مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شاهرود

**DOI:** 10.22100/jkh.v18i1.2722

مقاله پژوهشی

# بررسی و مقایسه سمیت عصاره پوست و گل انار بر رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و گل انار

محمد طائب‌پور[۱]، محمد مجدی‌زاده[۲]، فاطمه صادقیان‌ندوشن[۳]، میلاد اخلاقی[۴]، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات[۵و۶*]

۱- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۲- کارشناسی ارشد زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست فناوری، شرکت ریز زیست فناوران فردانگر، پارک علم و فناوری یزد، یزد، ایران.
۳- مرکز تحقیقات فناوری نانو و مهندسی بافت، مؤسسه علوم باروری یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۴- کارشناس ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۵- استادیار، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.
۶- مرکز تحقیقات نانوتکنولوژی پزشکی و مهندسی بافت، پژوهشکده علوم تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران.

**تاریخ دریافت:** ۱۴۰۰/۰۶/۲۰، **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۸/۰۳

## چکیده

***مقدمه:*** *وجود ترکیبات فنولی و فلاوونوئیدی در عصاره بخش‌های مختلف انار، می‌تواند نوید بخش اثرات ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی برای این میوه نواحی گرمسیری باشد. بنابراین هدف از این پژوهش بررسی و مقایسه‌ی سمیت عصاره پوست و گل انار بر رده‌ی MCF-7 سرطان پستان و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و گل انار است.*

***مواد و روش‌ها:*** *در این مطالعه عصاره‌ی هیدورالکلی گل و پوست انار به روش سوسکسوله به‌صورت مجزا استخراج شد. سپس سلول‌های سرطانی MCF-7 کشت و تکثیر داده شد و سمیت سلولی هر دو عصاره در غلظت‌های مختلف به مدت ۴۸ ساعت براساس آزمون رنگ‌سنجی (MTT) سنجیده شد. همچنین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گل و پوست انار با استفاده از آزمون به دام‌اندازی رادیکال آزاد (DPPH) مقایسه گردید.*

***نتایج:*** *نتایج این پژوهش نشان داد که عصاره‌های هیدورالکلی گل و پوست انار در غلظت‌های مختلف به‌طور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) رشد سلول‌های سرطانی MCF-7 را نسبت‌به گروه کنترل کاهش داده و IC50 عصاره‌ی گل انار و پوست انار به‌ترتیب ۱۶/۴۷۱ µg/m و ۶/۱۸۶ µg/ml تعیین گردید. همچنین مشخص گردید که فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار نسبت‌به گل بیشتر می‌باشد. بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گل انار و پوست انار به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰µg/ml و ۵/۶۲µg/ml تعیین گردید.*

***نتیجه‌گیری:*** *با توجه به اینکه هر دو عصاره از ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری برخوردار می‌باشند، می‌توان عصاره انار را به‌منظور انجام تحقیقات ضدتوموری و آنتی‌اکسیدنی به پژوهشگران حوزه سرطان و صنایع غذایی پیشنهاد نمود.*

**واژه‌های کلیدی:** انار، ضدتومور، عصاره، آنتی‌اکسیدان، سرطان پستان.

***نویسنده مسئول:** یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، گروه علوم و فنون نوین پزشکی، کدپستی: ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰ **تلفن:** ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، **نمابر:** ۸۹۱۵۱۷۳۱۶۰ **Email:** Fhaghirosadat@gmail.com

**ارجاع:** طائب‌پور محمد، مجدی‌زاده محمد، صادقیان‌ندوشن فاطمه، اخلاقی میلاد، حقیرالسادات بی‌بی فاطمه. بررسی و مقایسه سمیت عصاره پوست و گل انار بر رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان و مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و گل انار. مجله دانش و تندرستی در علوم پایه پزشکی ۱۴۰۲؛۱۸(۱):۱۶-۹.

## مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین نوع سرطان جهان در زنان است (۱) به گونه‌ای که آمارهای آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان در سال ۲۰۲۰ نشان می‌دهد که، ۱۹/۱ میلیون مورد جدید سرطان و حدود ۱۰ میلیون مرگ ناشی از سرطان ثبت شده است که در این بین سرطان پستان ۱۱/۷٪ از موارد جدید ابتلا به سرطان را به خود اختصاص داده است (۲). پیش‌بینی شده که این میزان شیوع سرطان پستان تا سال ۲۰۵۰ به ۲/۳ میلیون نفر در سال افزایش یابد که این موضوع دلیلی بر ضرورت اقدامات پیش‌گیرانه و درمانی در راستای کاهش آمار سرطان می‌باشد (۱). مطالعات انجام شده در ایران مشخص نموده است که میزان مرگ و میر سرطان پستان به ۴/۳۳ در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر افزایش‌یافته است (۳). همچنین آمارها نشان می‌دهد که میانگین سن ابتلا به سرطان پستان در میان زنان ایرانی بین ۴۸ تا ۴۹ سال می‌باشد (۴). امروزه به‌منظور درمان سرطان پستان از روش‌های متنوعی نظیر جراحی، ایمنوتراپی، رادیوتراپی و شیمی در مانی استفاده می‌شود، که هر کدام از آنها ضمن برخورداری از عوارض جانبی فراوان، کیفیت زندگی افراد تحت درمان را کاهش می‌دهد. به‌عنوان نمونه در فرآیند شیمی درمانی سرطان پستان، معمولاً از داروهایی نظیر سیس پلاتین، پاکلی تاکسل و جیم سیتابین استفاده می‌شود که به علت غیرهدفمند بودن این روش درمانی، عورض جانبی متعددی نظیر سرکوب میلیوئیدی، سمیت عصبی، کم خونی، سمیت قلبی و غیره را همراه است (۵). گیاهان و ترکیبات حاصل از آنها از گذشته‌ای بسیار دور، مورد توجه قرار گرفته است و انسان در ابتدای پیدایش خود به این نتیجه رسیده است که می‌تواند از این منابع ارزشمند طبیعی جهت درمان بیماری‌های خود استفاده نماید. امروزه نیز با پیشرفت‌های جدید صورت گرفته، مشخص شده است که گیاهان حاوی ترکیباتی مفیدی بوده که می‌تواند انسان را در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان یاری رساند (۶). در حقیقت گیاهان متابولیسم‌های ثانویه‌ای دارند که دارای فعالیت ضدسرطانی و ضدتوموری است به‌طوری که می‌توان این فاکتورها را به‌عنوان جایگزینی برای داروهای درمانی با عوارض جانبی در روند درمان سرطان در نظر گرفت (۷ و ۸). انار با نام علمی Punica granatum یکی از قدیمی‌ترین میوه‌های خوراکی است که در مناطق مختلف گرمسیری و نیمه گرمسیری می‌روید و بخش‌های مختلف انار شامل پوست، دانه، گل و آب آن دارای ترکیبات با ارزشی با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضد التهابی و ضدسرطانی هستند. مطالعات شیمیایی نشان می‌دهد که در انار انواع ترکیبات فنلی و تانی شامل الاژیک اسید، گالیک اسید، پونیکاالژین، 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 وجود دارد که به‌نظر می‌رسد ترکیبات پلی‌فنلیک انـار، دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهـابی است و از رشد سلول‌های سرطانی ممانعت می‌نماید. همچنین عصاره‌ی میوه‌ی انار توانایی مهار سیکلین کینازها را دارد که منجر به مهار رشد سلول سرطانی و به دنبال آن آپوپتوز سلول‌های سرطانی انسانی می‌شود که با تغییر سطح Bax و Bcl-2 با آپوپتوز سلول سرطانی همراه است (۱۳-۹).

در همین راستا با توجه به عوارض جانبی بالای داروهای رایج سرطان درمانی و از سوی دیگر وجود ترکیبات سیتوتوکسیک بالا با عوارض جانبی پایین در ترکیبات حاصل از گیاهان و لزوم انجام پژوهش‌ها در زمینه‌ی ارایه داروهای ضدسرطان با کمترین عوارض جانبی، هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه‌ی اثرات ضد سرطانی عصاره‌های هیدروالکلی گل انار و پوست انار بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7 سرطان پستان است و بررسی و مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی هر کدام از این عصاره‌ها می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر نوعی مطالعه تجربی- آزمایشگاهی بوده که طی ۶ ماه در دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد به انجام رسیده است.

محیط کشت DMEM، محلول MTT، شناساگر DPHH و ماده DMSO متعلق به شرکت سیگما آلدریچ آمریکا، رده سلولی MCF-7 سرطان پستان از بانک سلولی انستیتوپاستور ایران تهیه و خریداری شد.

قبل از انجام عصاره‌گیری، گل انار (مخلوطی از گل زایا و نازا) در فصل بهار و پوست آن در فصل پاییز در فاصله‌ی زمانی مشخص جمع‌آوری و توسط محققان گیاهی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی یزد شناسایی و تأیید گردید. سپس، پوست میوه و گل انار در شرایط مناسب و به دور از نور خورشید خشک شده و سپس به روش سوکسوله، عمل عصاره‌گیری از آن انجام گرفت. برای این منظور، ۴۰ گرم از پودر پوست انار و ۴۰ گرم گل انار خشک شده به‌صورت جداگانه داخل کارتوش فشرده و درون محفظه‌ی سوکسوله قرار داده شد. در مرحله بعد ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد را به داخل یک بالن ته گرد انتقال داده و سوکسوله را به آن متصل نموده و با نصب کندانسور، ورودی آب و خروجی آب، عصاره‌گیری آغاز گردید. بعد از گذشت دو ساعت، عصاره‌ی جمع‌آوری شده به‌منظور تبخیر فاز

مایع در دمای اتاق قرارگرفت. در پایان با تبخیر فاز مایع، عصاره‌ی موردنظر برای استفاده‌های بعدی جمع‌آوری شد (۱۴).

این مطالعه در محیط in vitro و بر روی سلول سرطانی MCF-7 انجام گرفته است. رده‌ی سلولی MCF-7 از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید و در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS و L-گلوتامین به همراه آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین-استرپتومایسین در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ کربن دی اکسید، کشت و تکثیر داده شد (۵).

اثر ضدتوموری عصاره گل انار و عصاره پوست انار با استفاده از روش ارزیابی کمی پرولیفراسیون MTT مورد سنجش قرار گرفته و درصد IC50 محاسبه گردید. در این روش ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای افزوده شد، به‌طوری‌که در هر چاهک تعداد ۱۰۰۰۰ سلول موجود باشد. سپس سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C و ۵ درصد کربن دی‌اکسید و رطوبت ۹۲ درصد انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، محیط کشت چاهک‌ها جمع‌آوری و دور ریخته شد. سپس غلظت‌های مختلف از عصاره شامل ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه و به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شد. برای ساخت غلظت‌های مختلف عصاره ابتدا ۰/۰۰۴ گرم عصاره‌ی خشک گل و عصاره پوست انار را وزن کرده و با محیط کشت استریل به حجم ۲ میلی‌لیتر رسانده تا غلظت ۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایجاد شود. سپس از سوسپانسیون حاصله مقدار ۱ ml برداشته و با ۱ ml محیط کشت به حجم ۲ رسانده تا غلظت به نصف کاهش یابد و به همین صورت باقیمانده‌ی غلظت‌ها رقت‌سازی شد. پس از طی شدن زمان انکوباسیون مقدار ۲۰ µl رنگ MTT آماده شده، به هرچاهک افزوده و به مدت ۳ تا ۴ ساعت دیگر انکوبه شد (در این مدت برای جلوگیری از نور، پلیت‌ها با فویل پوشانده شدند). سپس محلول رویی از هر چاهک حذف و مقدار DMSO۱۰۰µl (دی متیل سولفواکسید، فلوکا-آمان) به هر چاهک افزوده شد. بلورهای فورمازان توسط سوسپانسیون به‌طور کامل حل شده و سرانجام جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ nm توسط دستگاه پلیت ریدرخوانش شد. همچنین میزان IC50 پس از رسم منحنی با به‌کارگیری غلظت‌های عصاره و درصد سلول‌های زنده محاسبه گردید (۱۵).

$$\frac{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت}-\text{میانگین جذب نوری در گروه آزمون}}{\text{میانگین جذب نوری در محیط کشت}-\text{میانگین جذب نوری در گروه کنترل}}\times ۱۰۰$$

رابطه (۱)

توانایی دادن اتم هیدورژن یا الکترون توسط ترکیبات و عصاره‌های مختلف در این آزمون با میزان بی رنگ کردن محلول در متانول مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این روش از DPPH (بنفش ۲-۲- دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل) که یک ترکیب رادیکالی پایدار است به‌عنوان معرف استفاده شد. ابتدا ۰/۰۰۱ گرم عصاره‌ی خشک گل انار و پوست انار را به‌صورت جداگانه در یک میلی‌لیتر آب استریل حل کرده تا غلظت مشخص ۱mg/ml حاصل شود. از غلظت به‌دست آمده رقت‌سازی کرده و سپس ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره در ۲۰۰ میکرولیتر معرف ۰/۰۰۴ درصد DPPH در پلیت ۹۶ خانه‌ای حل شد. پلیت در دمای اتاق در محیط تاریک به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد و سپس با دستگاه پلیت ریدر جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر خوانش شد و میزان درصد مهار رادیکال آزاد با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید.

رابطه ۲

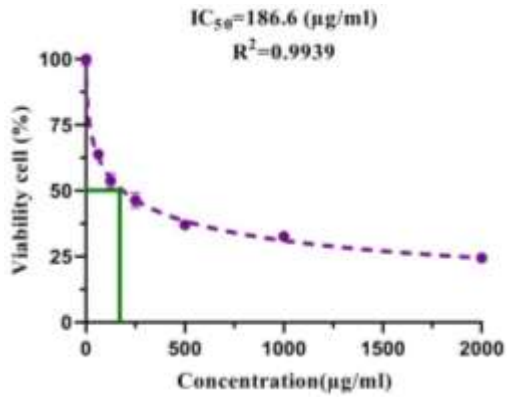
درصد مهار رادیکال آزاد =(جذب نمونه-جذب کنترل)/(جذب کنترل)*۱۰۰

در پژوهش حاضر به‌منظور تفسیر داده‌های عددی حاصل از آزمون‌ها، انحراف معیار و انحراف از میانگین داده‌های هریک از آزمون‌ها در محیط نرم‌افزار Excel محاسبه و نمودارهای مرتبط سمیت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در محیط Graph Pad رسم گردید. همچنین معناداری داده‌ها با استفاده Anova two-way محاسبه شد.

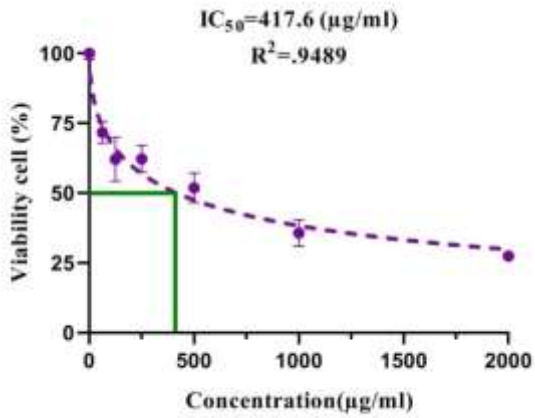
## نتایج

بررسی سمیت سلولی عصاره‌ی هیدورالکلی گل نار و پوست انار بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF7

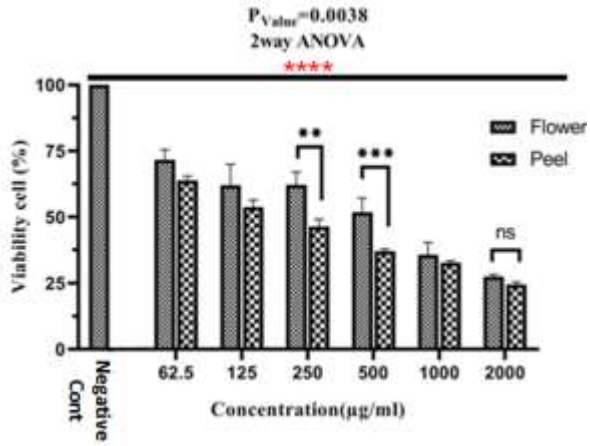
به‌طور کلی بر پایه‌ی آزمون ۴۸ ساعته‌ی MTT بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7 هر دو عصاره‌ی گل انار و پوست انار در توقف رشد سلول‌های سرطانی در غلظت‌های مختلف مؤثر بودند و نسبت‌به کنترل منفی (سلول‌های سرطانی در محیط کشت فاقد عصاره) اختلاف معناداری ($P<۰/۰۵$) را نشان دادند. نتایج این آزمون نشان داد که با افزایش غلظت هر دو عصاره، درصد زنده مانی سلول‌های سرطانی کاهش‌یافته به‌طوری که طبق محاسبات میزان IC50 عصاره گل انار ۰/۱۷±۴۱۷/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. از طرفی IC50 عصاره‌ی پوست انار ۱/۰۸±۱۸۶/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. همچنین مقایسه‌ی درصد زنده‌مانی عصاره‌ی گل انار و عصاره‌ی پوست انار بر پایه‌ی روش آماری آنوای دوطرفه (tow way Anova) انجام شد که نتایج حاصل از آن اختلاف معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) را بین عصاره‌ی هیدروالکلی گل انار و پوست انار در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی بر روی سلول‌های سرطانی MCF-7 گزارش داد که نشان‌دهنده‌ی بیشتر بودن سمیت سلولی عصاره‌های هیدروالکلی پوست انار نسبت‌به گل در این غلظت‌ها است. اما در سایر غلظت‌ها اختلاف معناداری مشاهده نشد.




**نمودار ۱–IC50 عصاره‌ی پوست انار بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7**

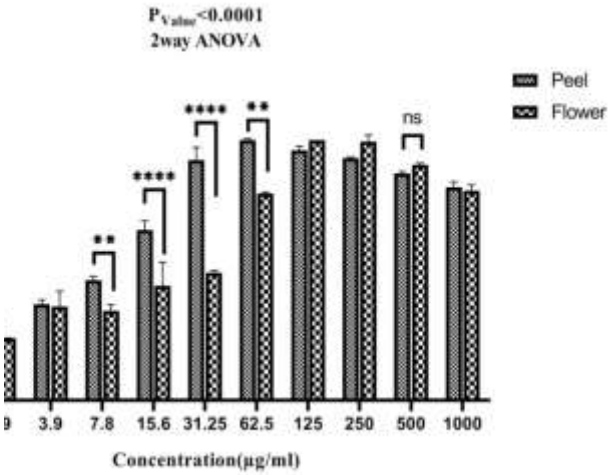



**نمودار ۱ – IC50 عصاره گل انار بر روی رده‌ی سلول سرطانی MCF-7**




**نمودار ۳– درصد زنده مانی رده سلولی MCF-7 در مواجه با عصاره‌ی گل انار و پوست انار در مدت زمان ۴۸ ساعت با بررسی معنادار بودن سمیت سلولی در غلظت‌های مختلف براساس آزمون tow way-anova محاسبه و بر اساس معیار آماری P**
**(**P<۰/۰۵، ***P<۰/۰۰۰۱، عدم اختلاف معنادار=ns)**

غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی گل انار و عصاره هیدروالکلی پوست انار به‌طور معنی‌داری (P<۰/۰۵) بر مهار رادیکال آزاد DPPH تأثیر داشت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست انار به نسبت در تمام غلظت‌ها از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گل انار بیشتر بود ولی شباهت معنی‌داری در شیب خط فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر دو عصاره قابل توجه بود. بر پایه‌ی تحلیل آماری two way Anova بیشترین میزن فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گل انار و پوست انار به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۵۰ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش بوده و اختلاف معناداری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گل انار و پوست انار در غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵ و ۶۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. از طرفی اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی این دو عصاره در غلظت‌های ۰/۹۷ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد.




**نمودار ٤– مقایسه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی گل انار و پوست انار با بررسی معنادار بودن در غلظت‌های مختلف براساس آزمون tow way-anova محاسبه و بر اساس معیار آماری P**
**(**P<۰/۰۵، ***P<۰/۰۰۰۱، عدم اختلاف معنادار=ns)**

## بحث

مشکلات ناشی از عوارض درمان‌های رایج سرطان باعث نگاه ویژه پژوهشگران به ترکیبات حاصل از گیاهان جهت تولید داروهایی با پایه گیاهی و عوارض جانبی کمتر شده است. در پژوهش حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی و سمیت عصاره هیدروالکلی پوست و گل انار بر رده‌ی سلولی MCF-7 سرطان پستان ارزیابی و مقایسه گردید که نتایج حاصل از آن نشان داد که هر دو عصاره در تمامی غلظت‌ها دارای اثرات ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند، که با افزایش غلظت عصاره، این اثرات افزایش می‌یابد. به‌نظر می‌رسد که خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و گل انار مرتبط به ترکیبات پلی‌فنلی

موجود در این عصاره‌ها می‌باشد، زیرا رامادان در سال ۲۰۱۹، میرجلیلی در سال ۲۰۱۵ و الفله و همکاران در سال ۲۰۱۲ با بررسی عصاره پوست و گل انار نشان دادند که این عصاره‌ها دارای ترکیبات پلی‌فنلی گسترده‌ای از جمله گالیک اسید و الاژیک اسید می‌باشند (۱۱ و ۱۵ و ۱۶). در واقع ترکیبات پلی‌فنلی با انتقال هیدروژن موجود در ساختار گروهای هیدروکسیل خود به رادیکال‌های آزاد، از فعالیت اکسیدانی این ترکیبات واکنش‌پذیر جلوگیری نموده و بدین صورت خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را اعمال می‌کنند (۱۷).

خاصیت ضدتوموری عصاره گل و پوست انار بیشتر به حضور ترکیباتی نظیر پانیکلاژین، گالیک اسید و الاژیک اسید در این عصاره‌ها بر می‌گردد (۲۰–۱۸). زیرا این ترکیبات جزو فنل‌ها بوده و ترکیبات فنلی با راه‌اندازی مسیرهای مرتبط با افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطانی از جمله افزایش بیان پروتئین‌هایی نظیر ستوکروم C، P53، کاسپاز ۳ و ۱ و ۹ و جلوگیری از فسفرلاسیون پروتئین AKT همراه با کاهش بیان BCl2 منجر به افزایش آپوپتوز در سلول‌های سرطانی از جمله سرطان پستان می‌شوند (۲۶–۲۱). همچنین مشخص شده که عصاره انار با توقف چرخه سلولی سلول‌های سرطانی از تکثیر آنها جلوگیری می‌کند (۱۳). از سوی دیگر، با توجه به نقش گسترده هورمون استروژن بر ایجاد و تکثیر سلول‌های سرطانی پستان، عصاره انار با کاهش بیان ژن‌های مرتبط با آنزیم اورماتاز که آنزیمی مؤثر در فرآیند تولید استروژن است، می‌تواند بر روند تکثیر سلول‌های سرطانی پستان اثر کاهشی داشته باشد(۱۳ و ۲۶). پژوهش‌های دیگر نشان داده‌اند که فلاوونوئیدهای استروژنی موجود در عصاره انار از جمله کوئرستین، با اتصال به گیرنده‌های استروژنی موجود در ساختار سلول‌های سرطانی پستان، می‌توانند سلول‌های سرطانی وابسته به استروژن را مهار نمایند (۲۷). از دیگر نتایج پژوهش حاضر، بیشتر بودن میزان خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری عصاره پوست انار در مقایسه با عصاره هیدرو الکلی گل انار می‌باشد، که این نتایج با توجه به اینکه میزان ترکیبات ضد توموری و آنتی‌اکسیدانی در عصاره پوست انار در مقایسه با عصاره گل انار بیشتر است، قابل توجیه می‌باشد. این در حالی است که الفله و همکاران در سال ۲۰۱۲، طی پژوهشی، گزارش نموده‌اند که میزان ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی عصاره حاصل از پوست انار در مقایسه با عصاره گل انار، بیشتر می‌باشد، که تأییدی بر نتایج پژوهش حاضر است (۱۶).

در این میان باید یادآور شد که میزان فعالیت زیستی عصاره‌های استخراج شده از بخش‌های مختلف انار، وابسته به نوع و درصد ترکیبات زیستی فعال عصاره است که این ویژگی نیز تابع عوامل متعددی از جمله نوع رقم انار، زمان بلوغ گیاه، شرایط اقلیمی رشد گیاه، نوع خاک و غیره است. بنابراین عصاره پوست و گل استخراج شده از انار می‌تواند با توجه به مواردی که در بالا به آن اشاره شد، در پژوهش‌های مختلف مقداری نتایج متفاوتی داشته به‌دنبال داشته باشد (۲۸).

تاکنون پژوهش‌های متعددی مرتبط با اثرات ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی عصاره بخش‌های مختلف انار به انجام رسیده است که به بخشی از آنها در زیر اشاره می‌شود.

مصطفی و همکاران درسال ۲۰۱۲ اثر عصاره‌ی پوست انار را بر روی سرطان کولون ناشی از آزوکسی متان بررسی کرده که نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی پوست انار تا حدودی می‌تواند از ضایعات سرطانی روده‌ی بزرگ از طریق توقف استرس اکسیداتیو جلوگیری کند(۲۹). اسما و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵، گزارش نمودند که عصاره انار به‌صورت وابسته‌به دوز اثر مهاری بر رده‌ی سلولی K562 سرطان میلوئیدی حاد خون دارد (۲۱). همچنین ثروت‌خواه و همکاران در سال ۲۰۱۵، به بررسی تأثیر روغن دانه انار بر تکثیر رده‌های سلولی MCF-7 و MDA-MB468 سرطان پستان انسان پرداختند و گزارش نمودند که عصاره دانه انار اثر سایتوتوکسیسیتی بر روی رده‌های سلولی سرطان پستان انسان دارد و در زمان‌های مختلف با غلظت‌های مختلف از تکثیر سلول‌های سرطانی پستان جلوگیری می‌کند (۳۰). گزارش این پژوهش‌ها همانند پژوهش حاضر تأییدی بر خواص ضدتوموری عصاره بخش‌های مختلف انار است.

بریزی و همکاران در سال ۲۰۱۶ طی پژوهش خود گزارش نمودند که عصاره متانولی پوست انار، واریته رباب، دارای مقادیر بالایی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است که خواص آنتی‌اکسیدانی این عصاره وابسته به غلظت می‌باشد. همچنین گزارش نمودند که ضریب همبستگی میان ویژگی‌های ضدرادیکالی و خاصیت احیاکنندگی این عصاره ۸۹ درصد است (۳۱). طادی بنی و همکاران در سال ۲۰۱۸، به بررسی میزان فنول و خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست، دانه و آب انار پرداختند و گزارش نمودند که میزان خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست و دانه انار در مقایسه با عصاره آب انار بیشتر است (۳۲). همچنین خاکزاد و همکاران در سل ۲۰۱۹، به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره پوست چرمی و سفنجی انار پرداختند و گزارش نمودند که عصاره پوست انار دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است (۳۳). گزارش بریزی و همکاران، گزارش طادی بنی و همکاران و گزارش خاکزاد از منظر خواص آنتی‌اکسیدانی مشابه نتیجه پژوهش حاضر است. حسینی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۹، طی پژوهش خود گزارش نمودند که خوص آنتی‌اکسیدانی آب انار رقم پوست سیاه با افزایش میزان ترکیبات پلی‌فنلی افزایش می‌یابد (۳۴).

عثمانی و همکاران در سال ۲۰۲۰ نشان دادند که عصاره پوست انار و کوئرسیتین دارای هم‌افزایی و ضدتکثیر و ضدمتاستازی با القای آپوپتوز در سلول‌های ریه از نوع کوچک دارد (۱۸). زمانی عصمتی و همکاران در سال ۲۰۲۰، اثر عصاره پوست انار را بر بیان ژن تحریک‌کننده رگ‌زایی (VEGF) در سلول‌های رده A2780 از سرطان تخمدان سنجیده و گزارش نمودند که عصاره پوست انار به واسطه دارا بودن ترکیبات متعدد و خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌تواند با کاهش بیان عامل رگزایی، سبب کاهش متاستاز و تظاهرات بدخیمی شود(۳۵). همچنین مهربانی و همکاران در سال ۲۰۲۰، سمیت عصاره اتانولی گل نر انار را بر گروهی از رده‌های سلولی از جمله HT29 سرطان کلورکتال و MCF-7 سرطان پستان، با روش‌های مختلفی از جمله MTT سنجیده و گزارش نمودند که عصاره اتانولی گل نر انار به‌صورت وابسته به غلظت در تمامی غلظت‌ها زنده مانی سلول‌های سرطانی از جمله MCF-7 را کاهش می‌دهد و IC50 آن ۲۸/۱±۳۴۸/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. همچنین این پژوهش نشان می‌دهد که عصاره اتانولی گل نر انار از خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی برخوردار است. نتیجه پژوهش مهربانی و همکاران نزدیک به نتایج پژوهش حاضر است (۳۶).

عوارض جانبی، کاهش کیفیت زندگی مبتلایان به سرطان پستان در طول دوره درمان، پرهزینه بودن درمان‌های معمول سرطان و حتی با شکست روبرو شدن برخی از درمان‌های رایج، توجه متخصصین حوزه سرطان را به سمت درمان‌های کم عارضه و مقرون به صرفه جلب نموده است. بنابراین با توجه به نتایج پژوهش حاضر که نشان‌دهنده‌ی پتانسیل بالای عصاره‌های یاد شده در توقف رشد سلول‌های سرطانی پستان است، می‌توان استفاده از این عصاره‌ها و یا ترکیبات شیمیایی موجود در آن را جهت تحقیقات بیشتر در زمینه مبارزه با سرطان به متخصصین این حوزه پیشنهاد نمود. با همه‌ی مزایایی که برای نتایج پژوهش بیان شد، باید عنوان نمود که پژوهش حاضر مانند بسیاری از پژوهش‌ها، دارای کاستی‌ها و نواقصی است. عدم محاسبه IC50 برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر یک از عصاره‌ها و عدم بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در هریک از عصاره‌ها از جمله کاستی‌های پژوهش حاضر است، بنابراین انجام و برطرف نمودن این کاستی‌ها به پژوهشگران بعدی در این حوزه پیشنهاد می‌شود.

## تشکر و قدردانی

که طرح پژوهش حاضر توسط مرکز ناباروری و سلول‌های بنیادی یزد تحت نظر دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد با شناسه‌ی اخلاق IR.SSU.RSI.REC.1398.038 تأیید گردیده است. همچنین بدین‌وسیله از تمامی کسانی که ما را در انجام بهتر این پژوهش یاری رسانده‌اند، سپاسگزاری می‌شود.

## References

1. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast cancer: epidemiology and etiology. Cell Biochemistry and Biophysics 2015;72:333-8. doi: 10.1007/s12013-014-0459-6
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin 2018;68:394-424. doi: 10.3322/caac.21492
3. Salehiniya H, Haghighat S, Parsaeian M, Majdzadeh R, Mansournia M, Nedjat S. Iranian breast cancer risk assessment study (IRBCRAS): a case control study protocol. WCRJ 2018;5:1-5. doi: 10.32113/wcrj_20183_1016
4. Nafissi N, Khayamzadeh M, Zeinali Z, Pazooki D, Hosseini M, Akbari ME. Epidemiology and histopathology of breast cancer in Iran versus other Middle Eastern countries. Middle East Journal of Cancer 2018;9:243-51. doi: 10.30476/mejc.2018.42130
5. Taebpour M, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF. Fabrication and characterization of liposomal nanoparticles containing hydroalcoholic extract of Artemisia absintium and its toxicity on MCF-7 breast cancer cell line. Iranian Quarterly Journal of Breast Disease 2021;14:64-77.[Persian]. doi: 10.30699/ijbd.14.1.64
6. Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Movahedpour AA, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghiralsadat BF. A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil. SSU_Journals 2018;25:853-64.[Persian].
7. Greenwell M, Rahman PK. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 2015;6:4103. doi: 10.13040%2FIJPSR.0975-8232.6(10).4103-12
8. Rao PV, Nallappan D, Madhavi K, Rahman S, Jun Wei L, Gan SH. Phytochemicals and biogenic metallic nanoparticles as anticancer agents. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2016;2016:1-15. doi: 10.1155/2016/3685671
9. Malik A, Mukhtar H. Prostate cancer prevention through pomegranate fruit. Cell cycle (Georgetown, Tex.) 2006;5:371-3. doi: 10.4161/cc.5.4.2486
10. Song B, Li J, Li J. Pomegranate peel extract polyphenols induced apoptosis in human hepatoma cells by mitochondrial pathway. Food and Chemical Toxicology 2016;93:158-66. doi: 10.1016/j.fct.2016.04.020
11. Mirjalili A. A review on biochemical constituents and medicinal properties of pomegranate (Punica granatum L.). J Med Plants 2015;14:1-22.[Persian].
12. Sharifiyan F, Mirjalili S A, Fazilati M, Poorazizi E, Habibollahi S. Cytotoxic effect of hydro-alcoholic extract of pomegranate (Punica granatum L.) flowers and isolated ursolic acid on B16f10 melanoma cells. J Med Plants 2020;19:177-191. doi: 10.29252/jmp.19.74.177
13. Moga MA, Dimienescu OG, Bălan A, Dima L, Toma SI, Bîgiu NF, Blidaru A. Pharmacological and therapeutic properties of Punica granatum phytochemicals: Possible roles in breast cancer. Molecules 2021;26:1054. doi: 10.3390/molecules26041054
14. Taebpour M, Majdizadeh M, Haghiralsadat BF. Fabrication and evaluation of liposomal nanoparticles containing Silybum marianum extract and its toxicity on osteosarcoma cancer cell line (SAOS-2) and healthy fibroblast cell (HFF). Knowledge and Health in Basic Medical Sciences 2021:16:61-73.[Persian]. doi: 10.22100/jkh.v16i1.2483
15. El-Hadary AE, Ramadan MF. Phenolic profiles, antihyperglycemic, antihyperlipidemic, and antioxidant properties of pomegranate (Punica granatum) peel extract. Journal of Food Biochemistry 2019;43:e12803. doi: 10.1111/jfbc.12803
16. Elfalleh W, Hannachi H, Tlili N, Yahia Y, Nasri N, Ferchichi A. Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower. Journal of Medicinal Plants Research 2012;6:4724-30. doi: 10.5897/JMPR11.995

17. Foti MC. Antioxidant properties of phenols. J Pharm Pharmacol 2007;59:1673-85. doi: 10.1211/jpp.59.12.0010

18. Osmani S, Mohseni-Kouchesfahani H, Jalali H. Investigating the synergistic effect of pomegranate (Punica granatum L.) peel extract and quercetin on Calu-6 human lung carcinoma cells. KAUMS Journal (FEYZ) 2019;23:596-604.[Persian].

19. Sharma P, McClees SF, Afaq F. Pomegranate for prevention and treatment of cancer: An update. Molecules 2017;22:177. doi: 10.3390/molecules22010177

20. Dikmen M, Ozturk N, Ozturk Y. The antioxidant potency of Punica granatum L. Fruit peel reduces cell proliferation and induces apoptosis on breast cancer. Journal of Medicinal Food 2011;14:1638-46. doi: 10.1089/jmf.2011.0062

21. Asmaa MJ, Ali AJ, Farid JM, Azman S. Growth inhibitory effects of crude pomegranate peel extract on chronic myeloid leukemia, K562 cells. International Journal of Applied and Basic Medical Research 2015;5:100-105. doi: 10.4103%2F2229-516X.157154

22. Manasathien J, Indrapichate K. Apoptosis of MCF-7 cancer cell induced by pomegranate(Punica granatum L.) peel extract.Suranaree Journal of Science & Technology 2017;24:63-74. doi: 10.13140/RG.2.2.36748.74881

23. Song B, Li J, Li J. Pomegranate peel extract polyphenols induced apoptosis in human hepatoma cells by mitochondrial pathway. Food and Chemical Toxicology 2016;93:158-66. doi: 10.1016/j.fct.2016.04.020

24. Faria A, Calhau C. The bioactivity of pomegranate: impact on health and disease. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 2011;51:626-34. doi: 10.1080/10408391003748100

25. Gulati N, Laudet B, Zohrabian VM, Murali RA, Jhanwar-Uniyal ME. The antiproliferative effect of Quercetin in cancer cells is mediated via inhibition of the PI3K-Akt/PKB pathway. Anticancer Research 2006;26:1177-81.

26. Mirjalili A. A study on the mode of action of anticancer bioactive compounds occurring in pomegranate. Complementary Medicine Journal 2016;6:1600-23.[Persian].

27. Shaygannia E, Bahmani M, Zamanzad B, Rafieian-Kopaei M. A review study on Punica granatum L. Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine 2016;21:221-7. doi: 10.1177%2F2156587215598039

28. Bassiri-Jahromi S, Doostkam A. Comparative evaluation of bioactive compounds of various cultivars of pomegranate (Punica granatum) in different world regions. AIMS Agriculture and Food 2019;4:41-55. doi: 10.3934/agrfood.2019.1.41

29. Waly MI, Ali A, Guizani N, Al-Rawahi AS, Farooq SA, Rahman MS. Pomegranate (Punica granatum) peel extract efficacy as a dietary antioxidant against azoxymethane-induced colon cancer in rat. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2012;13:4051-5. doi: 10.7314/APJCP.2012.13.8.4051

30. Servatkhah M, Mahmoudi R, Kamali A, Tajale M, Jafari-barmak M, Nikseresht M. The Effect of Pomegranate Seed Oil on the Proliferation of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB468. Armaghane Danesh 2015;19:930-937.[Persian].

31. Beriz E, Shekarforoush SS, Hosseinzadeh S. Investigation of the antioxidant properties of metanolic peel extract of pomegranate (Punica granatum var. Rabbab). Food Hygiene 2016;6:13-21.[Persian].

32. Tadi Beni M, Ansari F, Heydari A, Khalili Sadrabad E. Determination of antioxidant activity and phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peel, seed and juice. Journal of Babol University of Medical Sciences 2018; 20 (S1-2018).[Persian].

33. Khakzad S, Farahmandfar R, Ahmadpour A. Study on antioxidant properties of leathery and spongy peels of pomegranate (Punica granatum L.). Journal of Food Science and Technology 2019;15:103-111.

34. Hoseini S, Rashidi L, Homapour M. Investigation of Polyphenolic Compounds and Antioxidant Properties of black peel Pomegranate Juice cultivar (Punica granatum) in Saveh. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology 2019;14:99-108.[Persian]

35. Zamani Esmati F, Nikoonahad Lotfabadi N, Haghiralssadat BF. Effect of Pomegranate peel extract on expression of angiogenesis stimulating gene (VEGF) in A2780 cell line of ovarian cancer. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2020;22:68-74.[Persian].

36. Mehrabani M, Raeiszadeh M, Najafipour H, Esmaeli Tarzi M, Amirkhosravi A, Poustforoosh A, Mohammadi MA, Naghdi S, Mehrabani M. Evaluation of the Cytotoxicity, Antibacterial, Antioxidant, and Anti-inflammatory Effects of Different Extracts of Punica granatum var. pleniflora. Journal of Kerman University of Medical Sciences 2020;27:414-25. doi: 10.22062/jkmu.2020.91474

Journal of Knowledge & Health
in Basic Medical Sciences 2023; Vol 18, No 1

DOI: 10.22100/jkh.v18i1.2722

Original Article

# Evaluation and Comparison of Punica Granatum Peel and Flower Extract Toxicity on MCF-7 Breast Cancer Cell Line and Comparison of Antioxidant Activity of Punica Granatum Peel and Flower Extract

**Mohammad Taebpour (M.Sc.)[1], Mohammad Majdizadeh (M.Sc.)[2], Fatemeh Sadeghian Nodoushan ()[3], Milad Akhlaghi (M.Sc.)[4], Bibi Fatemeh Haghiralsadat (Ph.D.)[5,6*]**

1- Dept. of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
2- Nano-Biotech Foresight Company Biotechnology Campus, Science & Technology Park of Yazd, Yazd, Iran.
3- Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
4- Dept. of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
5- Medical Nanotechnology & Tissue Engineering Research Center, Yazd Reproductive Sciences Institute, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
6- Dept. of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

**Received:** 11 September 2021, **Accepted:** 25 October 2021

## Abstract:

***Introduction:*** *The presence of phenolic and flavonoid compounds in the extract of different parts of pomegranate fruit (Punica granatum) makes this tropical fruit potentially an antitumor and antioxidant. Therefore, this study aimed to investigate the toxicity effect of pomegranate peel and flower extract on MCF-7 breast cancer and to compare the antioxidant activity of pomegranate peel and flower extract.*

***Methods:*** *The hydroalcoholic extract of pomegranate flowers and peel was extracted separately by the Soxhlet method. Then, MCF-7 cancer cells were cultured and proliferated, and the cytotoxicity of both extracts at different concentrations was measured by MTT assay for 48 hours. Furthermore, the antioxidant activity of pomegranate flower and peel extract was compared by using a free radical scavenging assay (DPPH).*

***Results:*** *The results indicated that hydroalcoholic extracts of pomegranate flowers and peel significantly reduced the growth of MCF-7 cancer cells compared to the control group ($P<0.05$). IC50s of pomegranate flower and pomegranate peel extract were determined 417.6 □g/ml and 186.6 □g/ml, respectively. Besides, the antioxidant activity of pomegranate peel extract was higher than that of flowers. The highest antioxidant activity of pomegranate flower extract and pomegranate peel was determined at concentrations of 250 □g/ml and 62.5 □g/ml, respectively.*

***Conclusion:*** *Based on our findings, extracts of pomegranate flowers and peel indicated antioxidant and anti-tumor properties.*

**Keywords:** Punica granatum, Anti-tumor, Extract, Antioxidant, Breast cancer.

Conflict of Interest: No

***Corresponding author:** B.F. Haghiralsadat, **Email**: Fhaghirosadat@gmail.com*

**Citation:** Taebpour M, Majdizadeh M, Sadeghian-Nodoushan F, Akhlghi M, Haghiralsadat BF. Evaluation and comparison of Punica granatum peel and flower extract toxicity on MCF-7 breast cancer cell line and comparison of antioxidant activity of Punica granatum peel and flower extract. Journal of Knowledge & Health in Basic Medical Sciences 2023;18(1):9-16.