

الله أكبر



دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران

معاونت بین الملل - دانشکده داروسازی

پایان نامه جهت اخذ درجه دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

بررسی اثرات سایتوتوکسیک عصاره تام و فراکشن های مختلف سرشاخه
های جوان گیاه بیلهر *Dorema aucheri* Boiss. و جداسازی و
شناسایی ترکیبات فراکشن موثر

اساتید راهنما:

خانم دکتر الهه متوسلی

خانم دکتر زهرا توفیقی

استاد مشاور:

دکتر محمدرضا شمس اردکانی

استاد همکار:

دکتر مهدیه افتخاری

نگارش:

فاطمه اسکو

سال تحصیلی:

دی ماه ۱۳۹۶

خلاصه فارسی

Dorema aucheri (Apiaceae) گونه‌ایست دارویی که از اولئوگم رزین مترشحه از این گیاه در طب سنتی ایران به عنوان مقوی، نیرودهنده، قاعده‌آور، خلط‌آور و در برونشیت‌های مزمن و تنگی نفس استفاده می‌شود. ضمناً از برگ‌های جوان این گیاه نیز به صورت خوراکی در پخت برخی غذاهای محلی و هم‌چنین در درمان عفونت‌های گوارشی انگلی و یبوست استفاده می‌شود.

هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک، آنتی‌اکسیدانی، یافتن فرکشن مؤثر سایتوتوکسیک و جداسازی ترکیبات آن و تعیین مقدار توتال فنول و فلاونوئید تام می‌باشد.

سرشاخه‌های جوان گیاه *Dorema aucheri* از تیره چتریان، از استان کهگیلویه و بویر احمد در اسفند ماه ۹۴ جمع‌آوری شد. سرشاخه‌های جوان و ترشی خشک شده گیاه جدا از هم آسیاب شده و به صورت پودر ریزی درآورده شد. عصاره‌گیری به روش پرکولاسیون و با حلال متانول ۸۰٪ صورت گرفت. سپس عصاره جمع‌آوری شده توسط دستگاه روتاری تغلیظ شد. عصاره تام گیاه با حلال‌های اتردوپترو، کلروفرم، اتیل استات و متانول فراکشنه شد. بررسی سمیت عمومی عصاره تام، ترشی و فراکشن‌ها از طریق آزمون لارو میگو (آزمون BST) و سمیت سلولی آنها بر روی رده‌های سلولی سرطان کولون (HT-29)، سینه (MDA-MB-231)، ریه (A549) و سرویکس (Hela) و سلول‌های نرمال فیبروبلاست با استفاده از روش MTT (3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) صورت پذیرفت. محتوای فنول تام عصاره تام و ترشی و فراکشن‌های اندام‌های هوایی با استفاده از روش Folin-Ciocalteu، اندازه‌گیری و فعالیت روبش و مهار رادیکال آزاد آن به روش DPPH تعیین شد. تعیین مقدار فلاونوئید عصاره تام و ترشی و فراکشن‌های اندام‌های هوایی به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از آلومینیوم کلرید و سدیم نیتريت اندازه‌گیری شد. ترکیبات فراکشن مؤثر سایتوتوکسیک با استفاده از روش‌های مختلف کروماتوگرافی جداسازی و خالص‌سازی و ساختمان مولکولی با روش‌های مختلف طیف‌سنجی شناسایی شد.

ترشی و عصاره تام با LC_{50} به ترتیب معادل $134/56 \pm 1/56 \mu\text{g/ml}$ و $134/86 \pm 3/25 \mu\text{g/ml}$

واجد بیشترین اثرات سمی بر روی میگوی آب شور بود. فراکشن کلروفرمی با IC_{50} معادل

MDA-MB-231 سلول با IC_{50} معادل $69/7 \pm 2/99 \mu g/ml$ بیشترین اثر کشندگی را روی سلول MDA-MB-231 و با IC_{50} معادل $155/68 \pm 5/5 \mu g/ml$ و $147/66 \pm 0/23 \mu g/ml$ اثر کشندگی بر سلول‌های HT29 و A549 داشته است. فراکشن اتردوپترولی با IC_{50} معادل $17/0 \pm 2/3 \mu g/ml$ بیشترین اثر کشندگی را روی سلول نرمال Fibroblast و با IC_{50} معادل $117/66 \pm 3/01 \mu g/ml$ اثر کشندگی روی سلول HeLa داشته است. فراکشن متانولی با $12/4 \pm 0/76 GAE/g$ حاوی بیشترین فنول تام، عصاره تام ترشی با $18/35 \pm 4/9 mg$ of catechin/g حاوی بیشترین مقدار فلاونوئید، و فراکشن اتیل استات و کلروفرمی با IC_{50} به ترتیب معادل $340/38 \mu g/ml$ و $398/21 \mu g/ml$ واجد بیشترین اثرات روبش رادیکال آزاد بودند. با استفاده از روش‌های مختلف کروماتوگرافی و طیف‌سنجی، ترکیب استیگماسترول از فراکشن اتردوپترولی گیاه جداسازی و شناسایی گردید.

از داده‌های به دست آمده از این مطالعه می‌توان این گونه نتیجه گرفت که ترکیباتی در گیاه *Dorema aucheri* وجود دارند که قادر هستند اثرات سمی بر سلول‌های سالم از خود نشان دهند. با وجود آنکه این گیاه به صورت ترشی بین مردم منطقه کهگیلویه و بویراحمد مصرف می‌شود بررسی‌های بیشتر روی ترکیبات، سمیت حاد و تحت مزمن گیاه و ترشی آن ضروری به نظر می‌رسد.

واژگان کلیدی: *Dorema aucheri*، سمیت سلولی، فلاونوئید تام، فنول تام، مهار رادیکال

آزاد، کروماتوگرافی

Abstract

Dorema aucheri Boiss.(Apiaceae) is a medicinal plant distributed in southwest of Iran, Young leaves of this plant are also used orally for cooking some local foods, as well as for the treatment of parasitic digestive infections and constipation.

The aim of the present study was to evaluation of their cytotoxic potentials, antioxidant, finding an effective fraction cytotoxic and investigate phytochemical constituents of the aerial parts of *D.aucheri* and determine the amount total phenols and flavonoids.

The aerial sprouts *D.aucheri* of Apiaceae, were collected from high level of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, southwest of Iran, on March 2015Iran. Dried powders of plant were macerated with 80% methanol at room temperature. The crude extracts were concentrated and fractionated with Petroleum ether, chloroform, Ethyl acetate and methanol, separately. The pickles of plant was dried and extracted with 80% methanol, too. The toxicity of the total extract, pickle extract and aerial sprouts branches fractions were screened in Brine shrimp lethality test (BSLT).Cytotoxic activity of the total extract, pickle extract and aerial sprouts branches fractions were evaluated on HT-29, MDA-MB-231, A549, Hela and normal Fibroblast cell lines by MTT assay method . Total phenolic contents (TPC) of the total extract, pickle extract and aerial sprouts branches fractions were measured in Folin-ciocalteu method and their antioxidant activity were determined using DPPH free radical-scavenging assay. Determination of flavonoid content of the all samples were measured in spectrophotometer method using $ALCL_3$ and $NaNO_2$. Effective fraction compounds were investigated using different methods chromatography and structures of isolated compounds were then elucidated using various spectroscopic methods.

The total extract and pickle extract were the most toxic sample in BLST with LC_{50} value of 134.86 ± 3.25 $\mu\text{g/ml}$ and 134.56 ± 1.56 $\mu\text{g/ml}$. The chloroform fraction in breast cancer, colorectal carcinoma and lung cancer was the most cytotoxicity with IC_{50} equal to 69.7 ± 2.99 $\mu\text{g/ml}$, 155.68 ± 5.5 $\mu\text{g/ml}$ and 147.66 ± 0.23 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The petroleum ether fraction in cervical cancer and normal fibroblast cell line was the most cytotoxicity with IC_{50} equal to 117.66 ± 3.01 $\mu\text{g/ml}$ and

17.00±2.3 µg/ml, respectively. As a result of phytochemical and biological assays, the methanolic fraction was found to possess the most total phenolic content with 12.4±0.76 µg/ml mg GAE/g, the pickle extract was found to possess the most flavonoid content 18.35±4.9 µg/ml mg Catechin/g, and The ethyl acetate fraction and chloroform fraction the most free radical-scavenging activity with IC₅₀ values of 340.38 µg/ml and 398.21 µg/ml , respectively. Using different methods of chromatography and spectroscopic, the compound stigmasterol was isolated from the petroleum ether fraction of the plant.

From the data obtained from this study, it can be concluded that the compounds in the plant exhibit toxic effects on healthy cells. Since the pickle of this plant was used among people of Kohgiluyeh and Boyer-Ahmad Province, more studies were proposed on investigation of cytotoxic compounds, evaluation of acute and sub chronic toxicity of plant and its pickle.

Keywords: *Dorema aucheri*, Cytotoxic, MTT assay, cancer cell lines, Apiaceae



Tehran University of Medical Sciences

Pardis International campus- School of Pharmacy

Title:

Cytotoxicity investigation of young aerial parts extract and fractions of *Dorema aucheri* Boiss. and elucidation of compounds from effective fraction

Supervisors:

Dr Elahe Motevaseli

Dr Zahra Tofghi

Author:

Fatemeh Oskou

January 2018