ethanolic and n-hexane extracts from pomegranate spongy tissues were collected, using Soxhlet apparatus and maceration methods. The effects of these extracts on Caco-2 colon cancer cells were evaluated using MTT, NBT and TBA tests, as well as catalase enzyme levels.

Results: The photochemical analysis confirmed the presence of flavonoids, tannin, alkaloid, terpenoides, aldehyde, ketones and vitamin C compounds, but no steroids, saponins and protein were detected. The results of MTT showed the least cell survival value of treated cancerous cell was obtained with n-hexane-derived extract extract using Soxhlet method. Furthermore, NBT results demonstrated that the n-hexane extract using Soxhlet method exhibited peroxidant characteristics and droves the cancerous cells toward apoptosis. On the other hand, TBA results showed that the highest cytotoxicity belonged to n-hexane extract by Soxhlet and ethanolic extract by maceration method respectively. The highest catalase enzyme activity was observed in treatment by maceration ethanolic extract.

Conclusion: The existence of several compounds with pro-apoptotic properties in the extracts of spongy tissues of pomegranate propose the notion that using the compounds of these extracts alone or in combination with chemotherapy may be beneficial in treatment of colon cancer.

Keywords: Antioxidant, Pomegranate, Phytochemical, Colon Cancer.

►*Please cite this paper as:*
Kolahi M, Mokhtari B, Mirzaee N. A Phytochemical Study and Comparison of the Effect of Pomegranate Extracts Spongy Tissue on Colon Cancer Cells Caco-2. Jundishapur Sci Med J 2016;15(2):201-215.

Received: July 23, 2015 **Revised: Apr 4, 2016** **Accepted: Apr 18, 2016**