IranJPP
Iranian Journal of
Physiology and Pharmacology

مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران
سال ۱۴۰۳، دوره ۸، پیاپی ۱۸، صفحه ۲۸۱-۲۷۰

مقاله پژوهشی

بررسی اثرات هم‌افزایی آنتی اکسیدانی و سمیت سلولی سیلیمارین و الاژیک اسید بر رده سلولی سرطان پستان

مینا قویدل مرغزاری[۱]، فاطمه ولی‌نژاد ثانی[۲]، داود ضعیفی[۱]، شهرام اسلامی[۳]، بهمن شریف‌زاده[۴]، فاطمه غیبی[۱*]، خدیجه جامی‌الاحمدی[۵*]

۱. گروه زیست‌فناوری و نانوفناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۲. گروه علوم آزمایشگاهی دانشکده علوم پیراپزشکی و توانبخشی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران
۳. گروه شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. گروه علوم مهندسی، دانشکده فنی و مهندسی-گیلان شرق، دانشگاه گیلان، رودسر، گیلان، ایران
۵. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، پژوهشکده فناوریهای نوین داروئی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

دریافت: ۲ آبان ۱۴۰۳ پذیرش: ۲۶ اسفند ۱۴۰۳

چکیده

زمینه و هدف: پلی فنول‌های گیاهی منابع طبیعی آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که به پیشگیری از بیماری‌های متعدد از جمله سرطان کمک می‌کنند. سیلیمارین (SLM) و الاژیک‌اسید (ELG) دو پلی فنول طبیعی هستند که در مطالعه حاضر برای اولین بار، اثرات سیتوتوکسیک و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌تنهایی و در ترکیب با یکدیگر در سلول‌های سرطانی پستان بررسی گردید.

روش‌ها: سمیت سلولی سیلیمارین و الاژیک‌اسید به تنهایی و یا به صورت ترکیبی در رده سلولی سرطان پستان 4T1 با روش MTT بررسی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌تنهایی یا در ترکیب با یکدیگر نیز با استفاده از آزمون‌های سنجش قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) و ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی به روش رادیکال DPPH مورد سنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: الاژیک‌اسید سبب کاهش رشد بیشتری نسبت به سیلیمارین در سلول‌ها گردید. استفاده توام از سیلیمارین و الاژیک اسید تأثیر بهتری در کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی نسبت به استفاده از هر کدام به‌تنهایی داشت. در سنجش FRAP، سیلیمارین نسبت به الاژیک‌اسید و در سنجش DPPH الاژیک اسید نسبت به سیلیمارین عملکرد بهتر ولی فاقد اختلاف معنادار نشان دادند. ترکیب این دو ماده موجب افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی در تست FRAP و DPPH شد، به‌ویژه به ترتیب در نسبت‌های مولی ($p < ۰/۰۰۱$) ۸:۱ و ($p < ۰/۰۵$) ۴:۱ و ۵۰: ۶/۲۵ و۵۰: ۱۲/۵ SLM:ELG که اثرات مهاری هم‌افزایی قابل توجهی را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج بر اثرات سمیت سلولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین و الاژیک اسید در رده سلولی سرطان پستان تاکید می‌کند. همچنین کاربرد توأم این دو ترکیب منجر به اثر هم‌افزایی قابل توجهی شده و می‌تواند به عنوان کاندیدی امیدوارکننده در مطالعات مربوط به سرطان پستان موردتوجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: آنتی اکسیدان، الاژیک‌اسید، درمان ترکیبی، سرطان پستان، سیلیمارین

مقدمه

سرطان پستان از معمول‌ترین بدخیمی‌ها در زنان است که حدودا ۳۳ درصد از کل بدخیمی‌های آن‌ها را شامل می‌شود و پیش‌بینی می‌شود تا سال ۲۰۵۰، تعداد موارد جدید سرطان پستان در زنان در سراسر جهان به ۳/۲ میلیون مورد جدید در

* نویسندگان مسئول مکاتبات: GheybiF@mums.ac.ir (ORCID: 0000-0001-9209-251X)
JamialahmadiKh@mums.ac.ir (ORCID: 0000-0003-2173-003X)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

هر ۱۲ ماه افزایش یابد [۲، ۱]. اگر چه میزان وقوع این بیماری در ایران نسبت به کشورهای پیشرفته بسیار کمتر است، ولی متأسفانه روند رو به افزایشی را نشان می‌دهد و همچنین سن ابتلا به این سرطان در ایران نسبت به میانگین جهانی کمتر است [۳]. با توجه به عدم کارایی مطلوب، اثرات جانبی متعدد و مشکلات ناشی از درمان‌های مرسوم برای بیماران، تلاش برای یافتن داروهای موثرتر با سمیت و اثرات جانبی کمتر ضروری به‌نظر می‌رسد. اطلاعات گسترده‌ای وجود دارد که نشان می‌دهد آسیب اکسیداتیو و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] به‌طورقابل‌توجهی در آسیب به DNA و بروز جهش‌های ژنتیکی نقش داشته و به‌عنوان عوامل موثر در توسعه و پیشرفت سرطان شناخته می‌شوند. مکانیسم‌های متعددی در بدن انسان برای مقابله با اثرات مخرب این عوامل وجود دارد، ازجمله آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز (SOD)[2]، گلوتاتیون پراکسیداز (GPx)[3] و کاتالاز (CAT)[4] [۴].

گیاهان دارویی یکی از منابع اصلی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی می‌باشند که در دهه‌های اخیر به‌عنوان یکی از منابع مهم تهیه داروهای طبیعی ضدسرطان مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. پلی‌فنول‌های طبیعی، متابولیت‌های ثانویه گیاهی ارزشمندی هستند که اثرات سودمند آن‌ها در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله سرطان نشان داده شده است. پلی‌فنول‌ها، توانایی تأثیرگذاری بر مسیرهای سیگنال‌دهی متعدد مرتبط با رشد سلول‌های سرطان، متاستاز تومور، التهاب، رگزایی و مقاومت در برابر داروها و تشعشعات را دارند. این ترکیبات طبیعی بخصوص قابلیت خود را به‌عنوان ترکیبات کاهش‌دهنده استرس اکسیداتیو و القاکننده آپوپتوز در سلول‌های توموری نشان داده‌اند [۶، ۵]. سیلیمارین یک فلاوونوئید پلی‌فنلیک می‌باشد که از دانه گیاه خار مریم[5] استخراج می‌شود و حدود نود درصد آن را ترکیبی به نام سیلیبینین به خود اختصاص داده است. این گیاه رویش جهانی داشته و بومی ایران نیز می‌باشد. سیلیمارین قرن‌ها به‌عنوان یک درمان طبیعی برای بیماری‌های کبدی مورد استفاده قرار گرفته است [۷]. این ترکیب پلی فنولی تاثیرات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی مختلفی از جمله ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی، محافظت‌کننده کبد، و تعدیل‌کننده ایمنی دارد. همچنین سیلیمارین و مشتقات آن اثرات قابل‌توجهی در مهار انواع مختلف تومورها از جمله سرطان پستان دارند که فعالیت خود را از طریق مکانیسم‌های مختلف اعمال می‌کنند [۸]. سیلیمارین می‌تواند با القای آپوپتوز، توقف چرخه سلولی، مهار رگزایی و تنظیم پاسخ‌های ایمنی علیه سلولهای توموری اثرات ضدسرطانی خود را پیش برد. همچنین سیلیمارین دارای اثرات تعدیل‌کننده بر روی چندین مسیر سیگنالینگ سلولی مرتبط با سرطان، ازجمله MAPK، PI3K/Akt، Wnt/β-Catenin، STAT3 و NF-kB می‌باشد [۹]. الاژیک‌اسید ترکیب فلاونوئیدی دیگری است که در نتیجه هیدرولیز الاژیتانین تولید می‌شود و در میوه‌ها، مغزها و سبزیجات متعدد یافت می‌شود. فعالیتهای بیولوژیک و خواص مفید متنوعی برای الاژیک‌اسید در نظر گرفته شده است از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی و قدرت بالا در جمع‌آوری رادیکال‌های آزاد، ضدالتهابی، ضدمیکروبی و ضدویروسی؛ همچنین الاژیک‌اسید دارای اثر ضدسرطانی و مهار رشد تومور بوده که اثرات آن بر توقف چرخه سلولی و القای آپوپتوز در بسیاری از رده‌های سلول‌های سرطانی و مدل‌های حیوانی مطالعه و تایید شده است [۱۰]. فعالیت ضدسرطانی الاژیک‌اسید بر روی تومور پستان، اولین بار توسط سلیم و همکارانش در سال ۲۰۰۲ شناسایی شد. آن‌ها نشان دادند که ترکیبات فنلی اثر بازدارنده‌ای بر تکثیر و زنده مانی سلول و همچنین القای مرگ سلولی در رده‌های سلولی بدخیم متعدد دارند [۱۱].

بنابراین با توجه به اینکه اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدتکثیری برای سیلیمارین و الاژیک اسید به‌تنهایی گزارش شده است، این احتمال وجود دارد که اثرات هم‌افزایی در خصوص دو ترکیب وجود داشته باشد، لذا در تحقیق حاضر برای اولین بار اثرات هم‌افزایی در خصوص سمیت سلولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی در رده‌ی سلولی سرطان پستان 4T1 بررسی شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه با رعایت الزامات اخلاقی ملی و بین‌المللی، مصوب کمیته اخلاق در پژوهش‌های زیست پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد (IR.MUMS.MEDICAL.REC.1397.444) انجام شد.

[1] Reactive oxygen species
[2] Superoxide dismutase
[3] Glutathione peroxidase
[4] Catalase
[5] Silibum marianum

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

مواد

کلیه مواد و حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه از شرکت مرک آلمان خریداری شد. معرف‌های TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine) و نیز استانداردهایی نظیر سیلیمارین و الاژیک اسید از شرکت سیگما تهیه گردید.

فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی

عملکرد آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین و الاژیک‌اسید و ترکیب توأم آن‌ها، ازطریق سنجش قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP) و فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت.

توانایی احیا کنندگی آهن (FRAP)

توانایی احیاکنندگی آهن (FRAP) دو ترکیب بر اساس روش بنزی و استرین با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. برای تهیه محلول کاری FRAP (۳۰۰mM, pH ۳/۶)، ۲۵ میلی لیتر بافر استات، ۲/۵ میلی لیتر TPTZ (۱۰ میلی مولار) و ۲/۵ میلی لیتر $FeCl_3.6H_2O$ (۲۰ میلی مولار) با هم مخلوط گردید. دمای محلول قبل از استفاده به ۳۷ درجه سانتیگراد رسانده شد. در ادامه، غلظت‌های مختلف پلی فنل‌های گیاهی (سیلیمارین و الاژیک‌اسید با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ میکرومولار و غلظت ترکیبی از آن‌ها با نسبت برابر (۱:۱)) با ۱۵۰۰ میکرولیتر از محلول FRAP به‌مدت ۶ دقیقه در شرایط تاریک واکنش دادند. جذب نمونه‌ها با استفاده از کمپلکس‌تری پیریدیل تریازین آهنی در طول موج ۵۹۳ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اولترا اسپکت ۳۰۰۰ (مدل بیوتکنولوژی فارماسیا) انجام شد. همچنین نمودار استاندارد با استفاده از غلظت‌های ۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار $FeSO_4$ ترسیم شد. از اسید آسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد. تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد [۱۲].

فعالیت مهار رادیکال DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین و اسیدالاژیک با استفاده از روش DPPH مطابق با روش بلویس (۱۹۵۸) اندازه‌گیری شد [۱۲]. به طور خلاصه، محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول تهیه شد و ۸۰۰ میکرولیتر از این محلول به ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ میکرومولار بر لیتر سیلیمارین و الاژیک‌اسید و ترکیبی از آن‌ها به‌صورت ۱ به ۱ اضافه شد. مخلوط بلافاصله پس از افزودن DPPH تکان داده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار گرفت. بعد از این مدت، جذب محلول ها نسبت به شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV-Vis) خوانده شد و درصد مهار رادیکال آزاد[6] با کمک رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{DPPH S. A. (\%)} = (AC - AS/AC) \times ۱۰۰$$

که در آن AC جذب محلول کنترل (حاوی همه اجزای واکنشگر بدون نمونه) و AS جذب محلول حاوی نمونه است [۱۳]. در این آزمایش حلال متانول به‌عنوان شاهد برای صفرکردن دستگاه UV-Vis و محلول متانولی DPPH به عنوان نمونه بلانک مورد استفاده قرار گرفت. با رسم منحنی درصد DPPH S.A در مقابل غلظت‌های مختلف ترکیبات پلی‌فنلی، مقدار EC50 (غلظتی از ماده که می تواند ۵۰ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را خنثی کند) باتوجه به معادله خط حاصله تعیین گردید. اسیدآسکوربیک به‌عنوان کنترل مثبت انتخاب گردید. این آزمایش برای نمونه و استاندارد سه بار تکرار گردید [۱۳].

کشت سلولی

رده سلولی سرطان پستان موش (4T1) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شد. سلول‌ها در محیط RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium) همراه با ۱۰ درصد FBS (سرم جنین گاوی) و ۱ درصد پنی سیلین–استرپتومایسین در انکوباتور کشت سلولی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد دی اکسید کربن و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد.

آزمون MTT جهت سنجش سمیت سلولی

آزمون رنگ‌سنجی MTT به‌منظور بررسی تأثیر سیلیمارین و الاژیک‌اسید به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی بر روی تکثیر سلول‌های 4T1 استفاده شد. جهت انجام این تست، ابتدا ۳×۱۰^۳ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد

[6] DPPH Scavenging Activity percent

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسید کربن انکوبه شد. سپس، سلول‌های کشت‌شده با غلظت‌های مختلف سیلیمارین (۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میکرومولار بر لیتر)، الاژیک‌اسید (۰/۵۰، ۱، ۲/۰۳، ۴/۰۶، ۸/۲۵، ۱۶ میکرومولار بر لیتر) و ترکیب توام آن‌ها برای مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، MTT در غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۴ ساعت در تاریکی انکوبه شدند. سپس محتویات چاهک‌ها تخلیه شد و مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethyl sulfoxide) به چاهک‌ها اضافه گردید و درنهایت میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ و ۶۳۰ نانومتر (مرجع) با استفاده از دستگاه خوانش الایزا مدل Epoch (Biotek) اندازه‌گیری شد و درصد بقای سلول‌ها نسبت به کنترل محاسبه گردید [۴]. معیار CI[7] با کمک نرم‌افزار کالکوسین[8] نسخه ۲/۱ (بیوسافت، کمبریج انگلستان) محاسبه و برای تعیین برهمکنش دو ترکیب استفاده شد. معیار CI < ۱ نشان‌دهنده اثر سینرژیستی و CI > ۱ نشان‌دهنده اثر آنتاگونیستی دو ترکیب می‌باشد [۶].

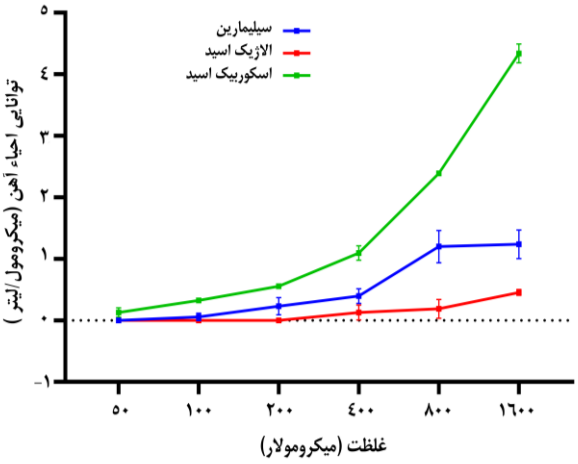
تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایشات در این تحقیق حداقل سه بار تکرار شدند و نتایج به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید. جهت آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار پریسم[9] و از روش آماری واریانس یک‌طرفه استفاده شد و p کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌داری در نظر گرفته شد. برای آنالیز برهمکنش دارویی از نرم افزار کامپوسین[10] استفاده شد. همچنین به‌منظور رسم نمودار از نرم‌افزار کالکوسین و پریسم استفاده شد.

یافته‌ها

ارزیابی قدرت احیاءکنندگی آهن توسط سیلیمارین و الاژیک‌اسید

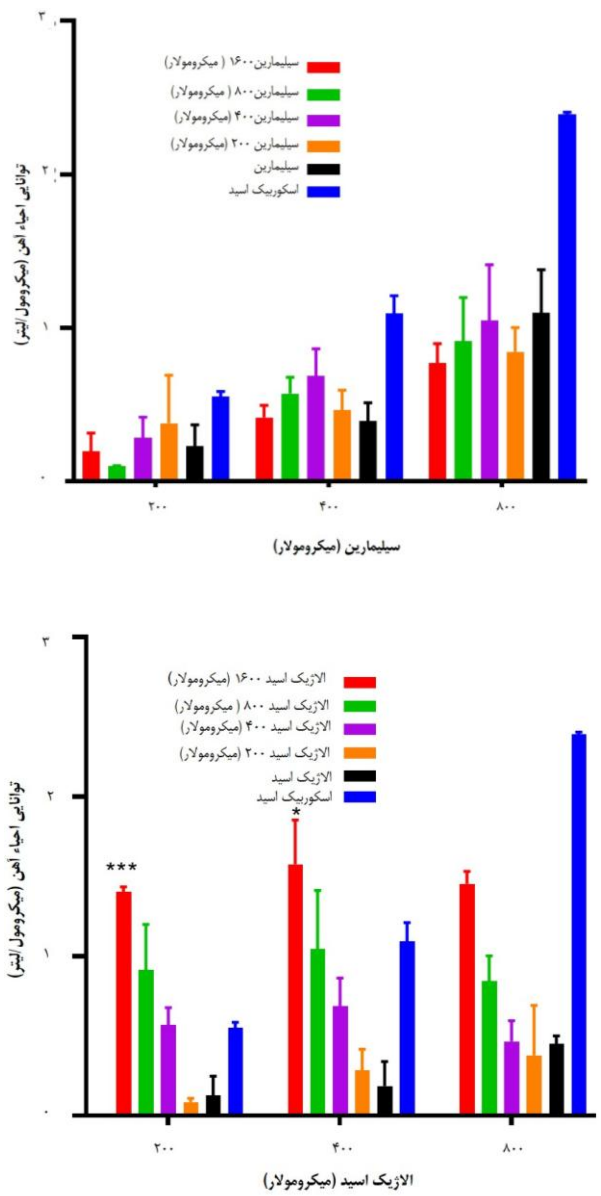
نتایج حاصل از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیلیمارین و الاژیک‌اسید به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی با روش FRAP در نمودارهای ۱ و ۲ نمایش داده شده است. توان احیاءکنندگی، قدرت الکترون‌دهی ترکیب آنتی‌اکسیدان را نشان می‌دهد. همانطور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت هر یک از سه ترکیب سیلیمارین، الاژیک‌اسید و اسکوربیک‌اسید، قدرت احیاکنندگی آن‌ها نیز افزایش می‌یابد؛ اگرچه در غلظت‌های مولی برابر، سیلیمارین نسبت به الاژیک‌اسید قدرت احیاکنندگی بیشتری نشان می‌دهد و قدرت احیاکنندگی اسکوربیک اسید نیز نسبت به دو ترکیب دیگر بیشتر می‌باشد (نمودار ۲). نتایج مربوط به ارزیابی توانایی احیاء آهن ترکیب همزمان هر دو ماده الاژیک‌اسید و سیلیمارین در نمودارهای ۲الف و ۲ب نشان داده شده است. یافته‌های بدست‌آمده حاکی از آن است که اضافه‌کردن مقادیر مختلف سیلیمارین و الاژیک‌اسید به هم در نسبت‌های مولی ($p < ۰/۰۰۱$) ۸:۱ و ($p < ۰/۰۵$) ۴:۱ از سیلیمارین و الاژیک‌اسید موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها نسبت به فعالیت هر ماده به تنهایی و همچنین اسکوربیک‌اسید می شود.



نمودار ۱– توانایی احیاء آهن توسط سیلیمارین و الاژیک‌اسید در مقایسه با اسیداسکوربیک به‌عنوان نمونه استاندارد. با افزایش غلظت هر یک از سه ترکیب سیلیمارین، الاژیک‌اسید و اسکوربیک‌اسید قدرت احیاکنندگی آن‌ها افزایش می‌یابد. همچنین در غلظت‌های برابر قدرت احیاءکنندگی اسکوربیک‌اسید از سیلیمارین و الاژیک‌اسید بیشتر است. سه آزمایش مستقل در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شده است.

[7] Combination Index
[8] Calcusyn
[9] Prism
[10] Compusyn

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]



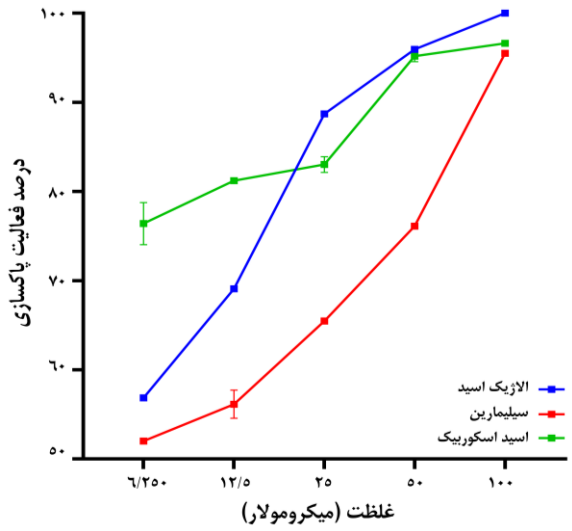
نمودار ۲– توانایی احیاء آهن توسط ترکیب همزمان غلظت‌های مختلف سیلیمارین و الاژیک‌اسید در مقایسه با اسیداسکوربیک به‌عنوان نمونه استاندارد (*$p < ۰/۰۵$ و ***$p < ۰/۰۰۱$). سه آزمایش مستقل در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شده است.

توانایی حذف رادیکال DPPH توسط سیلیمارین و الاژیک‌اسید

نتایج حاصل از بررسی فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد DPPH توسط سیلیمارین و الاژیک‌اسید به‌تنهایی و به‌صورت ترکیبی در نمودار ۳ نشان داده شده است. DPPH یک رادیکال پایدار است که به‌طور گسترده برای بررسی توانایی به دام‌اندازی رادیکال آزاد توسط ترکیبات مختلف استفاده می‌شود. نتایج فعالیت پاکسازی رادیکال هر سه آنتی‌اکسیدان به‌تنهایی نشان می‌دهد که اگرچه اسید اسکوربیک (غلظت‌های ۵۰۰ و ۲۵۰ میکرومولار) در غلظت‌های پایین فعالیت پاکسازی بالاتری دارد، اما هر سه آنتی‌اکسیدان در غلظت‌های بالاتر اثرات مشابهی دارند (نمودار ۴). نتایج حاصل از ترکیب همزمان دو آنتی‌اکسیدان الاژیک‌اسید و سیلیمارین نشان‌دهنده فعالیت حذف رادیکال DPPH به‌صورت هم‌افزایی فقط در نسبت‌های مولی خاص سیلیمارین و الاژیک‌اسید (۵۰: ۶/۲۵ و ۵۰: ۱۲/۵ SLM:ELG) می‌باشد که این میزان فعالیت نسبت به اسیداسکوربیک در غلظت مشابه بالاتر بود اما در تمامی نسبت‌های مولی دیگر از ترکیب همزمان سیلیمارین و الاژیک‌اسید، فعالیت حذف رادیکال آزاد کمتر از اسیداسکوربیک بود (نمودار ۴).

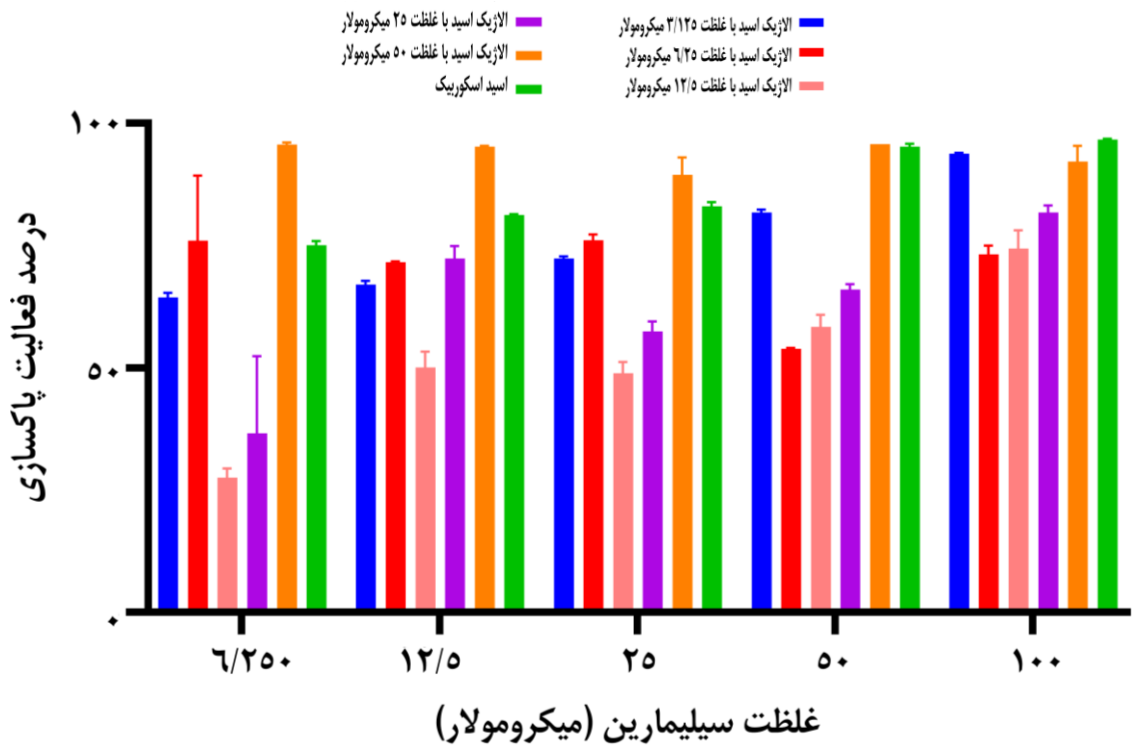
سمیت سلولی

تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان می‌دهد که الاژیک اسید به‌تنهایی در مقایسه با سیلیمارین، بطور قابل‌توجهی سمیت سلولی بیشتری را در سلول های 4T1 نشان می دهد (جدول ۱ و نمودار ۵الف). همچنین نتایج حاکی از افزایش سمیت سلولی



نمودار ۳– فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد DPPH توسط سیلیمارین، الاژیک‌اسید و همچنین اسیداسکوربیک بعنوان نمونه استاندارد. در غلظت‌های پایین اسیداسکوربیک نسبت به سیلیمارین و الاژیک‌اسید فعالیت بالاتری در پاکسازی رادیکال آزاد DPPH نشان می‌دهد. سه آزمایش مستقل در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شده است.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]



نمودار ۴– فعالیت پاکسازی رادیکال آزاد DPPH توسط ترکیب همزمان غلظت‌های مختلف سیلیمارین و الاژیک‌اسید در مقایسه با اسیداسکوربیک به‌عنوان نمونه استاندارد. سه آزمایش مستقل در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شده است.

سیلیمارین با افزایش زمان تیمار است (کاهش IC_{50} از ۱۷۴/۱ میکرومولار در ۲۴ ساعت به ۷۶/۶۷ میکرومولار در ۷۲ ساعت)، که این امر نشان می‌دهد که اثر سیلیمارین به زمان وابسته است. اما الاژیک‌اسید سمیت سلولی بسیار بیشتری نسبت به سیلیمارین در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان می‌دهد. همچنین، سمیت اسیدالاژیک نیز با گذشت زمان به شدت افزایش می‌یابد (IC_{50} از ۸۵/۷ میکرومولار در ۲۴ ساعت به ۵/۴۱ میکرومولار در ۷۲ ساعت کاهش می‌یابد). در فرم سینرژی با نسبت ۱۶:۱۰ از سیلیمارین: الاژیک‌اسید، هر دو ماده به‌خصوص در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، سمیت سلولی بیشتری نسبت به حالت منفرد نشان می‌دهند. شاخص ترکیبی نشان می‌دهد که در ۲۴ ساعت اثر آنتاگونیستی ضعیف (CI = ۱/۱)، در ۴۸ ساعت اثر تقریباً افزودنی (CI = ۰/۸۳) و در ۷۲ ساعت اثر هم‌افزایی قوی (CI = ۰/۰۲) وجود دارد که بیانگر افزایش اثر هم‌افزایی بین دو ماده بوده و در ۷۲ ساعت به اوج خود می‌رسد. همچنین بررسی آماری نشان داد که در ۲۴ ساعت، اثر سیلیمارین و اسیدالاژیک در حالت ترکیبی به‌طور معنی‌داری بیشتر از سیلیمارین به‌تنهایی است ($p < ۰/۰۱$). با گذشت ۴۸ ساعت، این تفاوت معنادارتر شد ($p < ۰/۰۰۱$) و در ۷۲ ساعت نیز بطور معنادار باقی ماند ($p < ۰/۰۱$). در فرم سینرژی با نسبت ۸:۱۰ نیز هر دو ماده سمیت سلولی بیشتری در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت نسبت به حالت منفرد نشان می‌دهند. شاخص ترکیبی نشان می‌دهد که در هر سه زمان اثر هم‌افزایی وجود دارد (CI < ۱). بیشترین اثر هم‌افزایی در ۴۸ ساعت (CI = ۰/۵۴) و ۷۲ ساعت (CI = ۰/۳۷) مشاهده می‌شود. بررسی آماری این هم‌افزایی نشان داد که اثر سیلیمارین در حالت ترکیبی با الاژیک اسید (نسبت ۸:۱۰) در ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت به‌طور معنی‌داری بیشتر از سیلیمارین به‌تنهایی است ($p < ۰/۰۰۱$) (تصویر ۵ب).

بحث

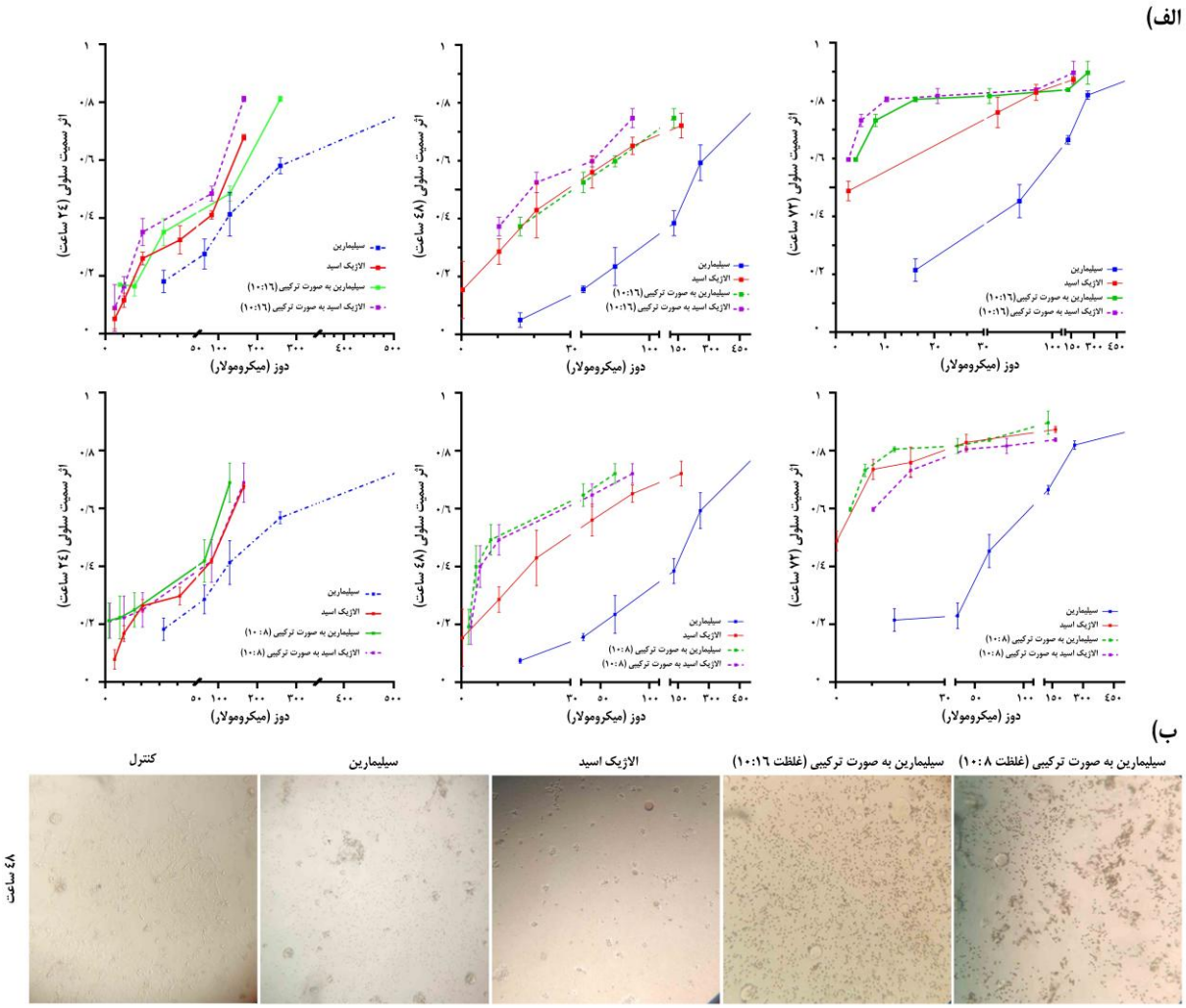
در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهی به‌دلیل عوارض جانبی کم، اثرات بیولوژیکی گوناگون و تاثیرات امید بخش در درمان بیماری‌ها به‌ویژه سرطان مورد توجه قرار گرفته و مطالعات بسیاری جهت کشف ترکیبات طبیعی جدید و بررسی

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

جدول ۱– مقادیر IC_{50} و شاخص های ترکیبی (CI) سمیت سلولی سیلیمارین و اسید الاژیک بر روی سلول های 4T1

نوع دارو		غلظت مهارکننده نیمی حداکثر (میکرومولار)		
		۲۴ ساعت	۴۸ ساعت	۷۲ ساعت
سیلیمارین		۱۷۴/۱ ± ۱۹/۸۸**	۱۷۲/۵۹ ± ۲۰/۴۲***	۷۶/۶۷ ± ۱۳/۳۸**,***
الاژیک‌اسید		۸۵/۷ ± ۳/۶۲**	۳۵/۲۴ ± ۱۸/۹	۵/۴۱ ± ۴/۱۴
سیلیمارین:الاژیک‌اسید (۱۰:۱۶)	سیلیمارین	۸۵/۲ ± ۱۶/۹۸**	۳۲/۰۲ ± ۱/۸۵***	۰/۳ ± ۰/۰۲**
	الاژیک‌اسید	۵۳/۲ ± ۱۰/۶۱**	۳۲/۰۲ ± ۱/۱۶	۰/۶ ± ۰/۰۷
	شاخص ترکیبی (CI)	۱/۱ ± ۰/۰۹	۰/۸۳ ± ۰/۰۵	۰/۰۲ ± ۰/۰۰۱
سیلیمارین:الاژیک‌اسید (۱۰:۸)	سیلیمارین	۱۱۴/۱۲ ± ۶۴	۱۱/۷ ± ۳/۳۱***	۰/۸۸ ± ۰/۰۶***
	الاژیک‌اسید	۱۴۷/۶۵ ± ۸۰/۰۴	۱۴/۶۲ ± ۴/۱۴	۱/۱ ± ۰/۷۴
	شاخص ترکیبی (CI)	۰/۹۵ ± ۰/۵۵	۰/۵۴ ± ۰/۱۵	۰/۳۷ ± ۰/۲۵

IC_{50} و شاخص‌های ترکیبی سیلیمارین و الاژیک‌اسید و ترکیبی آن‌ها در سلول‌های 4T1 پس از ۲۴، ۴۷ و ۷۲ ساعت انکوباسیون با استفاده از روش MTT اندازه‌گیری شد. سه آزمایش مستقل در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD ارائه شد ($p < ۰/۰۱$** و $p < ۰/۰۰۱$***).



نمودار ۵– اثر سمیت سلولی سیلیمارین و اسیدالاژیک و ترکیب همزمان آن‌ها بر روی سلول‌های سرطان پستان 4T1. الف) نمودار غلظتی پس از تیمار در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. سه آزمایش مستقل در سه تکرار انجام شد و داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD نشان داده شده است. ب) تصاویر حاصل از اثر هم افزایی سیلیمارین و الاژیک‌اسید پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

اثرات و مکانیسم‌های ضدسرطانی آن‌ها صورت گرفته است [۶]. پلی‌فنول‌های گیاهی منابع طبیعی از انواع آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که در جلوگیری از بسیاری بیماری‌ها از جمله سرطان نقش دارند. این ترکیبات بسیار متنوع هستند و اثرات بیولوژیک متفاوتی دارند. مطالعات مختلف نشان داده است که رژیم غذایی حاوی ترکیبات پلی‌فنولی، اثرات مثبتی در درمان و پیشگیری از سرطان دارد و ارتباط معکوس بین مصرف رژیم غذایی حاوی ترکیبات پلی‌فنولی گیاهی و خطر ابتلا به سرطان گزارش شده است [۱۴]. اخیرا به‌منظور بالابردن کارایی درمانی داروهای ضد سرطان و کاهش سمیت سیستمیک آن‌ها تلاش‌های زیادی در زمینه درمان‌های ترکیبی انجام شده است. تاثیرات هم‌افزایی استفاده از عوامل پیشگیری کننده طبیعی به‌عنوان کاندیداهای احتمالی که دارای مکانیزم عمل متفاوتی بوده و سمیت کمی دارند در ترکیب با داروهای سایتوتوکسیک، مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۴].

در مطالعه‌ی حاضر برای اولین بار اثرات کاربرد توأم سیلیمارین همراه با الاژیک‌اسید بر توانایی تکثیر سلول‌های سرطان پستان 4T1، قدرت احیاءکنندگی آهن و همچنین توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. بررسی توانایی زیستی سلول‌های سرطانی4T1 نشان داد که سیلیمارین و الاژیک‌اسید زنده‌مانی سلول‌های سرطانی را به‌صورت وابسته به غلظت کاهش می‌دهند. همچنین مقادیر IC_{50} در تست سمیت ۴۸ ساعته برای سیلیمارین و الاژیک‌اسید نشان‌دهنده اثرات سمیت سلولی قویتر الاژیک‌اسید نسبت به سیلیمارین است. بهترین نتیجه زمانی به دست آمد که از کاربرد توأم سیلیمارین و الاژیک‌اسید جهت تیمار سلول‌ها استفاده شد؛ به اینصورت که در نسبت‌های مولی SLM: ELG از ۱۰:۱۶ و ۸ : ۱۰ اثر هم‌افزایی در سمیت سلولی این دو ترکیب مشاهده شد و مقدار IC_{50} برای سیلیمارین و الاژیک‌اسید در حالت ترکیب نسبت به هر کدام به تنهایی بسیار کاهش پیدا کرد. تاکنون مطالعات مختلفی در رابطه با تأثیر پلی فنل‌های گیاهی از جمله سیلیمارین و الاژیک‌اسید بر القای سمیت سلولی بر سلول‌های سرطانی صورت گرفته است. تحقیقات نشان داده‌اند که سیلیمارین تأثیرات مثبتی در درمان سرطان پستان دارد. غیبی و همکاران در سال ۲۰۱۹ اشاره کردند که ترکیب سیلیمارین و دوکسوروبیسین در غلظت‌های پایین‌تر می‌تواند فعالیت ضدتوموری بیشتری را در سرطان پستان بروز دهد. به‌طورکلی، شواهد تحقیقات پیشین نشان می‌دهد که سیلیمارین و مشتقات آن دارای پتانسیل پیشگیری در سرطان پستان هستند [۱۵].

مکانیسم‌های متعددی برای اثرات ضدتوموری سیلیمارین پیشنهاد شده است از جمله مهار فاکتورهای پیش‌برنده تکثیر سلولی، مهار پروتئین‌های ضدآپپتوز و فاکتورهای رشد، القای عوامل سرکوب‌کننده تومور، اختلال در انتقال پیام‌های سلولی، مهار اثر التهابی و نیز تنظیم چرخه سلولی و تحریک فعالیت آنتی‌اکسیدانی [۱۶]. علاوه‌براین، شواهد متعددی مبنی بر اثرات ضدتوموری الاژیک‌اسید در شمار زیادی از سرطان‌ها منتشر شده است. این ترکیب گیاهی با سرکوب تکثیر سلول‌های تومور، القای آپوپتوز، اثرات ضدالتهابی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، جلوگیری از رگزایی و فرآیندهای مقاومت دارویی، رشد و متاستاز تومور را مهار می‌کند. فعالیت ضدتوموری الاژیک‌اسید در ابتدا در سرطان سینه یافت شد و متعاقباً نشان داده شد که این پلی‌فنل دارای اثرات درمانی بر روی سایر سرطان‌ها نظیر کولون، پروستات و سرطان پانکراس است [۱۷]. مطالعه شن[11] و همکاران نشان داد که در سلول‌های سرطان پستان (MCF-7) تحت درمان با الاژیک‌اسید، سطح سیکلین‌ها (سیکلین A2 و سیکلین E2) کاهش یافته در حالی که مهارکننده‌های کیناز وابسته به سیکلین (Cdk)[12] مانند p21Cip1، p15 و p19 افزایش نشان دادند. این یافته‌ها نشان می‌دهد که الاژیک‌اسید می‌تواند رشد سلول‌های سرطانی پستان را از طریق توقف چرخه سلولی و مهار تکثیر سلولی متوقف کند [۱۸]. نتایج مطالعه حاضر موید یافته‌های مطالعات گذشته بر روی اثرات سمی این ترکیب است. اخیرا وانلا[13] و همکاران گزارش دادند که الاژیک‌اسید فعالیت‌های ضدرگزایی قوی از طریق هدف قراردادن خاص VEGFR-2 و مسیر سیگنال‌دهی آن در سرطان پستان دارد [۱۹]. در بررسی متون نتایج مشابهی برای بررسی اثرات سمیت سلولی کاربرد توام سیلیمارین و الاژیک‌اسید بدست نیامد تا بتوان به آن‌ها مراجعه کرد، اما مطالعات مشابه دیگری وجود دارد که بر روی سایر مواد موثره گیاهی و پلی فنل‌های مورد مطالعه صورت گرفته که به‌عنوان نمونه میتوان به تحقیقات زیر اشاره نمود.

در سال ۲۰۱۴ شریعت‌زاده و همکاران، به بررسی اثر سمیت

[11] Chen
[12] Cyclin-dependent kinase
[13] Vanella

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

سلولی سیلیمارین به‌تنهایی و در ترکیب با داروی شیمی درمانی تاکسول بر رده سلولی4T1 پرداختند. نتایج نشان داد که سیلیمارین و تاکسول به‌صورت وابسته به دوز و زمان موجب کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی پستان موش شدند. در تیمار ترکیبی سیلیمارین توانست حساسیت سلول‌های4T1 به تاکسول را افزایش دهد [۲۰]. نتایج این مطالعه هم راستا با نتایج مطالعه حاضر میباشد و نشاندهنده اثرات سیتوتوکسیک قوی‌تر فرآورده‌های گیاهی در ترکیب توام با داروهای شیمی درمانی و یا سایر ترکیبات گیاهی در برابر رده‌های سلولی مختلف سرطانی است [۲۰]. به‌عنوان‌مثال درخصوص اثرات هم‌افزایی و ضدافزایی سیلیمارین بر دوکسوروبیسین و دیگر داروهای سیتوتوکسیک، برخی مطالعات نشان می‌دهند که این تأثیر تا حدی به نقش مهاری سیلیمارین در حمل و نقل فعال داروها ازطریق ترانسپورترهای غشای سلولی مرتبط است [۲۱]. مطالعه گل محمدی و همکارانش در سال ۲۰۲۳ نشان داد که مصرف توام پاکلی تاکسل و الاژیک‌اسید در مدل تجربی سرطان سینه در مهار رشد تومور و متاستاز در این سرطان نتایج امیدوارکننده‌ای به همراه داشت [۲۲]. اثرات هم افزایی مشاهده شده در مورد مواد موثره گیاهی را می توان به مکانیسمهای اثر متفاوت ضد سرطانی، اهداف مولکولی مختلف این ترکیبات مانند پروتئین‌های آپوپتوز و ضدآپپتوزی، پروتئین کینازها، عوامل رشد و رونوشت‌برداری مختلف و پروتئین‌های چرخه سلولی و همچنین تداخل با مسیرهای چندگانه پیام‌رسانی سلولی نسبت داد. این تفاوت در تداخل در مسیرهای مختلف سلولی می‌تواند منجر به اثرات متمایز بر رفتار سلول‌های سرطانی شود و درحقیقت ازطریق مسیرهای متعدد متفاوت باعث مرگ سلول‌های سرطانی شوند. درک این تفاوت‌ها ممکن است به توسعه درمان‌های ترکیبی و بهینه‌سازی استفاده از این ترکیبات در درمان سرطان کمک کند [۲۳]. یکی از مکانیسم‌های کلیدی مسئول اثرات سایتوتوکسیک ناشی از سیلیمارین و الاژیک‌اسید، استرس‌های اکسیداتیو می‌باشد که یک ناهماهنگی درون‌سلولی در نتیجه افزایش گونه‌های فعال اکسیژن و کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها بوجود می‌آورد. استرس اکسیداتیو می‌تواند موجب آسیب DNA و بروز جهش‌هایی شود که در نهایت به بروز سرطان و سایر بیماری‌ها منجر می‌گردد [۲۴]. تحقیقات جواد شریفی‌راد و همکارانش در سال ۲۰۲۲ نشان داد که الاژیک‌اسید به‌طور قابل‌توجهی مقدار ۸–اکسو–۲–دی اکسوگوانوزین[14] تولید شده پس از آسیب اکسیداتیو DNA را کاهش می‌دهد، که این موضوع با توانایی الاژیک اسید در اتصال به DNA ارتباط نزدیکی دارد و احتمالاً مکانیزم محافظتی آن در برابر رادیکال‌های آزاد را تایید می‌کند [۲۵]. نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی دو پلی فنل با روش DPPH حاکی از اثر هم‌افزایی آن‌ها در کاربرد همزمان سیلیمارین و الاژیک‌اسید در نسبتهای مولی خاصی بود که در آن سیلیمارین دارای غلظت بسیار کمتری نسبت به الاژیک اسید می‌باشد. به عبارت دیگر وجود مقادیر کمی از سیلیمارین در حضور الاژیک‌اسید می‌تواند خاصیت حذف رادیکال‌های آزاد را افزایش دهد. برخلاف این نتایج، در بررسی فعالیت احیاءکنندگی آهن، غلظت‌های مختلف ترکیبی الاژیک اسید و سیلیمارین در نسبتهای مولی که در آن سیلیمارین دارای غلظت بیشتری نسبت به الاژیک اسید است موجب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی آنها نسبت به فعالیت هر ماده به تنهایی گردید. در برخی موارد، اثر ترکیبی دو آنتی‌اکسیدانت ممکن است ناشی از حاصل جمع اثر هر کدام از آن‌ها با دیگری باشد. اینحالت زمانی اتفاق می افتد که هر دو ترکیب به‌طور موثر رادیکال‌های آزاد را خنثی می‌کنند بدون اینکه اثر قابل‌توجهی بر فعالیت یکدیگر داشته باشند. به این حالت اثر افزایشی[15] می‌گویند. در بعضی مواقع نیز استفاده همزمان دو ترکیب موجب افزایش قابلیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌شود یا به عبارتی اثر یکدیگر را تشدید میکنند که به آن اثر هم‌افزایی[16] می‌گویند [۲۱]. این امر می‌تواند ازطریق مکانیسم‌های مختلفی رخ دهد، به‌عنوان‌مثال وقتی یک ترکیب موجب بازسازی فرم فعال دیگری می‌شود، یا هر دو ترکیب، به‌طور همزمان گونه‌های واکنش‌گر مختلف را هدف قرار می‌دهند.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاربرد توام، در نسبت مولی سیلیمارین به الاژیک‌اسید برابر با ۱۰:۱۶ (CI = ۰/۸۳) و در ۸ : ۱۰ (CI = ۰/۵۴)، تکثیر سلول‌های سرطانی پستان رده 4T1 را به‌طور قابل‌توجهی مهار نموده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی

[14] 8-oxo-2-deoxyguanosine
[15] Additive effect
[16] Synergistic effect

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

قوی‌تری نسبت به هر ماده موثره به تنهایی دارد. برای تأیید کاربرد این ترکیبات گیاهی در مطالعات مربوط به درمان سرطان پستان، تحقیقات بیشتر و تکمیلی مورد نیاز است.

سپاسگزاری

بدینوسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد جهت تأمین مالی این تحقیق تشکر و قدردانی میگردد.

ملاحظات مالی

این پژوهش با حمایت مالی معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد (کد طرح ۹۶۱۲۸۳).

تعارض در منافع

نویسندگان هیچ گونه تعارض در منافع ندارند.

نقش نویسندگان

خ.ج و ف.غ. : ایده، طراحی و نظارت بر مطالعه، بازنگری مقاله ؛ م.ق.م: انجام مطالعه ، تجزیه و تحلیل داده ها و نگارش ؛ ف.و.ث: نگارش پیش نویس اصلی ؛ د.ض. و ب. ش. و ش.ا : نگارش مقاله.

فهرست منابع

[1] Roshandel G, Ferlay J, Ghanbari-Motlagh A, et al. Cancer in Iran 2008 to 2025: Recent incidence trends and short-term predictions of the future burden. ***Int J Cancer*** 149 (2021) 594-605.

[2] Bray F, Laversanne M, Sung H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. ***CA Cancer J Clin*** 74 (2024) 229-263.

[3] Ghiasvand R, Adami H-O, Harirchi I, Akrami R,Zendehdel K, Higher incidence of premenopausal breast cancer in less developed countries; myth or truth? ***BMC cancer*** 14 (2014) 1-8.

[4] Gheybi F, Alavizadeh SH, Rezayat SM, Zendedel E,Jaafari M, Chemotherapeutic activity of Silymarin combined with doxorubicin liposomes in 4T1 breast cancer cells. ***Nanomed Res J*** 4 (2019) 29-34.

[5] Tang EL, Rajarajeswaran J, Fung SY, Kanthimathi M, Antioxidant activity of Coriandrum sativum and protection against DNA damage and cancer cell migration. ***BMC Complement Altern Med*** 13 (2013) 1-13.

[6] Khan MS, Qais FA, Ahmad I. Indian berries and their active compounds: Therapeutic potential in cancer prevention. In Khan MS, Ahmad I, Chattopadhyay D, eds, New look to phytomedicine: advancements in herbal products as novel drug leads. Academic Press, 2019: 179-201

[7] Gillessen A, Schmidt HH-J, Silymarin as supportive treatment in liver diseases: a narrative review. ***Adv Ther*** 37 (2020) 1279-1301.

[8] Kim SH, Choo GS, Yoo ES, Woo JS, Lee JH, Han SH, Jung SH, Kim HJ, Jung JY, Silymarin inhibits proliferation of human breast cancer cells via regulation of the MAPK signaling pathway and induction of apoptosis. ***Oncol Lett*** 21 (2021) 492.

[9] Wang Y, Yuan A-J, Wu Y-J, Wu L-M, Zhang L, Silymarin in cancer therapy: Mechanisms of action, protective roles in chemotherapy-induced toxicity, and nanoformulations. ***J Funct Foods*** 100 (2023) 105384.

[10] Tabrez S, Jabir NR, Adhami VM, Khan MI, Moulay M, Kamal MA, Mukhtar H, Nanoencapsulated dietary polyphenols for cancer prevention and treatment: successes and challenges. ***Nanomedicine*** 15 (2020) 1147-1162.

[11] Saleem A, Husheem M, Harkonen P, Pihlaja K, Inhibition of cancer cell growth by crude extract and the phenolics of Terminalia chebula retz. fruit. ***J Ethnopharmacol*** 81 (2002) 327-336.

[12] Azizian Shermeh O, Taherizadeh M, Valizadeh M, Zaboli A, Investigation of antioxidant and antimicrobial activities and phytochemical compounds of essential oil and different extracts of Cymbopogon olivieri (Boiss.) Bor. from Sistan and Baluchestan province. ***J Sabzevar Univ Med Sci*** 25 (2018) 279-292.

[13] Norani M, Crowford A, Tahamtani Y, Ebadi M, Ayyari M, Extraction and essential oils profiling of different Dorema ammoniacum D. Don. Organs and evaluation of antioxidant capacity. ***J Agr Sci Tech*** 25 (2023) 701-717.

[14] Pandey KB, Rizvi SI, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. ***Oxid Med Cell Longev*** 2 (2009) 270-278.

[15] Doagooyan M, Alavizadeh SH, Sahebkar A, Houshangi K, Khoddamipour Z, Gheybi F, Anti-tumor activity of silymarin nanoliposomes in combination with iron: In vitro and in vivo study. ***Int J Pharm-X*** 6 (2023) 100214.

[16] Boojar MMA, Boojar MMA, Golmohammad S, An overview of the anti-tumor effects of Silibinin. ***Razi J Med Sci*** 25 (2019) 116-129.

[17] Wang Y, Ren F, Li B, Song Z, Chen P, Ouyang L, Ellagic acid exerts antitumor effects via the PI3K signaling pathway in endometrial cancer. ***J Cancer*** 10 (2019) 3303.

[18] Chen H-S, Bai M-H, Zhang T, Li G-D, Liu M, Ellagic acid induces cell cycle arrest and apoptosis through TGF-

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

β/Smad3 signaling pathway in human breast cancer MCF-7 cells. ***Int J Oncol*** 46 (2015) 1730-1738.

[19] Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R, Barbagallo I, Li Volti G, Cardile V, Abraham NG, Sorrenti V, Effects of ellagic acid on angiogenic factors in prostate cancer cells. ***Cancers*** 5 (2013) 726-738.

[20] Shariatzadeh SMA, Hamta A, Soleimani M, Fallah Huseini H, Samavat S, The cytotoxic effects of silymarin on the 4T1 cell line derived from BALB/c mice mammary tumors. ***J Med Plant Res*** 13 (2014) 55-65.

[21] Singh M, Kadhim MM, Turki Jalil A, Oudah SK, Aminov Z, Alsaikhan F, Jawhar ZH, Ramírez-Coronel AA, Farhood B, A systematic review of the protective effects of silymarin/silibinin against doxorubicin-induced cardiotoxicity. ***Cancer Cell Int*** 23 (2023) 88.

[22] Golmohammadi M, Zamanian MY, Jalal SM, Noraldeen SAM, Ramírez-Coronel AA, Oudaha KH, Obaid RF, Almulla AF, Bazmandegan G,Kamiab Z, A comprehensive review on Ellagic acid in breast cancer treatment: From cellular effects to molecular mechanisms of action. ***Food Sci Nutr*** 11 (2023) 7458-7468.

[23] Mirjalili A, Bioactive compounds and their Mechanism in anticancer plants listed in flora of Iran. ***J. Complement. Med. Res.*** 8(2018) 2374-2413.

[24] Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M, Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer. ***Int J Mol Sci*** 16 (2014) 193-217.

[25] Takagi A, Sai K, Umemura T, Hasegawa R, Kurokawa Y, Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. ***Cancer Lett.*** 91 (1995) 139-44.

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]

Research paper

Investigating the synergistic cytotoxic and antioxidant effects of Silymarin and Ellagic Acid on a breast cancer cell line

Mina Ghavidel Marghzari[1], Fatemeh Valinezhad Sani[2], Davood Zaeifi[1], Shahram Eslami[3], Bahman Sharifzadeh[4], Fatemeh Gheybi[1*], Khadijeh Jamialahmadi[5*]

1. *Department of Medical Biotechnology and Nanotechnology, Faculty of Medicine, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
2. *Department of Laboratory Sciences, Faculty of Paramedical and Rehabilitation Sciences, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*
3. *Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran*
4. *Department of Engineering Science, Faculty of Engineering, Faculty of East Guilan Technical and Engineering, University of Guilan, Rudsar, Iran*
5. *Biotechnology Research Center, Pharmaceutical Technology Institute, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran*

Received: 23 October 2024 Accepted: 16 March 2025

Abstract

Background and Objective: Plant polyphenols are natural sources of antioxidants that can help prevent many diseases, including cancer. Silymarin (SLM) and Ellagic acid (ELG) are two natural polyphenols, and in this study, for the first time, their cytotoxic effects and antioxidant activity were investigated individually and in combination in breast cancer cells.

Methods: The cytotoxicity of Silymarin and Ellagic acid, alone and in combination, was investigated in the 4T1 breast cancer cell line using the MTT assay. Their antioxidant activity was also evaluated through the Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods, both alone and in combination.

Results: The findings revealed that Ellagic acid resulted in a more significant reduction in cell growth compared to Silymarin. The combined application of Silymarin and Ellagic acid demonstrated superior efficacy in inhibiting cancer cell proliferation compared to either compound used alone. Silymarin exhibited more antioxidant activity in the FRAP assay than Ellagic acid, while Ellagic acid outperformed Silymarin in the DPPH assay. Notably, the combination of these two substances enhanced antioxidant properties in both tests, particularly at molar ratios of 8:1 ($p < 0.001$) and 4:1($p < 0.05$), as well as 50:6.25 and 50:12.5 SLM: ELG, indicating significant synergistic inhibitory effects.

Conclusion: The results underscore Silymarin and Ellagic acid's cytotoxic effects and antioxidant activity. Furthermore, their combined use leads to a synergistic effect, suggesting that this combination treatment could represent a promising candidate for further research in breast cancer studies.

Keywords: Antioxidant, Breast cancer, Combination therapy, Ellagic acid, Silymarin

Please cite this article as follows:

Ghavidel Marghzari M, Valinezhad Sani F, Zaeifi D, Eslami S, Sharifzadeh B, Gheybi F, Jamialahmadi K, Investigating the synergistic cytotoxic and antioxidant effects of Silymarin and Ellagic Acid on a breast cancer cell line. ***Iran J Physiol Pharmacol*** 8 (2025) 270-281.

*Corresponding authors: GheybiF@mums.ac.ir (ORCID: 0000-0001-9209-251X)
JamialahmadiKh@mums.ac.ir (ORCID: 0000-0003-2173-003X)

[Downloaded from ijpp.phypha.ir on 2025-12-05]