

Anticancer Effects of Senecionine and Senecio vulgaris L. on Prostate Cancer Cell Lines

Morteza Mahdavi¹,
Mohammad Azadbakht²,
Akbar Vahdati³,
Mohammad Shokrzadeh⁴,
Ayub Farhadi⁵, Ali Davoodi⁶

¹ PhD Student in Biology, Department of Biology, Fars Science and Research Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Professor, Department of Biology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran

⁴ Professor, Pharmaceutical Sciences Research Center, Department of Toxicology and Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Laboratory of Molecular Cytogenetics, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

⁶ PhD Student in Pharmacognosy, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received October 16, 2016 ; Accepted December 1, 2018)

Abstract

Background and purpose: This research aimed at evaluating the effects of senecionine and *Senecio vulgaris* extract on apoptosis and cell cycle inhibition. Also, their cytotoxicity on prostate cancer cell lines (PC3, DU145 and HGFs), antioxidant effects, and influences on AR and CLU gene expression were investigated.

Materials and methods: In this experimental study, senecionine and *S. vulgaris* extract were prepared and the induced morphological changes on cell lines were evaluated in DMEM F12 cell culture after 24, 48, 72, and 96 hours by an invert microscope. Then, cell viability and apoptosis were determined by MTT and fluorescence analysis, respectively. Finally, AR and CLU gene expression and methylation of AR gene were evaluated using Real-time PCR and Bi-Sulfide test, respectively.

Results: Cytotoxicity data showed morphological changes 24 hours after treatment with senecionine in all cell lines and all concentrations which also increased in longer time. Based on MTT results, senecionine showed cytotoxicity in 50 and 500 µg/ml on PC3 and du145 prostate cancer cell lines.

Conclusion: According to current findings, Ragwort aerial part extract are suggested for in vivo studies with minimum destruction on normal cells and inducing effects on destruction and apoptosis of prostate carcinogenic cell lines.

Keywords: senecionine, cancer, cytotoxic, apoptosis

J Mazandaran Univ Med Sci 2019; 28 (169): 1-13 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakhtm@hotmail.com)

بررسی اثرات ضد سرطانی سنه سیونین و پیرگیاه در رده های سلولی سرطانی پروستات

مرتضی مهدوی^۱محمد آزاد بخت^۲اکبر وحدتی^۳محمد شکرزاده^۴ایوب فرهادی^۵علی داوودی^۶

چکیده

سابقه و هدف: در این مطالعه، اثرات ترکیب سنه سیونین و عصاره پیرگیاه (*Senecio vulgaris*) بر آپوپتوز و مهار سلولی ارزیابی شده است. هم چنین سمیت سلولی آن‌ها بر روی سلول‌های سرطانی پروستات (DU145، PC3 و HGFs)، اثرات آنتی‌اکسیدانی و اثرات آن‌ها در بیان ژن‌های گیرنده‌های آندروژن (AR) و کلاستین (CLU) نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تجربی بوده است. سنه سیونین و عصاره اندام هوایی پیرگیاه تهیه شدند. سپس تغییرات مورفولوژیک ایجاد شده توسط آن‌ها بر روی رده‌های سلولی سرطانی پروستات، در محیط کشت DMEM F12 پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲، و ۹۶ ساعت با میکروسکوپ معکوس بررسی شدند. درصد زنده ماندن رده‌های سلولی و میزان آپوپتوز نیز به ترتیب توسط آزمون MTT و آنالیز فلوسایتومتری و چگونگی بیان ژن‌های گیرنده AR و CLU با روش Real-time PCR و هم چنین نحوه متیلاسیون (methylation) ژن AR با تست بی‌سولفیت بررسی شدند.

یافته‌ها: نتایج بررسی سمیت سلولی نشان داد که پس از ۲۴ ساعت تیمار با سنه سیونین، تغییرات مورفولوژیک در هر سه رده سلولی و در هر یک از چهار غلظت فوق مشاهده شد. به طوری که با گذشت زمان این تغییرات تشدید شدند. نتایج آزمون MTT نشان داد که سنه سیونین در غلظت ۵۰ و ۵۰۰ $\mu\text{g/ml}$ دارای اثرات سایتوتوکسیک بر سلول‌های سرطان پروستات PC3 و DU145 است.

استنتاج: بر اساس نتایج، عصاره اندام هوایی پیرگیاه در غلظت مذکور با کم‌ترین آسیب به سلول‌های طبیعی و تخریب و القای آپوپتوز سلولی با هدف درمان سرطان پروستات برای مطالعات *in vivo* پیشنهاد می‌شود.

واژه های کلیدی: پیرگیاه، سرطان، سایتوتوکسیک، آپوپتوز

مقدمه

طور خودرو در مزارع، دامنه‌های مرطوب و کم ارتفاع کوهستان‌ها می‌روید. البته پراکندگی آن، بیش‌تر در نواحی معتدل است. از اختصاصات پیرگیاه این است که

پیرگیاه با نام علمی *Senecio vulgaris* L. و از خانواده Asteraceae، گیاهی است علفی، یک ساله یا دوساله، به ارتفاع ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر و دارای ساقه منشعب که به

E-mail: azadbakhtm@hotmail.com

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی دکتری زیست‌شناسی جانوری تکوین، گروه زیست‌شناسی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۲. استاد، گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران.

۳. استاد، گروه زیست‌شناسی، واحد فارس، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۴. استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، گروه سم‌شناسی/ داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استادیار، آزمایشگاه سیتوتنیک مولکولی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ساری، ایران

۶. دانشجوی دکتری فارماکوتوزی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

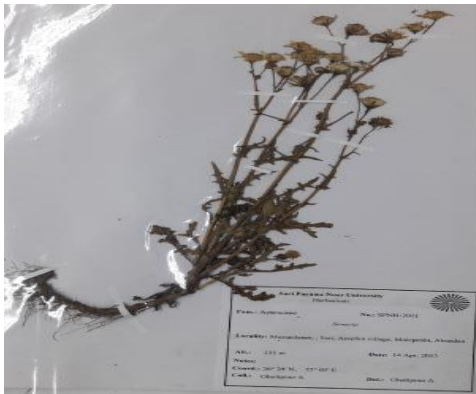
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۱۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۶/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۱۰/۱۵

برگ‌هایی منقسم به لوب‌های تقریباً مساوی و دندان‌دار و کاپیتول‌هایی عاری از زبانه، محصور در انولوکری مرکب از یک ردیف براکته دارد. در قسمت‌های مختلف پیرگیاه دو آلکالوئید پیرولیزیدینی، به نام سنه‌سیونین (Senecionine) و سنه‌سین (Senecine) یافت می‌شود. سنه‌سیونین، به صورت ورقه‌های ریز و کوچک، متبلور می‌شود. طعم تلخ دارد. در آب غیرمحلول ولی در کلروفورم حل می‌شود. به مقدار بسیار کم در الکل و اتر نیز محلول است. سنه‌سیونین یک ماده سمی قوی است و باعث القای جهش ژن‌هایی در ایجاد سرطان کبد موش می‌شود (۲،۱). تاکنون چندین مکانیسم برای سنه‌سیونین در سرطان کشف شده است که این تنوع در مکانیسم اثر باعث کاهش احتمال مقاومت‌های دارویی در اثر موتاسیون در ژن‌های پروتئین‌های هدف می‌شود. یکی از مکانیسم‌های اثر این ترکیبات مهار فاکتور رونویسی FNVB بوده که در سلول‌های سرطانی بسیار فعال می‌باشد. حضور این فاکتور در سلول‌های سرطانی جلوی آپوپتوز این سلول‌ها را می‌گیرد و مهار این عامل حساسیت سلول‌ها را در برابر عوامل القاکننده آپوپتوز افزایش می‌دهد. سنه‌سیونین اثراتش را با تداخل در مسیر FNVB با اتصال به P65 اعمال می‌کند. علاوه بر این مکانیسم، این ترکیب با کاهش بیان یا افزایش بیان ژن پروتئین کیناز MARK و c-Jun-N-terminal kinase و تداخل با فاکتور رونویسی STAT3 عمل می‌کند. مکانیسم اثر دیگر این ترکیب علاوه بر افزایش تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن، مهار تولید matrix metalloproteinase می‌باشد که برای رگ‌زایی بسیار حیاتی می‌باشد (۳،۲). آپوپتوز از نظر بیولوژی اهمیت زیادی دارد و به همین دلیل ردیابی و اندازه‌گیری آپوپتوز در تحقیقات و آزمایشات تشخیصی و بالینی کاربرد پیدا می‌کند. سلول‌های در حال آپوپتوز نشانه‌های زیادی دارند که قابل اندازه‌گیری با فلوسیتومتری هستند. این نشانه‌ها شامل تغییرات در نفوذپذیری غشای میتوکندری، فعال‌سازی کاسپازها و شکستگی‌های DNA سلولی می‌شوند. در اثر

آپوپتوز، سلول آب از دست داده و چروکیده می‌شود و تغییرات هسته‌ای در آن مشهود است. بنابراین در روش فلوسیتومتری، کوچک شدن سلول، جمع شدن هسته سلول مشاهده می‌شود. در مقایسه، سلول‌هایی که دچار نکروز شده‌اند، ابتدا متورم شده و سپس محتوای سلولی خود را آزاد می‌کنند (۵،۴). متیلاسیون DNA در خودنوزایی، تمایز و برقراری مجدد حالت سکون سلول‌های بنیادی نقش اساسی دارد. تومورها در شرایط خاصی از تکوین به وجود می‌آیند. سرطان ناشی از تنظیم ژن‌های نابرابر از جمله غیر فعال کردن تنظیم‌کننده‌های منفی هنگام تکثیر سلولی مانند ژن‌های سرکوب‌کننده تومور (Tumor suppressor genes-TSG) و فعال‌سازی تنظیم‌کننده‌های مثبت مانند ژن‌های تومورزا (Oncogenes) است. علاوه بر تغییرات ژنتیکی، فرایند سرطان‌زایی می‌تواند از طریق تغییرات اپی ژنتیکی در پروموتورهای ژنی نیز رخ دهد. بخش‌های توالی ژن که سیتوزین در کنار گوانین قرار دارد (CpG) معمولاً در سلول‌های طبیعی متیله نشده‌اند اما متیلاسیون زیاد در جزایر CpG که منجر به انسداد رونویسی و خاموش شدن ژن می‌شود، می‌تواند وقایع اولیه در سرطان‌زایی باشد و به عنوان یک مکانیزم رایج از دست دادن عملکرد TSG در سرطان‌های انسان محسوب می‌شود. از لحاظ بالینی، متیلاسیون TSG می‌تواند به عنوان نشان‌گر اپی ژنتیکی برای تشخیص تومور و پیش‌آگهی استفاده شود. بنابراین، شناخت الگوهای متیلاسیون در سراسر ژنوم می‌تواند کمک به شناسایی TSG‌های کلیدی غیرفعال در تشکیل تومور شود (۶،۵). اثر سمیت و سایتوتوکسیک ترکیبات و عصاره‌ها بر روی سلول‌های سرطانی با روش رنگ سنجی، با استفاده از رنگ تترازولیوم (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide) در مقایسه با گروه‌های کنترل بررسی می‌شود. این روش یک تست متابولیک رقابتی میتوکندریایی بوده و براساس شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز

جمع آوری گیاه

اندام هوایی پیروگیاه در فروردین ۱۳۹۴ از حاشیه شهر ساری جمع آوری شد. موقعیت پیروگیاه از منطقه روستای دروار ساری در عرض جغرافیایی ۳۶/۴۵۴۱۳۹ و طول جغرافیایی ۵۳/۰۸۴۷۸۷ قرار دارد. پس از شناسایی دقیق، با نمونه هرباریومی دانشگاه پیام نور ساری با کد SPNH-2011 تطبیق داده شد. گیاهان از نقاط مختلف در این موقعیت جغرافیایی جمع آوری شد تا نمونه برداری درستی انجام شده باشد.



تصویر شماره ۱: تصویر نمونه هرباریومی و گیاه کامل پیروگیاه

خشک کردن و عصاره گیری

گیاه جمع آوری شده در انبار بر روی توری‌های فلزی با شرایط تهویه مناسب قرار داده شد تا به طور کامل خشک شود. پس از خشک شدن کامل، نمونه‌ها توسط آسیاب برقی به طور کامل خرد شد. عصاره گیری از اندام هوایی پیروگیاه به روش سوکسله و توسط متانول صورت گرفت (۱۲،۱۱).

میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است که طی آن محلول زرد رنگ MTT تحت تأثیر این آنزیم به کریستال‌های نامحلول فورمازان بنفش رنگ تبدیل می‌شود. جذب این کریستال‌ها بعد از حل کردن در DMSO با استفاده از دستگاه میکروپلیت ریدر (Microplate reader Elisa reader-Stat Fax 303 Plus) در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری می‌شود (۸،۷). هم‌چنین در بررسی اثربخشی ضدسرطانی ترکیبات، ارزیابی تأثیر آن‌ها در مهار بیان ژن‌های برخی پروتئین‌های مهم مانند گیرنده‌های سلولی که بیان آن‌ها در بیماری سرطان افزایش می‌یابد، ضروری می‌باشد. از پروتئین‌های مهم سلولی در پروستات گیرنده آندروژنی (AR) و کلاسترین (CLU) بوده که بیان سلولی آن‌ها در شرایط بدخیمی پروستات افزایش یافته و مهار بیان آن‌ها تأثیر زیادی در درمان این بیماری دارد. از شاخص‌های عملکرد ضد سرطانی ترکیبات، توانایی آلکیلاسیون آن‌ها به صورت اختصاصی بر روی ژن‌های تأثیرگذار تکثیر سلولی زیاد در سلول‌ها بوده است. از ژن‌های مورد ارزیابی در سلول‌های بدخیم پروستات ژن PMEPA1 ژن مهمی بوده که در ترجمه پروتئین AR بسیار می‌باشد. هرگونه اختلال در عملکرد این ژن باعث مهار رشد و در ادامه مهار سرطان پروستات خواهد شد (۱۰،۹). در این مطالعه هدف بررسی اثر ضد سرطانی عصاره تام اندام هوایی گیاه *S. vulgaris* و ترکیب اصلی آن سنه سیونین به صورت جداگانه با تست‌های مختلف و برای تعیین اثر آن در سرطان پروستات می‌باشد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع تجربی، مستخرج از طرح مصوب دانشگاه علوم پزشکی مازندران و با تایید کمیته اخلاق دانشگاه بوده و تمامی مراحل کار اعم از کار گیاهی و سلولی براساس اصول اخلاقی توصیه شده کمیته اخلاق دانشگاه به انجام رسیده است.

تعیین مقدار پیرولیزیدین آلکالوئید تام عصاره

ترکیب سینه سیونین با روش UV در گیاه تعیین مقدار شد. در این روش پودر گیاه در متانل قرار گرفته و برای یک ساعت جوشانده شد. سپس تغلیظ و خشک گردیده و با پودر زینک آلکالوئیدهای N-اکسیدی آن احیا شده و استخراج آلکالوئیدها با اسیدی و قلیائی کردن محلول عصاره انجام شد. در نهایت در طول موج ۵۶۵ نانومتر در حضور محلول‌های استاندارد سینه سیونین مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۲، ۱۱).

کشت رده های سلولی سرطانی پروستات

رده‌های سلولی سرطانی پروستات (PC3, DU145) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد (کد NCBI، C47). رده سلول‌های سرطانی در محیط کشت DMEM/ f12 حاوی ال-گلوتامین، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر)، استرپتومایسین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر) و ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) کشت شدند. سلول‌ها در انکوباتور CO₂ ممرت آلمان در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و دی‌اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفتند. سلول نرمال فیروبلاست از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده (کد NCBI، C165) و در محیط کشت RPMI 1640 در شرایط نرمال کشت شد (۱۴، ۱۳).

بررسی اثر سینه سیونین و عصاره بر مورفولوژی سلول‌های کشت داده شده

در بررسی مورفولوژی، غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر هر یک از سینه سیونین و عصاره پیر گیاه را بر سلول‌های کشت داده شده به تعداد متوسط (۵×۱۰^۵) سلول در فلاسک‌های با درب فیلتردار استریل ۵۰ میلی‌لیتر که حاوی ۵ میلی‌لیتر محیط کشت بودند، اثر داده شدند و نتایج در ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از تیمار کردن سلول‌ها با ترکیب، توسط اینورت میکروسکوپ مجهز به دوربین اولمپوس ژاپن، عکس برداری شد (۱۵).

تست سمیت ماده استاندارد و عصاره گیاهی

بررسی میزان سمیت سایتوتوکسیک عصاره پیر گیاه و ماده استاندارد سینه سیونین بر هر دو رده سلولی سرطان پروستات (PC3, DU145) در مقایسه با گروه‌های کنترل بررسی شد. از هر رده سلولی، پس از انجام پاساژ، یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه شد. به این صورت که در هر خانه از پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۵۰۰۰ سلول موجود باشد. پلیت‌ها ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شدند تا سلول‌ها به بستر خود بچسبند. غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره پیر گیاه به ۴ گروه سه‌تایی از خانه‌های مربوط به هر دو رده سلولی سرطان پروستات و سینه سیونین به ۴ گروه سه‌تایی از خانه‌های مربوط به هر دو رده سلولی اضافه شد و به خانه‌های مربوط به گروه شاهد، برای کنترل منفی، آب مقطر استریل و برای گروه کنترل مثبت سیس پلاتین اضافه شد. این پلیت‌ها در انکوباتور قرار گرفتند و پس از ۴۸ ساعت به جای محیط کشت، ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت تازه همراه با ۲۰ میکرولیتر رنگ تترازولیوم اضافه و ۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شد. پس از آن محیط کشت حاوی رنگ تترازولیوم خالی و ۲۰۰ میکرولیتر DMSO و ۲۵ میکرولیتر بافر گلایسین جایگزین آن شد و جذب نوری خانه‌ها توسط دستگاه میکروپلیت ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (۱۵، ۱۶).

تست تعیین آپوپتوز و نکروز سلول‌ها به روش فلوسایتومتری

از هر رده سلولی، پس از انجام پاساژ، یک سوسپانسیون سلولی در محیط کشت تهیه شد. به این صورت که در هر خانه از پلیت ۱۲ خانه‌ای ۵۰۰۰۰۰ سلول موجود باشد. برای این آزمون ۳ پلیت ۱۲ خانه‌ای در نظر گرفته شد و ۳۰ خانه از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای انتخاب شد. سپس ۵ گروه سه‌تایی از خانه‌ها به سلول‌های هر دو رده سلولی سرطان پروستات با عصاره پیر گیاه و ۵ گروه سه‌تایی از خانه‌ها به سلول‌های هر دو رده سلولی با ماده استاندارد سینه سیونین اختصاص داده شد. این پلیت‌ها ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند و سپس برای سه دقیقه

شده و تجزیه و تحلیل واریانس برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی دار آماری بین تیمارهای مختلف از نظر بیان ژن‌های مورد نظر از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ استفاده شد (۱۹).

بررسی متیلاسیون ژن *PMEPA1* در سلول‌های رده سرطانی پروستات

طراحی پرایمر با نرم‌افزار Blast انجام شد. ژن *PMEPA1* از ژن‌های آندروژن رسپتور AR انتخاب شده و از طریق سایت NCBI به بررسی ژن و طراحی آن اقدام شد. یک میکروگرم DNA توسط بی‌سولفیت سدیم با استفاده از بسته EZ DNA Methylation-Gold™ در کیت بی‌سولفیت (EpiTect Bisulfite Kits) و پیروی از پروتکل عرضه کننده، با استفاده از بافر ۵۰ میلی‌لیتر، بی‌سولفیت شد. غلظت پرایمر برای مخلوط با الیگونوکلئوتید بی‌سولفیت شده ۷۰۰ نانوگرم تعیین شد. ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های بی‌سولفیت شده از هر رده سلولی PC3 و DU145 با اثر ماده استاندارد سنه‌سیونین و نمونه کنترل با اثر سیس‌پلاتین بر روی هر یک از رده‌ها را برای سکانس به کشور کره فرستاده شد. نتایج سکانس با نرم‌افزار ChromasPro نسخه ۲،۴،۱ آنالیز شد (۲۱،۲۰).

تعیین آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

اثر آنتی‌اکسیدانی گیاه با ترکیب DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش غلظت‌های مختلف عصاره گیاه با حجم برابر با محلول ۱۰۰ میکرومولار DPPH مخلوط و بعد از انکوباسیون برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق با دستگاه UV در طول موج ۵۱۷ نانومتر آنالیز گنگ شد هم‌چنین اثر آنتی‌اکسیدانی آن با ترکیب آنتی‌اکسیدان استاندارد BHA مقایسه شد (۲۲، ۲۳).

یافته‌ها

تعیین مقدار پیرولیزیدین آلکالوئید تام

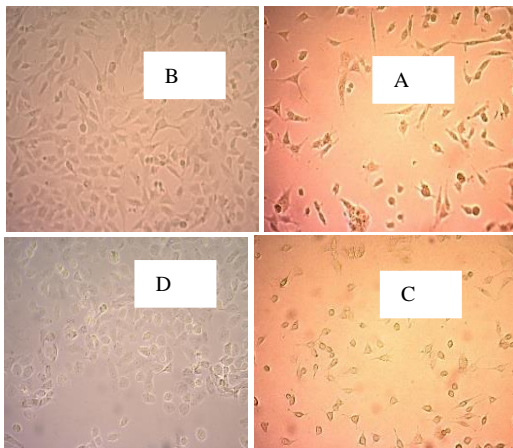
نتایج حاصل از تعیین مقدار پیرولیزیدین آلکالوئید معادل ۰/۲۹ درصد در عصاره خشک گیاه بوده است.

۲۰۰ میکرولیتر تریپسین ۱ ایکس برای هر خانه ریخته شد و پس از سانتریفوژ برای بررسی سلول‌های آپوپتوز و نکروز از دستگاه فلوسایتومتری چهار کاناله تک لیزری (Sysmex Partect PSA)، طول موج ۵۸۰ و ۶۳۰ به بالا، کیت Annexin V-FITC Apoptosis ebioscience استفاده شد (۱۶).

بیان نسبی ژن‌های *AR* و *CLU* به روش *Real time PCR* RNA دو رده سلولی پروستات به وسیله کیت استخراج RNA شرکت کیاژن (۷۴۱۰۴) استخراج شد. پس از استخراج RNA برای اطمینان از صحت استخراج و بررسی کمیت و کیفیت آن، RNA استخراج شده روی ژل آگارز دو درصد الکتروفورز شد. برای ساخت cDNA از کیت کیاژن فست (QuantiFast) Reverse Transcriptase شرکت کیاژن (۲۰۵۳۱۱) استفاده شد. قبل از اندازه‌گیری بیان ژن‌های مورد نظر، صحت عمل کرد آغازگرهای تهیه شده با استفاده از دستگاه PCR و تکثیر قطعه مورد نظر از روی cDNA تهیه شده براساس پرایمرهای اختصاصی برای هر ژن (TGTCACATGCTCAGCATGTTGG) به عنوان پرایمر مستقیم و CACCTCTCAAATATGCTAGACGAATCTGT به عنوان پرایمر معکوس AR و TGCCTTTCCCATGGACTGGG به عنوان پرایمر مستقیم و GAGTTCCAAAGGCCAAACCG به عنوان پرایمر معکوس (CLU)، بررسی شد. واکنش‌های Real Time QPCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و کیت کوآنتی‌فست سایبرگرین PCR شرکت کیاژن (۲۰۴۰۵۲) در دستگاه PCR از شرکت Corbett انجام شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد (۱۷، ۱۸).

روش اندازه‌گیری کمیت بیان ژن‌ها و تجزیه و تحلیل آماری نتایج

در مطالعه حاضر بیان رونوشت‌های ژن‌های مورد نظر با استفاده از روش لیواک ($2^{-\Delta\Delta CT}$) اندازه‌گیری



(A) پس از ۲۴ ساعت، (B) پس از ۴۸ ساعت،
(C) پس از ۷۲ ساعت، (D) پس از ۹۶ ساعت.

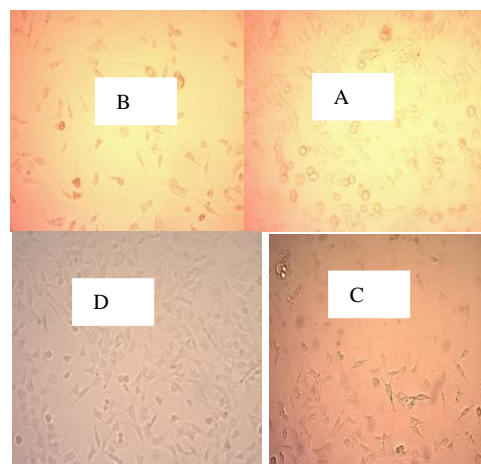
تصویر شماره ۲: بررسی اثر تیمار *S. vulgaris* با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (به ترتیب از بالا به پایین) پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر رده سلول‌های سرطانی PC3 (۱) و DU145 (۲).

بررسی مورفولوژیک اثر تیمار سنه سیونین با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بر رده سلول‌های سرطانی PC3، نیز همین نتایج را با شدت بیش‌تر ارائه کرده است. هم‌چنین در مورد رده سلولی DU145 که با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره گیاه تیمار شده بودند، با افزایش زمان، سلول‌های بیش‌تری از حالت طبیعی (دوکی شکل)، به حالت کروی درآمده و کوچک شده‌اند و افزایش گرانولاسیون سلولی در آن‌ها مشاهده می‌شود که تمامی این شرایط نشانه‌ای از مرگ سلول‌ها است. بررسی مورفولوژیک اثر تیمار سنه سیونین با غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (۱) و DU145 (۲)، نیز همین نتایج را با شدت بیش‌تر ارائه کرده است. نتایج مقایسه‌ای اثر عصاره گیاه و ترکیب سنه‌سیونین در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی دو رده سلولی در تصاویر شماره ۳ و ۴ آورده شده است.

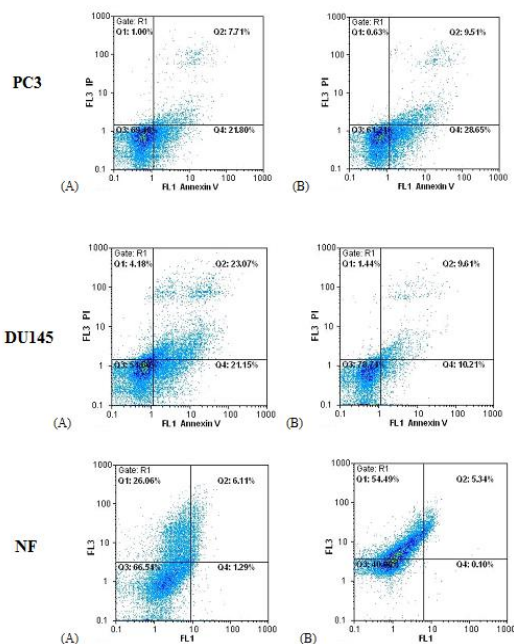
اثر عصاره های گیاهی و ماده استاندارد بر میزان تکثیر رده سلولی با روش *MTT assay*

اثر عصاره پیر گیاه بر تکثیر رده‌های سلولی PC3 و DU145 در تمام غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، نسبت به گروه کنترل مثبت سیس پلاتین با غلظت ۱۰ نانوگرم در میلی‌لیتر، دارای اثر یک نواختی بوده و برای بررسی اثر آپوتوزیس مناسب می‌باشند (تصویر شماره ۲). بر اساس این نتایج دوز ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بیش‌ترین اثر را دارا بوده است. هم‌چنین، اثر سنه سیونین بر تکثیر رده سلولی DU145 در تمام غلظت‌های ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، با افزایش غلظت از تکثیر رده سلولی می‌کاهد و تیمارهای فوق برای ارزیابی اثر آپوتوزیس نسبت به گروه تیمار عصاره‌های گیاهی مناسب می‌باشند.

تصاویر مورفولوژیک نشان داد که با تیمار *S. vulgaris* بر رده سلول‌های سرطانی PC3 با افزایش غلظت و با افزایش زمان، سلول‌های بیش‌تری از حالت طبیعی (دوکی شکل)، به حالت کروی درآمده و کوچک شده‌اند. در ضمن افزایش گرانولاسیون سلولی در آن‌ها مشاهده شد که تمامی این شرایط نشانه‌ای از مرگ سلول‌ها است.



(A) پس از ۲۴ ساعت، (B) پس از ۴۸ ساعت،
(C) پس از ۷۲ ساعت، (D) پس از ۹۶ ساعت



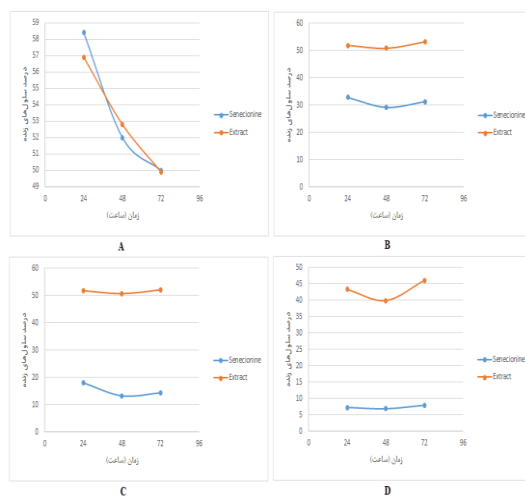
تصویر شماره ۵: نتایج حاصل از بررسی اثر عصاره گیاه (A) و ترکیب سنیونین (B) بر روی روند آپتوز در سه رده سلولی PC3، DU145 و سلول‌های نرمال فیروبلاستیک (NF).

بر اساس تصویر شماره ۵، عصاره پیرگیاه باعث ۲۱/۸۰ درصد آپتوزیسی ابتدایی، ۷/۷۱ درصد بقای سلول زنده ۶۹/۴۹ درصد ($p < 0.05$) و سنیونین باعث ۲۸/۶۵ درصد آپتوزیسی ابتدایی، ۹/۵۱ درصد آپتوزیسی انتهایی، ۰/۶۳ درصد بقای سلول زنده ۶۱/۲۱ درصد PC3 شده است ($p < 0.05$). هم‌چنین، عصاره پیرگیاه باعث ۱۰/۲۱ درصد آپتوزیسی ابتدایی، ۹/۶۱ درصد آپتوزیسی انتهایی، ۱/۴۴ درصد نکروزیسی و میزان بقای سلول زنده ۷۸/۷۴ درصد شده ($p < 0.05$) و سنیونین نیز باعث ۲۱/۱۵ درصد آپتوزیسی ابتدایی، ۲۳/۰۷ درصد آپتوزیسی انتهایی، ۴/۱۸ درصد نکروزیسی و میزان بقای سلول زنده ۵۱/۶۶ درصد در رده سلولی DU145 شده است ($p < 0.05$).

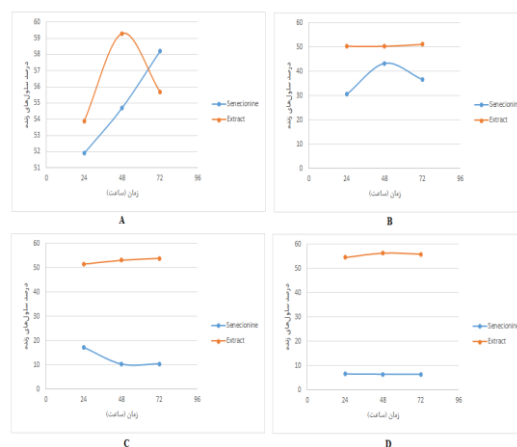
در مورد سلول‌های نرمال فیروبلاستیک نیز پیرگیاه باعث ۰/۱۰ درصد آپتوزیسی ابتدایی، ۵/۳۴ درصد آپتوزیسی انتهایی، ۵۴/۴۹ درصد نکروزیسی و میزان بقای سلول زنده ۴۰/۱۶ درصد ($p < 0.05$) و سنیونین

ارزیابی القاء آپتوزیسی سنیونین و عصاره پیرگیاه با فلوسایتومتری

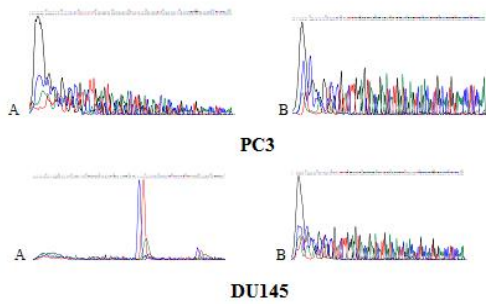
آپتوزیسی و نکروزیسی و بقای سلول زنده برای رده‌های سلولی PC3، DU145 و فیروبلاست نرمال با اثر عصاره اندام هوایی پیرگیاه به غلظت ۱۰۰ μg/ml و ماده خالص سنیونین به غلظت ۱۰۰ μg/ml که به مدت ۲۴ ساعت تیمار داده شدند، با استفاده از کیت آپتوزیسی (Annexin-V FITC and propidium iodide) و دستگاه فلوسایتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.



تصویر شماره ۳: نتایج مقایسه‌ای اثر عصاره گیاه و ترکیب سنیونین (در دوزهای ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از A تا D) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی PC3



تصویر شماره ۴: نتایج مقایسه‌ای اثر عصاره گیاه و ترکیب سنیونین (در دوزهای ۱۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از A تا D) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی DU145



تصویر شماره ۶: (۱): کروماتوگرام A اثر سیس پلاتین و B سنه سیونین بر متیلاسیون ژن PMEPA1 در رده سلولی PC3 و DU145

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره پیرگیاه و سنه سیونین با توجه به نتایج به دست آمده میزان IC_{50} عصاره گیاه، سنه سیونین و BHA یا هیدروکسی آنیزول بوتیلته به ترتیب ۲۸/۷۰، ۳۷/۵۲ و ۵۸/۷۲ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد.

بحث

سرطان پروستات شایع ترین بدخیمی در مردان در جهان غرب است. علی رغم بروز کم سرطان پروستات در کشورهای شرقی، آمار مرگ و میر سرطان پروستات در ایران در حال افزایش است. در دو دهه گذشته، درمان آندروژنی به عنوان موثرترین روش درمان سرطان متاستاتیک پروستات و حذف تومورها به کار گرفته شده است. این درمان معمولاً با متوقف کردن سیگنالینگ تستوسترون، کاهش بیان ژن گیرنده آندروژنی و کاهش تولید PSA، آپوپتوز را در اکثر سلول های سرطانی پروستات القا می کند (۲۴). در این مطالعه، ترکیب سنه سیونین و عصاره تام پیرگیاه جهت درمان سرطان پروستات بر روی رده های سلولی PC3 و DU145 در شرایط برون تنی و به صورت مقایسه ای بررسی شدند. با توجه به تصاویر شماره ۳ و ۴ ترکیب سنه سیونین خالص اثر سایتوتوکسیک قوی تری را نسبت به عصاره گیاه بر روی دو رده سلولی PC3 و DU145 اعمال کرده است. البته در برخی دوزها این

باعث ۱/۲۹ درصد آپوپتوزیس ابتدایی، ۶/۱۱ درصد آپوپتوزیس انتهایی، ۲۶/۰۶ درصد نکروزیس و میزان بقای سلول زنده ۶/۵۲ درصد شد ($p < 0.05$).

میزان بیان ژن های AR و CLU در رده های سلولی

در جدول ۱ میانگین بیان ژن AR و CLU با اثر سنه سیونین بر هر دو رده سلولی سرطانی پروستات ارائه شده است.

جدول شماره ۱: میانگین بیان ژن AR و CLU با اثر سنه سیونین بر رده سلولی پروستات

ماده مؤثره استاندارد	میانگین بیان AR در PC3	میانگین بیان AR در DU145	میانگین بیان CLU در PC3	میانگین بیان CLU در DU145
سنه سیونین	4/06a	8/25a	2/79b	2/05b
کنترل	0/97b	0/97b	17/09a	17/09a
P-value	۰/۰۱۴۲	۰/۰۳۷۰	۰/۰۰۴۲	۰/۰۰۲۸
SEM	۰/۴۱	۰/۶۱	۱/۲	۱/۳

اثر سنه سیونین بر متیلاسیون قطعه طراحی شده ژن

PMEPA1 در رده های سلولی

اثر سیس پلاتین (ماده کنترل) و سنه سیونین بر متیلاسیون قطعه طراحی شده (Template) ژن PMEPA1 در دو رده سلولی PC3 و DU145 در تصویر شماره ۶ آورده شده است. با توجه به این که رده سلولی PC3 هیپرمتیلاسیون بوده، اثر سیس پلاتین بر ژن PMEPA1 در سکانس انجام شده ۱۰۰ درصد می باشد. نتیجه این که سیس پلاتین به عنوان داروی آپوپتوزیس در کاهش متیلاسیون موثر نیست ولی اثر سنه سیونین بر ژن PMEPA1 در سکانس انجام شده ۸۰ درصد می باشد و در نتیجه سنه سیونین به عنوان داروی آپوپتوزیس در کاهش متیلاسیون موثر است. هم چنین، در مورد رده سلولی DU145 با توجه به این که این رده سلولی هیپرمتیلاسیون بوده، اثر سیس پلاتین و سنه سیونین بر ژن PMEPA1 در سکانس انجام شده ۱۰۰ درصد می باشد. نتیجه این که در این رده سلولی سیس پلاتین و سنه سیونین به عنوان داروی آپوپتوزیس در کاهش متیلاسیون موثر نیستند.

۲۰۱۷ بر روی اثر سایتوتوکسیک عصاره میوه گیاه *Citrullus colocynthis* انجام دادند، میزان IC_{50} آن را بر روی رده‌های سلولی AGS و MCF-7 مورد بررسی قرار دادند. بر اساس این مطالعه میزان IC_{50} عصاره میوه گیاه بین $1 \mu/ml$ تا $1000 \mu/ml$ در زمان‌های مختلف متغیر بود. این گیاه به دلیل دارا بودن ترکیبات سایتوتوکسیک مانند کوکوریپتاسین و کولوسیتین اثر سمیت سلولی بالائی را نشان داد (۲۵).

در مطالعه Butler و همکارانش در سال ۲۰۰۰ اثر مهارى ترکیب سوپروئیل آنیلید هیدروکسامیک اسید بر روی سرطان پروستات مدل *in vitro* و *in vivo* مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه، مشخص شد که این ترکیب با مهار آنزیم هیستون داستلاز عمل ساپرس سلول‌های سرطانی پروستات را انجام می‌دهد. در مطالعه حاضر ترکیب سنه سیونین با مکانیسم‌های متعددی از جمله مهار گیرنده آندروژنی باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۲۶). هم‌چنین در مطالعه‌ای که Eroğlu و همکارانش در سال ۲۰۱۵ بر روی مکانیسم‌های مختلف ضد سرطانی ترکیب فرولیک اسید بر روی سلول‌های سرطانی پروستات انجام دادند مشخص شد که این ترکیب فنلیک با مهار چرخه سلولی و القای آپوپتوز باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های سرطانی پروستات می‌شود (۲۷).

یکی از مکانیسم‌های مهم در بروز سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلول و روند آپوپتوز است. مواد مختلف و داروهای شیمی درمانی بسیاری از طریق این مکانیسم باعث بروز سمیت سلولی می‌شوند. به عنوان مثال مکانیسم اثر سمیت سلولی ترکیبات فنلی از طریق القای آپوپتوز است که این عمل به واسطه مهار فاکتور رونویسی فاکتور NF- κ B مرتبط با تولید سایتوکین‌ها، فعال شدن پروتئین P53 و افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در اثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده است. به‌همین منظور در این مطالعه، جهت یافتن اثر سمیت عصاره پیروگیا و ترکیب خالص

اثرات وابسته به زمان، افزایش و در برخی وابسته به زمان، کاهش یافت. این اثربخشی کمتر عصاره به علت درصد پایین‌تر ترکیب سنه سیونین در آن در دوز یکسان با ترکیب خالص بوده که نشان دهنده وابستگی اثر سایتوتوکسیک عصاره به این ترکیب می‌باشد. هم‌چنین که با افزایش دوز نیز اثربخشی عصاره تغییر قابل توجهی نکرد. این نتیجه حاکی از وابسته به دوز بودن اثر سایتوتوکسیک ترکیب سنه سیونین بوده که این که به صورت تعجب برانگیزی در برخی دوزهای سنه سیونین با افزایش زمان رشد سلول افزایش یافت.

در مورد اثر آپوپتوتیک عصاره و ترکیب سنه سیونین، هر دو باعث ایجاد آپوپتوز بیشتری در هر دو رده سلولی سرطانی و آپوپتوز کمتری در رده سلولی فیروپلاستی نرمال شده و هر دو مورد باعث ایجاد نکروز بالائی در سلول فیروپلاستیک نرمال شدند درضمن میزان بقای سلولی بعد از ۲۴ ساعت در هر سه رده سلولی بیش از ۵۰ درصد محاسبه شد که احتمالاً با افزایش زمان مواجه با رده‌های سلولی سرطانی کاهش پیدا خواهد کرد. در رابطه با اثر ترکیب سنه سیونین بر روی بیان ژن دو پروتئین AR و CLU، این ماده تنها توانست بیان ژن CLU را به میزان قابل توجهی در هر دو رده سلولی کاهش دهد. البته سنه سیونین باعث افزایش بیان ژن AR در هر دو رده سلولی شد. این نتایج حاکی از این بوده که این ترکیب مداخله قابل توجهی با توالی ژنی بیان‌کننده پروتئین CLU دارد. هم‌چنین ترکیب سنه سیونین باعث متیلاسیون ۸۰ درصدی ژن PMEPA1 در رده سلولی PC3 و ۱۰۰ درصدی این ژن در رده سلولی DU145 شده است. نتایج این تست حاکی از این بوده که ترکیب سنه سیونین به عنوان داروی آپوپتوتیک در کاهش متیلاسیون در رده سلولی PC3 موثر است. مطالعات مختلفی در زمینه اثربخشی و ارزیابی مکانیسم‌های اثر ترکیبات با منشا طبیعی در مدل‌های مختلف بیماری سرطان انجام شده است.

در مطالعه‌ای که رضائی و همکارانش در سال

برای عصاره پیر گیاه، اثر سنیونین بر میزان آپوپتوز و نکروز به ترتیب با میانگین ۵/۹۰۵ درصد و ۷۵/۸۴۵ درصد مشاهده شد و برای عصاره پیر گیاه میزان آپوپتوز و نکروز به ترتیب با میانگین ۱۱/۶۷۵ درصد و ۵۰/۷۳ درصد مشاهده شد. با توجه به کاهش متیلاسیون رده سلولی DU145 به میزان ۲۰ درصد، این فرآیند ثابت می‌شود. پائین بودن میزان آپوپتوز در اثر ماده سنیونین با توجه به کاهش ۲۰ درصد متیلاسیون رده سلولی PC3 را می‌توان به پائین بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی ماده استاندارد سنیونین با میانگین ۶۵/۸۳ درصد دانست. شواهد به دست آمده آپوپتوز به عنوان مشخصه‌ای از مکانیسم سمیت سلولی سنیونین و عصاره پیر گیاه تعیین شد. در مطالعات دیگر نیز القای آپوپتوز توسط سایر ترکیبات در انواع رده‌های سرطانی اثبات شده است.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از پایان نامه آقای مرتضی مهدوی با کد اخلاق IR.MAZUMS.REC.95.2101 می‌باشد. از تمامی افرادی که در این طرح کمک کردند تشکر و قدردانی می‌کنم.

References

- Xiong A, Yang L, Ji L, Wang Z, Yang X, Chen Y, et al. UPLC-MS based metabolomics study on *Senecio scandens* and *S. vulgaris*: an approach for the differentiation of two *Senecio* herbs with similar morphology but different toxicity. *Metabolomics* 2012; 8(4): 614-623.
- Wiedenfeld H. Plants containing pyrrolizidine alkaloids: toxicity and problems. *Food Addit Contam Part A* 2011; 28(3): 282-292.
- Wiedenfeld H, Edgar J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. *Phytochem Rev* 2011; 10(1): 137-151.
- Gong K, Li W. Shikonin, a Chinese plant-derived naphthoquinone, induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells through reactive oxygen species: A potential new treatment for hepatocellular carcinoma. *Free Radic Biol Med* 2011; 51(12): 2259-2271.
- Liu B, Bian H-j, Bao J-k. Plant lectins: potential antineoplastic drugs from bench to clinic. *Cancer Lett* 2010; 287(1): 1-12.
- Wendel H-G, Wolfe AL, Mavrakis KJ, Oricchio E, Ferrando AA, De Keersmaecker K, et al. Methods and compositions for the detection and treatment of cancer involving

- miRNAs and miRNA inhibitors and targets. Google Patents; 2017.
7. Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative activity of plant extracts used against cancer in traditional medicine. *Sci Pharm* 2010; 78(1): 33-45.
 8. Tamilselvam K, Braidy N, Manivasagam T, Essa MM, Prasad NR, Karthikeyan S, et al. Neuroprotective effects of hesperidin, a plant flavanone, on rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for Parkinson's disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2013; 2013.
 9. Sharad S, Li H, Ravindranath L, Haffner M, Heidenberg D, Yegnasubramanian S, et al. MP24-03 methylation of the pmepal gene disrupts the control of androgen receptor in prostate cancer. *J Urol* 2014; 191(4): 260-265.
 10. Yu J-T, Li L, Zhu Q-X, Zhang Q, Zhang W, Wu Z-C, et al. Implication of CLU gene polymorphisms in Chinese patients with Alzheimer's disease. *Clin Chim Acta* 2010; 411(19-20): 1516-1519.
 11. Shafiee F, Khoshvishkaie E, Davoodi A, Dashti Kalantar A, Bakhshi Jouybari H, Ataei R. The Determination of Blood Glucose Lowering and Metabolic Effects of *Mespilus germanica* L. Hydroacetic Extract on Streptozocin-Induced Diabetic Balb/c Mice. *Medicines* 2018; 5(1): 1.
 12. Azadbakht M, Talavaki M. Qualitative and quantitative determination of pyrrolizidine alkaloids of wheat and flour contaminated with *Senecio* in Mazandaran Province farms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 2010; 179-183 (Persian).
 13. Hashemi S, Abediankenari S, Ghasemi M, Azadbakht M, Yousefzadeh Y, Dehpour A. The effect of fig tree latex (*Ficus carica*) on stomach cancer line. *Iran Red Crescent Med J* 2011; 13(4): 272 (Persian).
 14. Shokrzadeh M, Modanloo M. An overview of the most common methods for assessing cell viability. *Res Med Dent Sc* 2017; 5(2): 33-41.
 15. Shokrzadeh M, Azadbakht M, Ahangar N, Hashemi A, Saravi SS. Cytotoxicity of hydro-alcoholic extracts of *Cucurbita pepo* and *Solanum nigrum* on HepG2 and CT26 cancer cell lines. *Pharmacogn Mag* 2010; 6(23): 176-179.
 16. Rathinavelu A, Levy A, Sivanesan D, Murugan D, Jornadal J, Quinonez Y, et al. Cytotoxic effect of pumpkin (*Curcubita pepo*) seed extracts in LNCaP prostate cancer cells is mediated through apoptosis. *Curr Top Nutraceutical Res* 2013; 11(4): 137-143.
 17. Tabatabaei Qomi R, Sheykhasan M, Kalhor N, Ghiasi M. Chondrogenic Differentiation of Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells Using Fibrin Hydrogel Scaffold. *J Mazandaran Univ Med Sci* 2015; 25(123): 21-31 (Persian).
 18. Wang X, Xia Y, Liu L, Liu M, Gu N, Guang H, et al. Comparison of MTT assay, flow cytometry, and RT-PCR in the evaluation of cytotoxicity of five prosthodontic materials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 95(2): 357-364.
 19. Wahab R, Dwivedi S, Khan F, Mishra YK, Hwang I, Shin H-S, et al. Statistical analysis of gold nanoparticle-induced oxidative stress and apoptosis in myoblast (C2C12) cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014; 123: 664-672.
 20. Holmes EE, Jung M, Meller S, Leisse A, Sailer V, Zech J, et al. Performance evaluation of kits for bisulfite-conversion of DNA from tissues, cell lines, FFPE tissues, aspirates, lavages, effusions, plasma, serum,

- and urine. *PloS One* 2014; 9(4): e93933.
21. Booth MJ, Ost TW, Beraldi D, Bell NM, Branco MR, Reik W, et al. Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nature Protocols* 2013; 8(10): 1841-1851.
 22. Azadmehr A, Oghyanous KA, Hajiaghaee R, Amirghofran Z, Azadbakht M. Antioxidant and neuroprotective effects of *scrophularia striata* extract against oxidative stress-induced neurotoxicity. *Cell Mol Neurobiol* 2013; 33(8): 1135-1141.
 23. Azadbakht M, Hosseinimehr S, Shokrzadeh M, Habibi E, Ahmadi A. *Diospyros lotus L.* fruit extract protects G6PD-deficient erythrocytes from hemolytic injury in vitro and in vivo: prevention of favism disorder. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15(11): 1270-1281.
 24. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 52-79.
 25. Rezai M, Davoodi A, Asori M, Azadbakht M. Cytotoxic Activity of *Citrullus colocynthis (L.)* Schrad Fruit Extract on Gastric Adenocarcinoma and Breast Cancer Cell Lines. *Int J Pharm Sci Rev Res* 2017; 45(1): 175-178.
 26. Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, et al. Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2000; 60(18): 5165-5170.
 27. Eroğlu C, Seçme M, Bağcı G, Dodurga Y. Assessment of the anticancer mechanism of ferulic acid via cell cycle and apoptotic pathways in human prostate cancer cell lines. *Tumor Biology* 2015; 36(12): 9437-9446.
 28. Meiyanto E, Putri D, Susidarti RA, Murwanti R, Sardjiman FA, Husnaa U, et al. Curcumin and its analogues (PGV-0 and PGV-1) enhance sensitivity of resistant MCF-7 cells to doxorubicin through inhibition of HER2 and NF-κB activation. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(1): 179-184.
 29. Davoudi Z, Akbarzadeh A, Rahmatiyamchi M, Movassaghpour AA, Alipour M, Nejati-Koshki K, et al. Molecular target therapy of AKT and NF-κB signaling pathways and multidrug resistance by specific cell penetrating inhibitor peptides in HL-60 cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(10): 4353-4358.
 30. Leitzmann MF, Rohrmann S. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol* 2012; 4: 1-11.
 31. Kirkegaard T, Witton CJ, Edwards J, Nielsen KV, Jensen LB, Campbell FM, et al. Molecular alterations in AKT1, AKT2 and AKT3 detected in breast and prostatic cancer by FISH. *Histopathology* 2010; 56(2): 203-211.