

Evaluation of Synergic Effect of Nano-Micelle Curcumin and Epicatechin on Apoptosis and Proliferation of HT29 Colorectal Cancer Cell Line

Seyed Mohammad Ali Razavi¹
 Mohammad Shokrzadeh²
 Shaghayegh Aghajanshakeri¹
 Ramin Ataee³

¹ Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
² Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Hemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
³ Associated Professor, Medicinal Plant Research Center, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received May 6, 2023; Accepted June 3, 2024)

Abstract

Background and purpose: Today, despite the abundance of chemical drugs, the use of medicinal plants is increasing; Curcumin (curcumin) is a yellow pigment obtained from the turmeric plant and is considered the effective ingredient of turmeric. This crystalline and crystallized product is widely used in Indian medicine. Recently, the beneficial effects of curcumin on stomach, colon, and mouth cancers have been proven in mice. Curcumin usually plays its role through pharmacological processes such as antioxidant, anti-inflammatory, antithrombotic, apoptotic, and hepatoprotective effects. Antioxidative, antiproliferative, and antiangiogenic properties of curcumin have been noticed in recent years. However, the low solubility of curcumin and its severe degradation have made it impossible to introduce it in clinical use. In recent years, studies and reviews have been conducted to prepare and design polymeric micelles (PMMCs) on a nanoscale to improve the cellular transport of curcumin. Green tea flavonoids, including epicatechin, have recently received attention. In vitro research, these compounds have been proposed as antioxidants by inhibiting lipid peroxidation, trapping free radicals, and chelating metal ions, and this property is mentioned due to their unique structure (therefore, the purpose of this study is to determine the effect The synergism of curcumin and epicatechin has been carried out in the investigation of apoptosis and cell proliferation of HT29 cell lines and apoptotic factors.

Materials and methods: This study is experimental. After obtaining HT29 cells from the Pasteur Institute cell bank and completing cell passage and proliferation, the cells were distributed in triplicate wells across 7 test groups and 2 control groups (positive and negative). In test groups 1, 2, and 3, three concentrations of curcumin nanomicelles (10, 20, 50 µg/ml) were incubated in triplicate. In groups 4, 5, and 6, three concentrations of epicatechin (10, 20, 50 µg/ml) were incubated for 24 hours. Test group 7 consisted of HT29 cells treated with the IC50 concentration of nanomicelle curcumin combined with the IC50 concentration of epicatechin. Group 8, the positive control, consisted of cells treated with 5FU (100 µg/ml), while group 9, the negative control, consisted of cells exposed only to the cell culture medium. After the 24-hour incubation period, an MTT assay was performed to assess cell proliferation, and Annexin flow cytometry was used to determine the level of apoptosis.

Results: In this study, epicatechin and curcumin have been able to decrease cell viability of colon cancer cells (HT29) and increase the percent of apoptotic cells $P < 0.05$, which was in a dose-dependent manner, also the combination of these two drugs caused a synergistic effect in high dose $P < 0.05$. Epicatechin in concentrations of 20, 10 µg/mL, 50, and 100 has a significant difference compared to the negative control group with $P < 0.05$, which has caused a decrease in cell viability in colon cancer cells with increasing dose. Curcumin is the group Nanomicelle with epicatechin at IC50 concentration compared to the positive control group of 5-FU in HT-29 cell line has greatly reduced cell viability of HT-29 cell line showed that curcumin and epicatechin nano micelles had a synergistic effect. The results of cell apoptosis have shown that curcumin and epicatechin nano micelle groups at IC50 concentrations had a synergistic effect.

Conclusion: epicatechin and curcumin have been able to increase the death rate of colon cancer cells (HT29) by increasing apoptosis, which indicates the anti-cancer effects of these compounds. So it can suggest these compounds in colon cancer therapeutics.

Keywords: colon cancer, epicatechin, nano-curcumin, apoptosis, proliferation, HT29 cell line

J Mazandaran Univ Med Sci 2024; 34 (235): 13-25 (Persian).

Corresponding Author: Ramin Ataee- Medicinal Plants Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran. (E-mail: raminataee1349@gmail.com)

بررسی اثر هم افزایی نانومیسل کورکومین و اپی کاتچین در آپوپتوز و پرولیفراسیون سلول‌های سرطان کولون رده سلولی HT29

سید محمد علی رضوی^۱

محمد شکرزاده^۲

شقایق آقاچان شاکری^۱

رامین عطایی^۳

چکیده

سابقه و هدف: امروزه به رغم فراوانی داروهای شیمیایی، استفاده از گیاهان دارویی در حال افزایش است. کورکومین (curcumin) رنگدانه زرد رنگی است که از گیاه زردچوبه به دست می‌آید و در واقع ماده موثر زردچوبه محسوب می‌شود. این فراورده کریستالی و متبلور در مصارف پزشکی هند کاربرد بسیاری دارد. اخیراً اثرات مفید کورکومین بر سرطان‌های معده، کولون و دهان در موش سوری به اثبات رسیده است. کورکومین نقش خود را معمولاً از طریق پروسه‌های فارماکولوژیکی از قبیل اثرات آنتی اکسیدانی، ضدالتهابی، آنتی ترومبوتیک، آپوپتوتیک و اثرات حفاظتی کبدی ایفا می‌کند. خواص آنتی اکسیداتیو، آنتی پرولیفراتیو سلولی و آنتی آنژیوژنیک کورکومین در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است، اما حلالیت کم کورکومین و تخریب شدید آن باعث عدم معرفی آن در کاربرد بالینی شده است، در نتیجه مطالعات و بررسی‌هایی برای تهیه و طراحی polymeric micelles (PMMCs) در مقیاس نانو برای بهبود انتقال سلولی کورکومین صورت پذیرفته است. فلاونوئیدهای چای سبز از جمله اپی کاتچین اخیراً مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیقات *in vitro* این ترکیبات از طریق مهار لیپید پروکسیداسیون، به چنگ انداختن رادیکال‌های آزاد و شلاته کننده یون‌های فلزی، به عنوان آنتی اکسیدانت مطرح شده‌اند که این خاصیت به دلیل وجود ساختار بی نظیر آن‌ها ذکر شده است، لذا هدف از این مطالعه تعیین اثر هم‌افزایی کورکومین و اپی کاتچین در بررسی آپوپتوز و پرولیفراسیون سلول‌های سرطان کولون رده‌های سلولی HT29 و فاکتورهای آپوپتوتیک صورت گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه یک مطالعه تجربی بوده و پس از تهیه سلول‌های HT29 از بانک سلولی انستیتو پاستور و پاساژ و تکثیر سلولی، سلول‌ها به صورت چاهک‌های سه تایی (triplicate) در ۷ گروه تست و ۲ گروه کنترل مثبت و منفی تقسیم شدند، در گروه‌های تست شماره ۱ و ۲ و ۳ سه غلظت نانو میسل کورکومین (۱۰، ۲۰، ۵۰ $\mu\text{g/ml}$) به صورت triplicate و هم‌چنین در گروه‌های ۴ و ۵ و ۶ سه غلظت اپی کاتچین (۱۰، ۲۰، ۵۰ $\mu\text{g/ml}$) به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و در گروه تست ۷: سلول‌های HT29 با غلظت IC50 نانو میسل کورکومین + IC50 اپی کاتچین و گروه ۸ کنترل مثبت: سلول‌ها تحت تاثیر 5FU (100 $\mu\text{g/ml}$) و گروه ۹، کنترل منفی صرفاً تحت تاثیر محیط کشت سلولی قرار گرفتند و پس از دوره انکوباسیون سلولی ۲۴ ساعته، تست‌های MTT برای بررسی پرولیفراسیون و روش Annexin flow cytometry برای تعیین میزان آپوپتوز انجام گرفت.

یافته‌ها: اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانستند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند، که با افزایش دوز این موضوع به بیش‌ترین حد خود رسید و هم‌چنین ترکیب این دو دارو در high dose باعث اثر هم‌افزایی شده که اثر بیش‌تری نسبت به هر کدام به تنهایی نشان داده است ($P < 0/05$). اپی کاتچین در غلظت ۲۰، ۱۰ و ۵۰ $\mu\text{g/ml}$ و ۱۰۰ نسبت به گروه کنترل منفی با $P < 0/05$ دارای اختلاف معنی‌دار بوده که این امر با افزایش دوز باعث کاهش میزان حیات سلولی در سلول‌های سرطان کولون شده است. کورکومین در گروه نانومیسل به همراه اپی کاتچین در غلظت IC50 نسبت به گروه کنترل مثبت 5FU در رده سلولی HT-29 میزان حیات سلولی بسیار کاهش یافته است. نتایج حاصل از بررسی میزان آپوپتوز سلولی در گروه‌های نانومیسل کورکومین و اپی کاتچین در غلظت‌های IC50 در رده سلولی HT-29 نشان داده که نانومیسل کورکومین و اپی کاتچین اثر هم‌افزایی داشته‌اند.

استنتاج: مطالعه حاضر بیانگر اثرات ضد سرطانی اپی کاتچین و نانومیسل کورکومین می‌باشد. هم‌چنین ترکیب این دو دارو باعث اثر هم‌افزایی می‌شود. در ضمن از این دو ترکیب می‌توان به عنوان کاندیدهای درمان کانسر کولون در رژیم‌های درمانی استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: سرطان کولون، اپی کاتچین، نانو کورکومین، آپوپتوز، پرولیفراسیون، رده سلولی HT29

E-mail:raminataee1349@gmail.com

مؤلف مسئول: رامین عطایی - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

۱. دانشجو، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، انستیتو هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۲/۱۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۴۰۲/۳/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۴۰۳/۳/۱۳

مقدمه

کورکومین (curcumin) رنگدانه زرد رنگی است که از گیاه زردچوبه به دست می آید و در واقع ماده موثر زردچوبه محسوب می شود (۱). این فراورده کریستالی و متبلور در مصارف پزشکی هند کاربرد بسیاری دارد. اخیراً اثرات مفید کورکومین بر سرطان‌های معده، کولون و دهان درموش سوری به اثبات رسیده است (۲). کورکومین نقش خود را معمولاً از طریق پروسه‌های فارماکولوژیکی از قبیل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی، آنتی‌ترومبوتیک، آپوپتوتیک و اثرات حفاظتی کبدی ایفا می‌کند. به جز آثار آنتی‌توکسیژنیک کورکومین در بعضی مطالعات آثار ضد نفروتوکسیک و آنتی‌هیپاتوتوکسیک دارد (۳،۴). خواص آنتی‌اکسیداتیو، آنتی‌پرولیفراتیو سلولی و آنتی‌آنژیوژنیک کورکومین در سال‌های اخیر مورد توجه قرار گرفته است (۵)، اما حلالیت کم کورکومین و تخریب شدید آن باعث عدم امکان معرفی آن در کاربرد بالینی شده است (۵) و در سال‌های اخیر مطالعات و بررسی‌هایی برای تهیه و طراحی (PMMCs) polymeric micelles در مقیاس نانو برای بهبود انتقال سلولی کورکومین صورت پذیرفته است (۵) و مشاهده شده است که جذب سلولی کورکومین با این ترکیبات پلی‌مریک بهتر است (۵).

در مطالعه‌ای مشاهده شده است اثرات F68-Cis-Cur micelles ۶۸-۱ اثرات سایتوتوکسیک بیش‌تری علیه سلول‌های A2780 و SMMC 7721 نسبت به کورکومین خالص داشته است (۶) و باعث کاهش بیش‌تر پتانسیل غشا میتوکندریایی و ایجاد آپوپتوزیس سلولی شده است (۶). ترکیبات موجود در چای سبز دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانت، ضد موتازن و ضد کارسینوژن بوده که می‌تواند انسان را از خطر سرطان و عوامل محیطی حفظ نماید. هم‌چنین در چای سبز نیز اثرات مرتبط با سلامتی آن به پلی‌فنل‌های موجود در چای سبز به‌خصوص فلاونوئیدها که در ۳۰ درصد وزن برگ تازه خشک شده آن وجود دارد، مربوط می‌شود (۷). در تحقیقات *in vitro* این ترکیبات از طریق مهار لیپید

پروکسیداسیون، به چنگ انداختن رادیکال‌های آزاد و شلاته‌کننده یون‌های فلزی، به‌عنوان آنتی‌اکسیدانت مطرح شده‌اند که این خاصیت به دلیل وجود ساختار بی‌نظیر آن‌ها ذکر شده است (۸). هم‌چنین فلاونوئیدها به‌عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانت، محافظت‌کننده قلبی، ضد التهاب و ضد سرطان شناخته می‌شوند (۹). به‌طور کلی فلاونوئیدها در مغز دارای چند اثر حفاظتی شامل: اثر مثبت در مقابل سموم عصبی، سرکوب التهاب‌های عصبی و توانایی افزایش (promote) حافظه و کارکردهای شناختی و یادگیری می‌باشند (۱۰،۱۱). مکانیسم اثر چای سبز ناشی از خصوصیات آنتی‌اکسیدانتی و توانایی کاتچین‌های پلی‌فنلی، برای به چنگ انداختن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسی فنلی موجود بر روی B-ring کاتچین‌های غیر گالولیت (EC, EGC) و همین‌طور B-ring و D-ring کاتچین‌های گالولیت (ECG, EGCG) می‌باشد. وجود ۳، ۴، ۵ تری‌هیدروکسی B-ring برای فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانتی و به چنگ انداختن رادیکال‌ها مهم می‌باشد (۱۱).

چای سبز دارای چندین ترکیب پلی‌فنلی از جمله EGC, EGCG, ECG و EC می‌باشد. تنوع ترکیبات متشکله به محل کشت، واریته گیاه، فصل برداشت و فرایندهای تولید وابسته است. به‌طور کلی شامل 2-35% ECG, 6-10% EGC, 10-15% EGCG و 2% EC می‌باشد (۱۲،۱۳).

کاتچین‌های موجود در چای سبز خاصیت آنتی‌اکسیدانتی بیش‌تری را نسبت به ویتامین C و E از خود نشان داده‌اند. قدرت به چنگ انداختن رادیکال‌ها در بین کاتچین‌های موجود در چای سبز به‌صورت catechin > ECG > EGCG > EGC > EC می‌باشد. علاوه بر اثرات آنتی‌اکسیدانتی، کاتچین‌های چای سبز دارای اثراتی بر روی اهداف مولکولی و سلولی در مسیرهای انتقال سیگنالی مرتبط با مرگ و بقای سلول هستند که این اثرات هم در سلول‌های عصبی و هم در تومور سلول‌های اپی‌تلیال/ اندوتلیال به اثبات رسیده است (۱۱).

protein (BCRP) و کاهش بیان P-glycoprotein شده است (۲۰). بنابراین با توجه به این که تاثیرات آپوپتوتیک و آنتی کانسری برای اپی کاتچین و کورکومین به تنهایی مشاهده شده است، این احتمال وجود دارد که اثر هم افزایی در خصوص دو ترکیب وجود داشته باشد، لذا این مطالعه با این هدف کلی طرح ریزی شده است و ۵- فلونورواوراسیل به عنوان درمان استاندارد کانسر کولون در نظر گرفته شده و بررسی مقایسه با آن و همچنین بررسی هم افزایی با آن صورت گرفته است. این مطالعه یک مطالعه تجربی بوده و طبق مصوبات اخلاق در پژوهش کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی مازندران با کد IR.MAZUMS..REC.1399.6816 انجام شد. BSA (bovin serum albumin) و کیت (Diaminobenzidine) DAB و 5FU/Lecuvorin, Anexin-v و اپی کاتچین از شرکت مواد شیمیایی سیگما خریداری شد. مواد کشت سلول از جمله RPMI, FBS, گلوتامین، آنتی بیوتیک از شرکت Roach خریداری شد و سلول های HT29، از انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سلول ها پس از کشت در محیط RPMI، 10% FBS و 1% streptomycin/penicilin و L-Glutamin 1% انکوباتور ۳۷ درجه و ۵% CO₂ در رطوبت ۳۰ درصد کشت داده شد و پس از رشد و پوشاندن کف فلاسک توسط تریسپین/EDTA عمل پاساژ انجام گردید.

نانومیسل کورکومین از شرکت دکتر جعفری علوم پزشکی مشهد تهیه و بررسی فیزیکی شیمیایی آن در آزمایشگاه دکتر علی نژاد (دانشکده شیمی دانشگاه مازندران) انجام شد و این بررسی ها شامل وزن و جرم حجمی، نقطه ذوب و اندازه و شکل کریستال و میزان رهاسازی در شرایط *in vitro* و *in vivo* بود.

رده های سلولی HT29 در شرایط انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵% CO₂ درصد در فلاسک های کشت در محیط RPMI، FCS 10% نگهداری و هر روز از لحاظ confluence بررسی و پس از پر شدن کف فلاسک با Trypsin/EDTA ۱۰ درصد در شرایط استریل پاساژ

Epicatechin (-) با وزن مولکولی ۲۹۰، فرم سیس (-)-catechin (+) بوده است (۱۴)، EC به طور وسیعی در مواد غذایی دیگر نیز وجود دارد. این ترکیب با غلظت های بالا در سیب، شاه توت، باقلا، گیلاس، انگور سیاه، گلابی، تمشک و کاکائو وجود دارند. EC با گروه های متیل، سولفور و اسید گلوکورونیک کونژوگه می شود (۱۵).

EC و کاتچین در روده کوچک متیله و گلوکورونیده می شود. بررسی های درون تنی نشان می دهد که EC بعد از مصرف به صورت خوراکی در گردش خون به شکل متیله، گلوکورونیده و سولفات قابل شناسایی می باشد (۱۶). مطالعات اخیر نشان داده که EC در موش سوری از طریق فعال کردن Nrf2 (nuclear factor erythroid 2) و آنزیم هم اکسیژناز ۱ باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری های ایسکسمیک قلب می گردد (۱۷).

در مطالعه ای توسط Costa و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشخص شد که عصاره چای سبز بر روی دوده سلولی کانسر پستان آثار سایتوتوکسیک داشته و باعث افزایش فاکتور آپوپتوتیک P53 شده اما بر روی سلول های نرمال اثر توکسیک نداشته است (۱۸).

در مطالعه Rogovskii و همکاران امکان اثر پیشگیری و درمانی کاتچین های چای در کانسر پروستات بررسی شد. در این مطالعه بیان شد که خواص آنتی کانسر چای از دو طریق اعمال می گردد که شامل اثر مستقیم یا از طریق تاثیر بر microenvironment سلولی به خصوص در ارتباط با سیستم ایمنی و کاهش التهاب و افزایش مقاومت سیستم ایمنی می باشد (۱۹). در مطالعه ای Ai و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی ترانسپورت کاتچین ها و تاثیر آن در efflux transport و نفوذپذیری سلول ها پرداختند و مشخص شد که فرم ترانس از لحاظ ایزومر فضایی در افزایش نفوذپذیری سلولی نسبت به فرم Cis در efflux transport نقش دارد و دو ساعت انکوباسیون دارویی در رده سلولی Caco-2 تک لایه باعث افزایش بیان پروتئین های multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and breast cancer-resistance

روش سنجش فعالیت متابولیکی MTT از این روش‌ها به شمار می‌رود. این تست بر پایه تبدیل سوسترای زرد رنگ نمک تترازولیوم بروماید با فرمول مولکولی MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) به کریستال‌های ارغوانی فورمازان به وسیله سلول‌هایی که از نظر متابولیک فعال هستند در طی مدت تقریبی ۴ ساعت استوار است. MTT به وسیله آنزیم سوکسینات تترازولیوم ردوکتاز شکافته می‌شود که متعلق به زنجیره تنفسی میتوکندریایی است و تنها در سلول‌های زنده فعال است. واکنش احیای سلولی با واسطه فاکتورهای NADPH و NADH انجام می‌شود و کریستال‌های فورمازان ساخته شده به کمک حلال DMSO ۱۰ درصد به فرم محلول در آمده و محلول ارغوانی رنگ ایجاد شده به وسیله اسپکتروفتومتری در طول موج ۵۴۵ نانومتر به صورت کمی اندازه‌گیری می‌شود. این آزمایش برای سنجش کمی رشد و بقای سلولی با استفاده از اسپکتروفتومتری و بدون استفاده از ایزوتوپ‌های رادیواکتیو طراحی شده است (۳۲-۳۰). گروه‌های آزمایشی در رابطه با نانومیسل کورکومین و اپی‌کاتچین در واقع همان سلول‌هایی هستند که در چاهک‌های ۹۶ خانه پلیت کشت سلول اضافه می‌شوند. به طوری که برای هر غلظت سه چاهک را در نظر می‌گیریم و برای کنترل نیز سه چاهک بدون تجویز دارو در نظر گرفته می‌شود. تعیین غلظت هم با توجه به فرانس و تعیین منحنی دوز ریسپانس تعیین می‌گردد. معیار پرولیفراسیون براساس OD جذب رنگ Formazan (کریستال‌های MTT که جذب سلول‌های زنده در کف چاهک کشت می‌شوند) محاسبه می‌شود و درصد Viability براساس OD جذب سلول‌های تست به کنترل محاسبه می‌شود. ضمناً برای گروه‌های دارویی IC50 یا حداقل غلظتی که باعث مهار ۵۰ درصد پرولیفراسیون می‌شود براساس منحنی Dose/response محاسبه می‌شود. همچنین سه غلظت برای کورکومین (غیرنانو) در نظر گرفته شده و برای هر غلظت سه چاهک در نظر

داده شدند. پاساژهای پرئودیک سلولی با استفاده از Trypsin-EDTA هنگامی که سلول‌ها به تجمع حدودی ۹۵-۹۰ درصد رسید، صورت می‌پذیرفت (۱۸، ۱۹).

گروه‌های آزمایشی در این مطالعه به شرح ذیل بوده‌اند: گروه‌های تست ۱ و ۲: سلول‌های HT29 در 10^4 cells/well density با سه غلظت نانو میسل کورکومین (۱۰، ۲۰، ۵۰ $\mu\text{g/ml}$) به صورت triplicate به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۲۰).

گروه‌های تست ۳ و ۴: سلول‌های HT29 در 10^4 cells/well density با سه غلظت اپی‌کاتچین (۱۰، ۲۰، ۵۰ $\mu\text{g/ml}$) به صورت triplicate به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۲۰). پس از انکوباسیون ۲۴ ساعته و تعیین cell viability در هر غلظت منحنی دوز پاسخ رسم شده و IC50 هر یک از ترکیبات تعیین می‌گردد.

گروه تست ۷: سلول‌های HT29 در 10^4 cells/well density با غلظت IC50 نانو میسل کورکومین + IC50 اپی‌کاتچین به صورت triplicate به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند (۲۰).

گروه کنترل مثبت: سلول‌های HT29 در 10^4 cells/well density با غلظت 5FU (100 $\mu\text{g/ml}$) به صورت triplicate به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند (۲۳). گروه کنترل منفی: سلول‌های HT29 در 10^4 cells/well density: صرفاً توسط محیط کشت سلولی به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوبه شدند (۲۳). لازم به ذکر است این گروه‌های آزمایشی براساس آزمون پرولیفراسیون طراحی شده و برای بررسی آپوپتوز همین گروه‌ها و تنها در غلظت IC50 بررسی شدند. برای بررسی cell proliferation از آزمون MTT و بررسی آپوپتوزیس به شرح زیر استفاده گردید.

آزمون MTT

آزمایش‌های بقا و تکثیر سلولی از اهمیت خاصی برای کاربردهای معمول برخوردار است که

گرفته می شود. مقایسه گروه های دارویی و کنترل ها بر اساس IC50 و درصد cell viability به روش نرم افزار SPSS و آزمون t-Test یا ANOVA انجام می گیرد. در این بررسی از 5FU (100 μM) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۳۲،۳۰). لازم به ذکر است که حلال مورد نظر برای اپی کاتچین نرمال سالین با کمک حلال اتانول ۲ درصد و نانومیسسل کورکومین در حلال DMSO ۱۰ درصد گردید.

Cell Apoptosis -

برای بررسی آپوپتوزیس از کیت فلوسایتومتری Annexin در سطح سلولی و تحت تاثیر شرایط تماس با داروها استفاده می شود. در روش ANEXIN سلول ها پس از جمع آوری پس از مرحله انکوباسیون ۴۸ ساعته با معرف ANNEXIN نشانه دار شده و با دستگاه فلوسایتومتری بر اساس مهاجرت سلول ها و جذب لیزر نوری شمارش سلول های آپپتویک به وسیله دستگاه انجام و نسبت آپپتوز و نکروز تعیین گردید (۲۰-۲۳).

تجزیه و تحلیل آماری

پس از اخذ و ثبت اطلاعات و جمع بندی برای تحلیل آماری از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) با نرم افزار Prism ver.3 برای مقایسه گروه ها از لحاظ بررسی پرولیفراسیون و داده های آپپتوز استفاده شد. اختلاف بین گروه ها با $P < 0.05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد. تعداد نمونه ها در هر گروه بر اساس آنالیز واریانس با قدرت اثر (Power 0.95) تخمین زده شد.

یافته ها

نتایج حاصل از بررسی اثر هم افزایی نانومیسسل کورکومین و اپی کاتچین در آپپتوز و پرولیفراسیون سلول های سرطان کولون (HT-29) به روش MTT داده های حاصل از بررسی IC50 (غلظتی از عصاره که رشد ۵۰ درصد از سلول ها را مهار می کند) نانومیسسل

کورکومین و اپی کاتچین بر روی رده سلولی سرطان کولون انسانی با استفاده از نرم افزار آماری Prism ver.3 مورد آنالیز آماری قرار گرفت و داده ها به روش Post Test: Tukey one-way ANOVA و سپس روش one-way ANOVA به منظور مقایسه داده های تمامی گروه ها با یکدیگر بررسی آماری شدند.

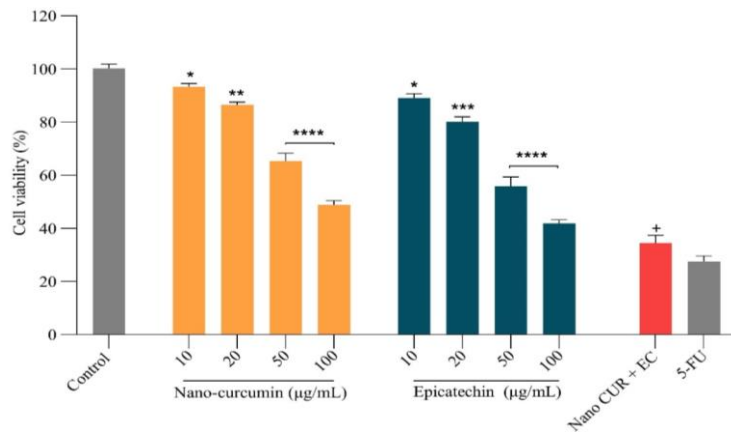
از میزان درصد زنده ماندن سلول ها (% viability) برای تعیین IC50 لاتین استفاده می گردد. بدین ترتیب که تعداد سلول های زنده مانده پس از مواجهه سلول های هر یک از رده های سلولی مورد نظر با عصاره گیاه و دارو و اتمام تست MTT با استفاده از میزان جذب خوانده شده توسط دستگاه microplate-reader را تعیین نموده و با تعداد سلول های هر یک از رده های سلولی مورد نظر که هیچ ماده ای دریافت نکرده بودند، نسبت گرفته شده و درصد آن را مشخص می نمائیم.

همان گونه که در نمودار شماره ۱ مشخص می باشد در غلظت ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ μg/mL گروه نانو میسل کورکومین نسبت به گروه کنترل منفی با $P < 0.05$ دارای اختلاف معنی دار می باشد که این امر با افزایش دوز باعث کاهش میزان حیات سلولی در سلول های سرطان کولون شده است. هم چنین در نمودار شماره ۱ مشخص می باشد در غلظت ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰ μg/mL اپی کاتچین نسبت به گروه کنترل منفی با $P < 0.05$ دارای اختلاف معنا دار می باشد که این امر با افزایش دوز باعث کاهش میزان حیات سلولی در سلول های سرطان کولون شده است.

در گروه نانومیسسل کورکومین به همراه اپی کاتچین در غلظت IC50 نسبت به گروه کنترل مثبت 5-FU در رده سلولی HT-29 میزان حیات سلولی بسیار کاهش یافته است. نتایج حاصل از بررسی میزان آپپتوز سلولی در گروه های نانومیسسل کورکومین و اپی کاتچین و گروه نانومیسسل کورکومین به همراه اپی کاتچین در غلظت های IC50 در رده سلولی HT-29 در تصویر شماره ۱ مشاهده می کنید.

جدول شماره ۱: مقایسه نتایج حاصل از تست MTT (cell viability) بین گروه های مختلف

5-FU	NANO CUR+EC	EC 100	EC 50	EC 20	EC 10	NANO CUR 100	NANO CUR 50	NANO CUR 20	NANO CUR 10	CONTROL	
۲۷/۶۱	۳۴/۵۴	۴۲/۰۰	۵۵/۸۵	۸۰/۱۴	۸۹/۰۹	۴۸/۸۰	۶۵/۳۹	۸۶/۵۷	۹۳/۲۹	۱۰۰/۳	MEAN
۲/۰۵۷	۲/۸۷۲	۱/۲۱۲	۳/۵۴۷	۱/۷۹۸	۱/۶۴۶	۱/۶۵۵	۲/۹۲۶	۰/۹۵۵۳	۱/۳۹۵	۱/۶۲۰	STD. DEVIATION
۱/۱۸۷	۱/۶۵۸	۰/۶۹۹۸	۰/۲۴۸	۱/۰۳۸	۰/۹۴۴۴	۰/۹۵۵۴	۱/۶۹۰	۰/۵۵۱۶	۰/۷۶۷۷	۰/۹۳۵۰	STD. ERROR OF MEAN

IC₅₀ Value Nano-CUR: 79.45 ± 6.84 µg/mLIC₅₀ Value Epicatechin: 60.63 ± 6.4 µg/mL

نمودار شماره ۱: نتایج MTT Assay

HT-29: $P < 0.05$ معنی داری در غلظت ۱۰ µg/mL گروه نانو میسل کورکومین نسبت به گروه کنترل منفی در رده سلولی HT-29

HT-29: $P < 0.01$ معنی داری در غلظت ۲۰ µg/mL گروه نانو میسل کورکومین نسبت به گروه کنترل منفی در رده سلولی HT-29

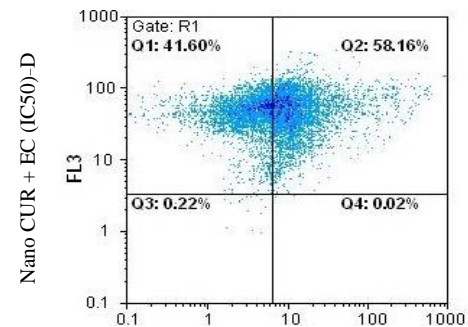
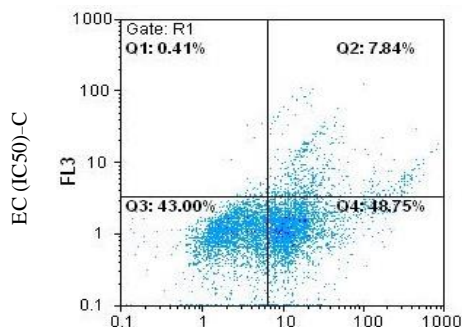
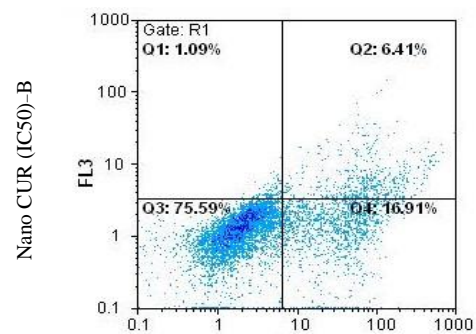
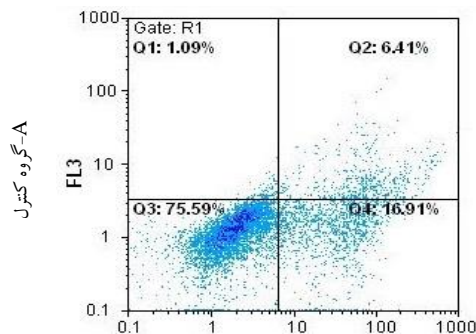
HT-29: $P < 0.0001$ معنی داری در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL گروه نانو میسل کورکومین نسبت به گروه کنترل منفی در رده سلولی HT-29

HT-29: $P < 0.05$ معنی داری در غلظت ۱۰ µg/mL گروه اپی کاتچین نسبت به گروه کنترل منفی در رده سلولی HT-29

HT-29: $P < 0.0001$ معنی داری در غلظت ۲۰ µg/mL گروه اپی کاتچین نسبت به گروه کنترل منفی در رده سلولی HT-29

HT-29: $P < 0.0001$ معنی داری در غلظت ۵۰ و ۱۰۰ µg/mL گروه اپی کاتچین نسبت به گروه کنترل منفی در رده سلولی HT-29

HT-29: $P < 0.05$ معنی داری گروه نانو میسل کورکومین به همراه اپی کاتچین در غلظت IC₅₀ نسبت به گروه کنترل مثبت 5-FU در رده سلولی HT-29



تصویر شماره ۱: نتایج بررسی آپوپتوز سلول های HT29 پس از تیمار ۲۴ ساعته با غلظت IC₅₀ اپی کاتچین و نانو میسل کورکومین به روش آنکسین فلوسایتمتری

بحث

کورکومین ماده‌ای کریستالی و متبلور است که در مصارف پزشکی هند کاربرد بسیاری دارد. اثرات مفید کورکومین بر سرطان‌های معده، کولون و دهان در موش سوری به اثبات رسیده است (۲). فلاونوئیدها که اخیراً مورد توجه بسیار زیادی قرار گرفته‌اند در گیاهان مختلفی وجود دارند. انسان به طور اساسی این ترکیبات را از طریق مصرف میوه، سبزی و نوشیدنی‌ها به دست می‌آورد. در تحقیقات *in vitro* این ترکیبات از طریق مهار لیپید پروکسیداسیون، به چنگ انداختن رادیکال‌های آزاد و شلاته کننده یون‌های فلزی، به عنوان آنتی‌اکسیدانت مطرح شده‌اند که این خاصیت به دلیل وجود ساختار بی نظیر آن‌ها ذکر شده است (۸). هم‌چنین فلاونوئیدها به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانت، محافظت کننده قلبی، ضد التهاب و ضد سرطان شناخته می‌شوند (۹). به طور کلی فلاونوئیدها در مغز دارای چند اثر حفاظتی اثر مثبت در مقابل سموم عصبی، سرکوب التهاب‌های عصبی و توانایی افزایش (promote) حافظه و کارکردهای شناختی و یادگیری هستند (۱۰). هم‌چنین چای سبز اثرات حفاظتی قابل توجهی را در مقابل بیماری‌هایی مانند پارکینسون، آلزایمر و آسیب‌های ایسکمیک نشان داده است. هم‌چنین اثرات ضد دیابتی چای سبز در مدل‌های حیوانی مقاوم به انسولین نشان داده شده است. از دیگر اثرات چای سبز می‌توان به خواص آنتی‌باکتریال، ضد HIV و ضد پیری اشاره کرد (۱۱).

در مطالعه حاضر نیز اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته‌اند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیش‌ترین حد خود رسیده و هم‌چنین ترکیب این دو دارو باعث اثر هم‌افزایی بوده و اثر بیش‌تری نسبت به هر کدام به تنهایی نشان داده است. در مطالعه‌ای که توسط Huerta و همکاران در سال ۲۰۰۲ با عنوان ویتامین D3 و آنالوگ غیر کلسیمی بار تومور را کاهش می‌دهد، انجام شد به این نتیجه رسیدند که

ویتامین D3 و آنالوگ غیر کلسیمی سبب کاهش بار تومور کولون در موش سوری می‌شود (۲۳). هم‌چنین در مطالعه حاضر نیز اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته‌اند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیش‌ترین حد خود رسیده است.

در مطالعه‌ای که توسط Devasena و همکاران در مارچ سال ۲۰۰۲ با عنوان اثر ضد سرطان آنالوگ کورکومین در مدل سرطان القا شده توسط دی‌متیل هیدرازین در موش صحرایی انجام گرفت، کورکومین به عنوان محافظت شیمیایی در مقابل گسترش سرطان کولون عمل کرده و نشان می‌دهد که گروه هیدروکسیل در حلقه آروماتیکی کورکومین مسئول اثر پیشگیری کننده در مقابل گروه متوکسی موجود در کورکومین است (۲۴).

در مطالعه حاضر نیز اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته‌اند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیش‌ترین حد خود رسیده و هم‌چنین ترکیب این دو دارو باعث اثر هم‌افزایی بوه و اثر بیش‌تری نسبت به هر کدام به تنهایی نشان داده است.

در مطالعه حاضر ترکیب دو داروی کورکومین و اپی کاتچین توانسته اثر بهتری در افزایش میزان افزایش مرگ سلول‌های سرطانی نشان دهد که این امر به احتمال زیاد به علت اثر هم‌افزایی این دو ترکیب می‌باشد، همانگونه که در مطالعه Xu و همکاران در اکتبر سال ۲۰۰۹ با عنوان ترکیب کورکومین و چای سبز و اثرات پیشگیری کننده در سرطان کولون القا شده توسط دی‌متیل هیدرازین در موش صحرایی نشان داده شد که کورکومین و چای سبز ممکن است یک اثر هم‌افزایی پیشگیری کننده نسبت به سرطان کولون داشته باشند که از اثر هر کدام به تنهایی بیش‌تر است (۲۵).

در مطالعه‌ای که توسط Bounaama و همکاران در سپتامبر ۲۰۱۲ با نام درمان کوتاه مدت سرطان کولون در موش سوری برای بررسی استرس اکسیداتیو، فعالیت

آرژیناز، TGF-B1 و HES-1 صورت گرفت نشانگر اثر محافظتی و مفید کورکومین بود (۲۶). هم چنین در مطالعه ما نیز اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته اند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیشترین حد خود رسیده است که به احتمال زیاد به علت افزایش مسیر آپوپتوز در سلول‌های سرطانی این اثرات را نشان می‌دهد.

در مطالعه‌ای که توسط Bisht و همکاران در نوامبر سال ۲۰۰۹ با عنوان ترکیبات رژیم کورکومین، زروراتول و فلاونوئید به‌عنوان ضد التهاب و محافظ هسته و DNA انجام گرفت به این نتیجه رسیدند که پلی فنول‌ها، می‌توانند از سلول و خصوصاً DNA در برابر آبشارهایی که منجر به واکنش‌های اکسایشی جهش و سرطان می‌شود جلوگیری کنند (۲۷).

در مطالعه حاضر اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته‌اند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیشترین حد خود رسیده است که بیانگر اثرات حفاظتی این ترکیبات می‌باشد. در مطالعه Nath و همکاران در خصوص بررسی اثرات حفاظت عصبی کاتچین‌ها در مقابل سموم میتوکندریال و پروتئین‌های موجود در ویروس HIV از طریق مسیر BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) مشخص شد که EC و epigallocatechin gallate دارای اثرات محافظت عصبی بیش‌تری نسبت به catechin یا resveratrol بودند. هم چنین به دلیل ساختار ساده‌تر و ویژگی‌های نفوذ پذیری از سد خونی مغزی (BBB)، احتمالاً EC بهترین گزینه درمان بیماری‌های نورودژنراتیو از جمله اختلالات شناختی ناشی از HIV که استرس اکسیداتیو یکی از مکانیسم‌های مهم پاتوفیزیولوژیکی آن است، مطرح می‌باشد (۱۴). بررسی‌های صورت گرفته توسط Shah و همکاران نشان می‌دهد که EC موجود در کاکائو و چای دارای اثرات محافظتی در

مقابل آسیب‌های ایسکمیک مغزی می‌باشد. در این مطالعه نوع وحشی موش سوری با دریافت دوزهای مختلف (۵، ۱۵، ۳۰ mg/kg EC) قبل از انسداد شریان میانی مغزی (MCAO)، دارای انفارکتوس‌های کم‌تر مغزی و نیز کاهش نمره نقائص نورولوژیک بوده است. نکته جالب توجه این‌که در موش‌های سوری فاقد آنزیم هم اکسیژناز ۱ (HO1) یا فاکتور رونویسی کننده Nrf2، اثرات محافظت عصبی EC از بین خواهد رفت. در نهایت در این مطالعه بیان شد که قسمتی از اثرات EC از طریق فعال سازی Nrf2 و افزایش اثرات محافظت عصبی هم اکسیژناز ۱ (HO1) خواهد بود (۱۷). در مطالعه ما نیز اپی کاتچین سبب افزایش میزان آپوپتوز و مرگ سلول‌های سرطانی شده است.

نتایج مطالعات Hooge و همکاران که به صورت in vivo بر روی نوروتوکسیسیته ناشی از تزریق Amiloyd-beta 25-23 در ناحیه CA1 هیپوکامپ صورت گرفت، نشان می‌دهد که تزریق Amiloyd-beta 25-23 باعث افزایش پراکسیداسیون لیپیدی، افزایش تشکیل ROS و کاهش مهارت‌های مربوط به حافظه و افزایش واکنش‌های ایمونولوژیکی علیه GFAP (Glial fibrillary acidic protein) می‌گردد، ولی در نمونه‌هایی که EC دریافت کرده‌اند کاهش پراکسیداسیون لیپیدی، کاهش تشکیل ROS و بهبود مهارت‌های مربوط به حافظه مشاهده می‌گردد (۲۸). هم چنین واکنش‌های ایمونولوژیک مربوط به GFAP نیز کاهش یافته بود. به‌طور کلی این مطالعه نشان داد که آسیب وارده به ناحیه هیپوکامپ به وسیله تجویز EC مهار شد (۲۸).

در مطالعه ما اپی کاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته‌اند باعث افزایش مرگ در سلول‌های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیشترین حد خود رسیده است که بیانگر اثرات حفاظتی این ترکیبات می‌باشد.

در مطالعه‌ای توسط Costa و همکاران در سال ۲۰۱۹ مشخص شد که عصاره چای سبز بر روی دوره

سلولی کانسر پستان آثار سایتوتوکسیک داشته و باعث افزایش فاکتور آپوپتوتیک P53 شده اما بر روی سلول های نرمال اثر توکسیک نداشته است (۱۸)، در مطالعه ما اپی کاتچین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته است باعث افزایش مرگ در سلول های سرطان کولون (HT29) شود که این مورد با افزایش دوز به بیش ترین حد خود رسیده است که بیانگر اثرات ضدسرطانی این ترکیب می باشد.

در مطالعه Rogovskii و همکاران امکان اثر پیشگیری و درمانی کاتچین های چای در کانسر پروستات بررسی شد. در این مطالعه بیان شد که خواص آنتی کانسر چای از دو طریق اعمال می گردد که شامل اثر مستقیم یا از طریق تاثیر بر microenvironment سلولی به خصوص در ارتباط با سیستم ایمنی و کاهش التهاب و افزایش مقاومت سیستم ایمنی می گردد (۱۹)، هم چنین در مطالعه ما اپیکاتچین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته است باعث افزایش مرگ در سلول های سرطان کولون (HT29) گردد که این مورد با افزایش دوز به بیش ترین حد خود رسیده است که به احتمال زیاد بیانگر اثرات ضد سرطانی این ترکیب از همین مسیرها می باشد.

در مطالعه ای توسط Ai و همکاران در سال ۲۰۱۹ به بررسی ترانسپورت کاتچین ها و تاثیر آن در efflux transport و نفوذپذیری سلول ها پرداخته و مشخص شد که فرم ترانس از لحاظ ایزومر فضایی در افزایش نفوذپذیری سلولی نسبت به فرم Cis در efflux transport نقش دارد و دو ساعت انکوباسیون دارویی در رده سلولی Caco-2 تک لایه باعث افزایش بیان پروتئین های multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) و breast cancer-resistance protein (BCRP) و کاهش بیان P-glycoprotein شده است (۲۰). علی رغم تاثیرات مفید کورکومین در بسیاری از بدخیمی ها مصرف بالینی آن به دلیل فراهمی زیستی پایین و حلالیت پایین محدود است. در بررسی بالینی گزارش شده است که مصرف خوراکی کورکومین به میزان ۸ gm/day به طور سریع

به متابولیت هایش تبدیل شده و در نتیجه سطح پایینی از کورکومین آزاد در پلاسما مشاهده شده است ($2/5 \text{ ng/ml} < 28$). در این تحقیق نیز کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته است باعث افزایش مرگ در سلول های سرطان کولون (HT29) شود که این مورد با افزایش دوز به بیش ترین حد خود رسیده است که بیانگر اثرات حفاظتی این ترکیب می باشد. هم چنین در مطالعه ای اثر هم افزایی بین سیس پلاتین و کورکومین و epigallocatechin-3-gallate (EGCG) در Ovarian cancer مدل سلولی انجام شد و combination index (CI) تعیین گردید و هم چنین تجمع سلولی سیس پلاتین و اتصال آن با DNA به وسیله روش graphite furnace atomic absorption spectrometry تعیین گردید و مشخص شد که اضافه کردن سیس پلاتین، ۴ ساعت قبل از کورکومین باعث بیش ترین اثر هم افزایی در رده های سلولی A2780 and A2780 شده است (۲۹). نتایج این مطالعه و نیز در مقایسه با سایر مطالعات انجام شده، نشان می دهد که در مطالعه ما اپیکاتچین و کورکومین با افزایش میزان آپوپتوز توانسته اند باعث افزایش مرگ در سلول های سرطان کولون (HT29) گردند که این مورد با افزایش دوز به بیش ترین حد خود رسیده است و بیانگر اثرات ضد سرطانی این ترکیبات می باشد. هم چنین ترکیب این دو دارو باعث اثر هم افزایی بوده و اثر بیش تری نسبت به هر کدام به تنهایی نشان داده است. هم چنین این دو ترکیب بر اساس مطالعات گذشته روی سلول های طبیعی اثرات سمیت سلولی نداشته و خود به تنهایی عاملی برای سمیت تلقی نمی شوند و می توان از آن به عنوان کاندیدهای سنتز داروی ضدسرطان نام برد. هم چنین در مطالعاتی که در سال ۲۰۱۰ بر روی سلول HT29 داشتیم اثرات ضد پروليفراسیون آنتاگونیست های 5HT1B و 5HT3 و 5HT4 بررسی شد که این مطالعه نیز در راستای مطالعات قبلی ما در بررسی تاثیر داروهای با منشأ طبیعی در کانسر کولون بوده (۳۰، ۳۱).

References

1. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: a short review. *Life Sci* 2006; 78(18): 2081-2087.
2. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. *Cancer Lett* 2008; 267(1): 133-164.
3. Naik SR, Thakare VN, Patil SR. Protective effect of curcumin on experimentally induced inflammation, hepatotoxicity and cardiotoxicity in rats: evidence of its antioxidant property. *Exp Toxicol Pathol* 2011; 63(5): 419-431.
4. Singh R, Sharma P. Hepatoprotective effect of curcumin on lindane-induced oxidative stress in male Wistar rats. *Toxicol Int* 2011; 18(2): 124-129.
5. Rahimi HR, Nedaeinia R, Sepehri Shamloo A, Nikdoust S, Kazemi Oskuee R. Novel delivery system for natural products: Nano-curcumin formulations. *Avicenna J Phytomed* 2016; 6(4): 383-398.
6. Fang XB, Zhang JM, Xie X, Liu D, He CW, Wan JB, Chen MW. pH-sensitive micelles based on acid-labile pluronic F68-curcumin conjugates for improved tumor intracellular drug delivery. *Int J Pharm* 2016; 502(1-2): 28-37.
7. Chen XJ, Pang D, Li LP, Chen YQ, Tan XR. A hypothesis on the relationship between tea drinking and sexual activity. *World J Hypertens* 2013; 3(4): 32-36.
8. Mariusz K. Piskula and Junji Terao. Accumulation of (-)-Epicatechin Metabolites in Rat Plasma after Oral Administration and Distribution of Conjugation Enzymes in Rat Tissues. *Journal of Nutrition* 1998; 128(7): 1172-1178.
9. Lopes Lda S, Marques RB, Fernandes HB, Pereira Sda S, Ayres MC, Chaves MH, et al. Mechanisms of the antinociceptive action of (-)-Epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. *J Biomed Sci* 2012; 19(1): 68.
10. Spencer JP. Flavonoids and brain health: multiple effects underpinned by common mechanisms. *Genes Nutr* 2009; 4(4): 243-250.
11. Zaveri NT. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences* 2006; 78(18): 2073-2080.
12. Suganuma M, Okabe S, Kai Y, Sueoka N, Sueoka E, Fujiki H. Synergistic Effects of (-)-Epigallocatechin Gallate with (-)-Epicatechin, Sulindac, or Tamoxifen on Cancer-preventive Activity in the Human Lung Cancer Cell Line PC-9. *Cancer Res* 1999; 59(1): 44-47.
13. Sutherland BA, Rahman RM, Appleton I. Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration. *J Nutr Biochem* 2006; 17(5): 291-306.
14. Nath S, Bachani M, Harshavardhana D, Steiner JP. Catechins protect neurons against mitochondrial toxins and HIV proteins via activation of the BDNF pathway. *J Neurol* 2012; 18(6): 445-455.
15. Gary W, Claudine M. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. *The American Journal Of Clinical Nutrition* 2005; 81(1): 243-255.

16. Seigo B, Naomi O, Midori N, Yuko M, Toshio T, Junji T. In Vivo Comparison of the Bioavailability of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and Their Mixture in Orally Administered Rats. *The Journal Nutrition* 2001; 131(11): 2885-2891.
17. Shah ZA, Li RC, Ahmad AS, Kensler TW, Yamamoto M, Biswal S, et al. The flavanol (-)-epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; 34(4): 735.
18. Costa D, Santos R, Andrade EDS, Themistocles BL, da Silva BG, Fialho E, Monteiro M, Silva J, Daleprane J. Green Tea Extract (*Camellia sinensis*) as a Potential Antitumoral Agent on Breast Cancer Cells (FS13-04-19). *Curr Dev Nutr* 2019; 3(Suppl 1): nzz030.FS13-04-19.
19. Rogovskii VS, Popov SV, Sturov NV, Shimanovskii NL. The Possibility of Preventive and Therapeutic Use of Green Tea Catechins in Prostate Cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2019; 19(10): 1223-1231.
20. Ai Z, Liu S, Qu F, Zhang H, Chen Y, Ni D. Effect of Stereochemical Configuration on the Transport and Metabolism of Catechins from Green Tea across Caco-2 Monolayers. *Molecules* 2019; 24(6): 1185.
21. Kunati SR, Yang SM, William BM, Xu Y. An LC-MS/MS method for simultaneous determination of curcumin, curcumin glucuronide and curcumin sulfate in a phase II clinical trial. *J Pharm Biomed Anal* 2018; 156: 189-198.
22. Yunos NM, Beale P, Yu JQ, Huq F. Synergism From Sequenced Combinations of Curcumin and epigallocatechin-3-gallate With Cisplatin in the Killing of Human Ovarian Cancer Cells. *Anticancer Res* 2011; 31(4): 1131-1140.
23. Huerta S, Irwin RW, Heber D, Go VLW, Koeffler HP, Uskokovic MR, et al. $1\alpha, 25$ -(OH) 2-D3 and its synthetic analogue decrease tumor load in the Apcmin mouse. *Cancer Res* 2002; 62(3): 741-746.
24. Devasena T, Rajasekaran K, Menon VP. Bis-1, 7-(2-hydroxyphenyl)-hepta-1, 6-diene-3, 5-dione (a curcumin analog) ameliorates DMH-induced hepatic oxidative stress during colon carcinogenesis. *Pharmacol Res* 2002; 46(1): 39-45.
25. Xu G, Ren G, Xu X, Yuan H, Wang Z, Kang L, et al. Combination of curcumin and green tea catechins prevents dimethylhydrazine-induced colon carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 2010; 48(1): 390-395.
26. Bounaama A, Djerdjouri B, Laroche-Clary A, Le Morvan V, Robert J. Short curcumin treatment modulates oxidative stress, arginase activity, aberrant crypt foci, and TGF- β 1 and HES-1 transcripts in 1, 2-dimethylhydrazine-colon carcinogenesis in mice. *Toxicology* 2012; 302(2): 308-317.
27. Bisht K, Wagner KH, Bulmer AC. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto-and DNA-protective dietary compounds. *Toxicology* 2010; 278(1): 88-100.
28. Hooge RD, De Deyn PP. Application of the morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Rev* 2001; 36(1): 60-90.
29. Shanmugam T, Selvaraj M, Poomalai S. Epigallocatechin gallate potentially abrogates fluoride induced lung oxidative stress, inflammation via Nrf2/Keap1 signaling pathway in rats: An in-vivo and in-silico study. *Int Immunopharmacol* 2016; 39: 128-139.
30. Ataei R, Ajdary S, Zarrindast M, Rezayat M, Hayatbakhsh MR. Anti-mitogenic and apoptotic effects of 5-HT1B receptor antagonist

- on HT29 colorectal cancer cell line. J Cancer Res Clin Oncol 2010; 136(10): 1461-1469.
31. Ataee R, Ajdary S, Rezayat M, Shokrgozar MA, Shahriari S, Zarrindast MR. Study of

5HT3 and HT4 receptor expression in HT29 cell line and human colon adenocarcinoma tissues. Arch Iran Med 2010; 13(2): 120-125.