مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال دهم، شماره سوم، پیاپی سی و نهم، زمستان ۱۴۰۰ (۱۱۱-۹۹)

DOI: 10.30473/eab.2021.58431.1824

مقاله پژوهشی:

بررسی اثر عصاره هیدروالکلی مورینگا اولیفرا در مدل سرطان ملانومای موش القاشده با رده سلولی B16F10

ناهید قائدامینی[۱]، محمد فضیلتی[۲]، سعید حبیب الهی[۳]، حبیب الله ناظم[۲]، سید حسین حجازی[٤*]

۱. دکتری بیوشیمی، پیام نور واحد اصفهان، ایران
۲. استاد، گروه زیست‌شناسی، پیام نور واحد اصفهان، ایران
۳. استادیار، گروه شیمی، پیام نور واحد اصفهان، ایران
٤. استاد، علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱/۱٦ – تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/٤/۲٦)

چکیده

باوجود درمآنهای شیمیایی فراوانی که برای سرطان وجود دارد، میزان مرگ ومیر ملانوما بالا است. از این‌رو، استفاده از داروهای طبیعی با هزینه کمتر و از طرفی بازدهی بالاتر می‌تواند راه‌کار مناسبی برای نجات بیماران سرطانی باشد. به همین دلیل در این مطالعه هدف اصلی بررسی اثرات عصاره مورینگا اولیفرا در ملانوما است. عصاره هیدروالکلی برگ‌های مورینگا اولیفرا تهیه شد. پس از بررسی محتوای فنولی و فلاونوئیدی تام عصاره، نوع آنها در عصاره با روش‌های HPLC و اسپکتروفتومتر تأیید شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و روش FRAP سنجیده شد. سپس اثر عصاره در رده سلول سرطان ملانوما (B16F10) با تست MTT بررسی شد. سپس تومور در موش‌های C57BL6 القا شد و اثرات عصاره در موش‌های سرطانی بررسی شد. میزان فلاونوئید تام ۱/۷۵±۶۰/۶۵ میلی‌گرم اسید کوئرستین بر گرم عصاره خشک و میزان فنول تام ۱/۲۳±۲۰/۲۵ میلی‌گرم اسیدگالیک بر گرم عصاره خشک بود. در عصاره سه ترکیب فنولی و فلاونوئیدی کوئرستین، اسید گالیک و اسید کافئیک با خاصیت آنتی‌اکسیدانی شناسایی شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد و قدرت احیای عصاره با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت. IC50 عصاره مورینگا با تست MTT، ۷۳ µM/mol به‌دست آمد. حجم تومور توسط دوزهای مختلف عصاره در دو هفته کاهش معنی‌دار نشان داد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان‌دهنده تأثیر مثبت مواد آنتی‌اکسیدانی موجود در برگ مورینگا الیفرا در کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌های سرطانی و حجم تومور در موش می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ملانوما، مورینگا اولیفرا، B16F10.

Evaluation of the Effect of Moringa Olifera Hydroalcoholic Extract in a Model of B16F10-Induced Mouse Melanoma Cancer

Nahid Ghaed Amini[1], Mohammad Fazilati[2], Saeid Habib-Allahi[3], Habib-Allah Nazem[2], Seyed Hossein Hejazi[4*]

1. Ph. D. in Biochemistry, Payame Noor University, Isfahan, Iran
2. Professor, Department of Biology, Payame Noor University, Isfahan, Iran
3. Assistant Professor, Department of Chemistry, Payame Noor University, Isfahan, Iran
4. Professor, Isfahan Medical Sciences, Isfahan, Iran

(Received: Apr. 05, 2021 - Accepted: Jul. 17, 2021)

Abstract

Despite the many chemical drugs available, the prevalence and mortality rate of melanoma is high. Therefore, the use of drugs of natural origin with lower cost and higher efficiency can be a good way to save patients. Therefore, in this study, the main purpose of this study was to evaluate the effects of Moringa extract on melanoma. Hydroalcoholic extract of Moringa leaves was prepared. After examining the total phenolic and flavonoid content of the extract, their type was confirmed by HPLC and spectrophotometer methods. The antioxidant power was measured by DPPH free radical scavenging and FRPA methods. Then the tumor was induced in C57BL6 mice and then the effects of the extract were evaluated on B16F10 cell line and tumor mice. The total flavonoid content was 60.65±1.75 mg quercetin acid per gram of dry extract and the total phenol content was 20.25±1.23 mg gallic acid per gram of dry extract. Three phenolic and flavonoid compounds with antioxidant properties identified include quercetin, gallic acid, and caffeic acid. The free radical scavenging power and the reducing power of the extract increased with increasing the concentration. The IC50 of moringa extract was 73 µM/mol. The tumor volume was significantly reduced by different doses of the extract in two weeks. The results of present study show the positive effect of Moringa leaves extract in reducing the survival rate of B16F10 melanoma cancer cells and tumor volume in mice.

Keywords: Antioxidant, B16F10, Melanoma, *Moringa oleifera*.

* نویسندهٔ مسئول: Email:

مقدمه

در سطح پایه اپیدرم، سلول‌های ملانوسیت قرار دارند که توانایی تولید رنگدانه‌های جذب‌کننده نور فرابنفش (به نام ملانین) را دارند. در پاسخ به نور فرابنفش (UV) سلول‌های کراتینوسیت هورمون محرک ملانوسیت آلفا (α-MSH) را ترشح می‌کنند که با اتصال به گیرنده ملانوکورتین ۱ (MC1R) در سطح سلول‌های ملانوسیت منجر به راه‌اندازی مسیر پیام‌رسانی تولید ملانین می‌شود (Williams *et al*., 2011). سپس ملانین‌ها به اطراف کراتینوسیت‌های در معرض آفتاب ارسال‌شده و آنجا تجمع پیدا می‌کند و از هسته کراتینوسیت‌ها در برابر اثرات جهش‌زای UV محافظت می‌کنند. با بالغ شدن کراتینوسیت‌ها، آنها تحت کراتینه شدن، هسته خود را ازدست‌داده و می‌میرند؛ بنابراین، لایه خارجی پوست توسط رنگدانه ملانین موجود در کراتینوسیت‌ها و نیز لایه‌ای از کراتینوسیت‌های مرده محافظت می‌شود که به‌عنوان سدی برای محافظت از سلول‌های زنده لایه‌های زیرین عمل می‌کند (Seiberg, 2001).

ملانوما نوعی تومور بدخیم است که از سلول‌های ملانوسیت منشأ می‌گیرد. بر اساس آمار موجود در سال ۲۰۲۱ در ایالات‌متحده آمریکا تخمین زده شده است که ملانوما با ۱۰۶۱۱۰ مورد جدید پس از سرطان‌های پستان، پروستات و ریه رتبه چهارم را از نظر موارد جدید ابتلا به خود اختصاص داده است. میزان مرگ‌ومیر این سرطان بالا است و از میان موارد جدید تخمین زده ۷۱۸۰ مورد دچار مرگ می‌شوند (Siegel *et al*., 2021).

با توجه به آماری که در ایران در دسترس است در بین سال‌های ۱۳۸۷-۱۳۸۲ سرطان‌های پوست شایع‌ترین سرطان در کل و نیز در مردان و دومین سرطان شایع در زنان بوده است. در بین استآنهای مختلف آذربایجان شرقی و گرگان به‌ترتیب بیشترین و کمترین میزان بروز سرطان پوست را داشتند. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط مرجانی و کبیر در استان گلستان انجام شد مشخص شد که بالاترین میزان بروز اختصاصی سنی در استان گلستان، ۱۶۱/۹۰ در 10^5 در مردان گروه‌های سنی ۸۴-۸۰ سال است که این میزان بالاترین میزان بروز سرطان در جهان بود (Marjani & Kabir 2009). با توجه به این داده‌ها اهمیت بروز سرطان ملانوما در کشور ایران روشن می‌شود.

برای درمان ملانوما روش‌های درمانی مختلفی وجود دارد که می‌توان آنها را به روش‌های جراحی، رادیوتراپی و دارو درمانی (داروهای گیاهی و شیمیایی) دسته بندی کرد. در طول ۵۰ سال گذشته داروهای متعددی برای درمان ملانوما توسط FDA مورد تأیید قرارگرفته است که می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: در سال ۱۹۷۴ داروی Dacarbazine، در سال ۱۹۹۶ داروی Interferon α-2b، در سال ۱۹۹۸ داروی Interleukin-2، در سال ۱۹۹۹ داروی Ontak، در سال ۲۰۱۱ داروهای Penginterferon α-2b؛ Vemurafenib؛ و Ipilimumab، در سال ۲۰۱۳ داروهای Dabrafenib و Trametinib، در سال ۲۰۱۴ داروهای Nivolumab، Nivolumab و Dabrafenib+trametinib و در سال ۲۰۱۵ داروهای Talimogene laherparepvec و Cobimetinib+vemurafenib (Domingues *et al*., 2018). با وجود پیشرفت‌های درمانی فراوانی که به آنها اشاره شد، هنوز دارویی قطعی برای درمان ملانوما معرفی نشده است، از طرفی به دلیل عوارض فراوان داروهای شیمیایی که در بافت‌های مختلف بدن دارند، محققین به استفاده از ترکیبات گیاهی و طبیعی در درمان سرطان‌های مختلف علاقه نشان داده‌اند. در سرطان ملانوما نیز محققین فراوانی به دلیل وجود عوارض زیاد شیمی‌درمانی، به استفاده از درمان گیاهی برای درمان ملانوما توجه کرده‌اند که کمترین عوارض را در بدن دارند (Chinembiri *et al*., 2014).

براساس آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO)

بیش از ۸۰ درصد مردم از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند (Willcox & Bodeker, 2004). بنابراین گیاهان نقش مهمی در تغذیه و حفظ سلامت در سراسر جهان دارند. گیاهان در درمان بیماری‌های متفاوتی استفاده می‌شوند (Moradi *et al*., 2013)، که یکی از آنها سرطان است. مشخص‌شده است گیاهان دارای ترکیبات با اثرات ضد سرطانی فراوانی هستند که این ترکیبات را به سه دسته ترکیبات القاکننده آپوپتوز، مهارکننده تکثیر سلولی و مهارکننده متاستاز دسته‌بندی کرده‌اند (Chinembiri *et al*., 2014). یکی از گیاهانی که در چندین ساله اخیر بسیار مورد توجه محققین بخش سرطان قرار گرفته است، مورینگا اولیفرا (*Moringa oleifera*) از خانواده Moringaceae است.

مورینگا اولیفرا گیاهی درمانی است که به‌طور طبیعی در هندوستان رشد می‌کند. این گیاه منبع قابل توجه‌ای برای ویتامین‌های (A، B، C، E، ریبوفلاوین، اسید نیکوتینیک، اسید فولیک، پیریدوکسین، اسید اسکوربیک، بتا کاروتن)، آهن، کلسیم و آلفا توکوفرول است (Dahot, 1988). علاوه بر این ویتامین‌ها و عناصر که اثرات ضد توموری دارند، منبع بسیاری از ترکیبات شیمیایی نیز است که اثرات ضد توموری آنها اثبات‌شده است. ازجمله این ترکیبات شیمیایی می‌توان به پیش‌سازهای گلوکوزینولات، نیازیمنین، نیازیمیسین (Guevara *et al*., 1996)، اوژنول (eugenol)، ایزوپروپیل ایزوتیوسیانات، D–آلوز و هگزادکونوئیک اسید اتیل استر اشاره کرد (Purwal *et al*., 2010).

با کشف این ترکیبات در گیاه مورینگا اولیفرا اثرات ضدتوموری آن در سرطان‌های مختلف مانند سرطان سینه و کولورکتال (Al-Asmari *et al*., 2015)، سرطان تخمدان و پروستات (Del Mar Zayas-Viera *et al*., 2016)، لوسمی میلوئیدی مزمن و حاد (Khalafalla *et al*., 2010)، سلول‌های سرطان پانکراس (Berkovich *et al*., 2013)، سلول‌های سرطان ریه و سرطان کبد (Madi *et al*., 2016)، آدنوکارسینومای ileocecal (Al-Asmari *et al*., 2015) و ملانوما (Purwal *et al*., 2010) بررسی شده است. با توجه به مواردی که ذکر شد، هدف از این مطالعه نیز تعیین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره برگ‌های مورینگا اولیفرا و بررسی اثرات ضدتوموری آن در مدل سرطان ملانومای موش نر C57BL/6 القا شده با رده سلولی B16F10 است.

امروزه با توجه به اینکه افزایش مقاومت سرطان‌ها به مسأله دردسرسازی تبدیل‌شده است. تلاش پژوهش‌گران برای کشف و شناسایی عوامل سرطانی جدید که موجب افزایش میزان حساسیت سلول‌های سرطانی گردند روبه گسترش است مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به داروهای شیمیایی منجر به کاهش پاسخ این سلول‌ها نسبت به دارو و در نتیجه شکست اقدامات درمانی می‌شود. بنابراین تحقیق و توسعه داروهای مؤثرتر و یا با اثرات جانبی کمتر از اهمیت زیادی برخوردار است در حال حاضر بسیاری از داروهای شیمیایی حاصل فراورده‌های به‌دست‌آمده با منشأ طبیعی ازجمله گیاهان یا مشتقی از آنها هستند این امیدواری وجود دارد که تحقیقات بر روی گیاهان جدید دارای خواص ضد سرطانی در آینده منجر به کشف داروهای ضد سرطانی جدید با منشأ گیاهی گردد که این موفقیت بسیار بااهمیت خواهد بود ترکیب مذکور که در این مطالعه موردبررسی قرار گرفته‌اند دارای ترکیبات مؤثر در درمان سرطان به‌ویژه سرطان ملانوما می‌باشند. ملانوما بدخیم‌ترین سرطان پوست است که از سلول‌های ملانوسیت یا رنگدانه ساز پوست منشأ می‌گیرد. بروز این نوع سرطان پوست از سال‌های اخیر در حال افزایش است این امر می‌تواند به علت تماس بیشتر پوست با اشعه آفتاب باشد که بخصوص در سفیدپوستان می‌تواند زمینه‌ساز ایجاد ملانوما گردد. شیوع این بیماری با سرعت زیادی نسبت به بسیاری از انواع سرطان‌ها، در حال رشد است و طی چند سال گذشته میزان مرگ‌ومیر

ناشی از آن در حال افزایش است. این سرطان دارای قدرت متاستازی بالایی است و به دلیل خاصیت بالای متاستاتیک آن مورد توجه خاص جهت روشن کردن مسیرهای متاستازی و عوامل دخیل در آن است. این بیماری از طریق سیستم لنفاوی در سراسر بدن گسترش می‌یابد. شیمی‌درمانی رایج‌ترین روش درمان این عارضه است که عوارض جانبی مختلفی به همراه دارد و می‌تواند سلول‌های سالم را نیز مورد هدف قرار دهد و در حال حاضر سرطان پوست درمان قطعی ندارد بنابراین استفاده از گیاهانی همچون Moringa با خواص ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی می‌تواند باعث کاهش روند متاستاز و روش جایگزین جهت پیشگیری کنترل و درمان این بیماری باشد.

مواد و روش‌ها

برگ‌های گیاه مورینگا اولیفرا (*Moringa oleifera*) از شرکت گیاه دارو بارش جهرم واقع در استان شیراز تهیه و توسط کارشناسان دانشگاه از نظر گونه، مورد ارزیابی و تأیید قرار گرفت. برگ‌ها پس از جداکردن مواد زاید، شستشو و خشک‌کردن، داخل ظرف شیشه‌ای تمیز و دربسته به آزمایشگاه مرکزی منتقل شد.

تهیه عصاره

میزان ۲۵ گرم از برگ مورینگا اولیفرا به‌مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد. با استفاده از آسیاب برقی پودر گردید و از الک با اندازه مِش ۸۰ عبور داده شد. با استفاده از ۲۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۹ ذرصذ (نسبت یک به ۱۰) استخراج عصاره انجام شد. بدین منظور، نمونه داخل کاغذ صافی واتمن ریخته شد و درون سوکسله قرار گفت. حلال نیز داخل بالن ریخته شد و دمای هیتر در گستره متوسط به بالا تنظیم گردید. به‌منظور به‌دست آوردن عصاره با درصد خلوص بالا، مقدار اضافی حلال (متانول) به‌وسیله دستگاه تقطیر در خلأ (روتاری) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد جدا شد. عصاره به‌دست‌آمده، داخل بطری با در بسته در دمای پایین نگهداری شد.

تعیین محتوی فنولی و فلاونوئیدی کل عصاره

مقدار فلاونوئید کل عصاره با استفاده از روش اصلاح‌شده Meda *et al*. (2005) اندازه‌گیری شد. بدین منظور ۰/۵ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد آلومینیوم کلرید در حلال متانول به ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره افزوده شد. مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در پایان، میزان جذب نمونه با استفاده از طیف‌سنجی UV-Vis در طول‌موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد، از کوئرستین استفاده شد.

محتوای کل ترکیبات فنلی با استفاده از روش ولف با استفاده از معرف فولین سیوکالتیو انجام شد. اساس این روش، احیای معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی است (Moyo *et al*., 2012). بدین منظور ۲۰ میکرولیتر از عصاره با ۱/۱۶ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱ میلی‌لیتر معرف فولین مخلوط شد بعد از ۸ دقیقه ۳۵۰ میکرولیتر محلول کربنات سدیم (۲۰ درصد وزنی) اضافه شد. مخلوط به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس میزان جذب مخلوط در طول‌موج ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای رسم منحنی استاندارد از گالیک اسید استفاده شد.

تعین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره مورینگا با روش کروماتوگرافی

در پژوهش حاضر، ابتدا استاندارد کوئرستین، اسید گالیک و کافئیک اسید خریداری شد (Sigma). مقدار ۰/۰۰۱ گرم از آنها با پنج میلی‌لیتر از حلال متانول مخلوط گردید، به‌خوبی هم زده شد و با کمک فیلتر ۰/۲ میکرون صاف گردید. محلول استاندارد حاصل با سرنگ به داخل دستگاه تزریق شد. به‌علاوه ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه‌شده از عصاره برگ مورینگا اولیفرا (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به‌صورت جداگانه از

فیلتر ۰/۲ میکرونی عبور داده شد و به داخل دستگاه تزریق گردید. آنالیز نمونه‌ها به وسیله دستگاه HPLC چند حلال مجهز به پمپ تک و آشکارساز Agilent 1100 انجام شد (Agilent 1100 SY-8100 UV/VIS Detector). فاز متحرک شامل ۵۰ درصد متانول و ۵۰ درصد استونیتریل با سرعت جریان ۰/۹ میلی‌لیتر در دقیقه در دمای اتاق از ستون C18 با مشخصات (۴/۶ ×۲۵۰mm, 5µm) عبور داده شد. جذب نمونه‌ها در طول‌موج ۳۷۰ nm اندازه‌گیری شد.

سنجش قدرت احیای ترکیبات آنتی‌اکسیدان (FRAP)

جهت تعیین قدرت احیاکنندگی ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی موجود در عصاره از روش ارائه‌شده توسط Oyaizu استفاده شد (Oyaizu, 1986). در این روش یک میلی‌لیتر از عصاره مورینگا اولیفرا در غلظت‌های متفاوت (۱۰۰–۸۰–۴۰–۲۰) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس غلظت‌های به‌دست‌آمده به محلول حاصل از ترکیب ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانید پتاسیم (۱ درصد حجمی وزنی) اضافه شد. میزان جذب در طول‌موج ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (Shimadzu Uv-1240) اندازه‌گیری شد.

سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با روش رادیکال DPPH (۲ و ۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل)

بدین منظور ۱۰ میلی‌گرم از عصاره برگ در ۲۵ میلی‌لیتر حلال متانول حل شد. درون ۵ لوله آزمایش ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH ریخته و سپس ۴ میلی‌لیتر عصاره تهیه‌شده با غلظت‌های متفاوت اضافه شد. لوله‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفت. علاوه بر لوله‌های مذکور یک لوله به‌عنوان شاهد انتخاب گردید که فقط حاوی ۱ میلی‌لیتر DPPH و ۲ میلی‌لیتر متانول بود. از متانول برای صفرکردن دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده شد.

کشت سلولی و تست MTT

سلول‌های B16F10 از بانک سلول انستیتو پاستور تهران خریداری شد. این سلول‌ها در یک فلاسک حاوی محیط DMEM محتوی گلوتامکس، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و یک درصد استرپتومایسین–پنی‌سیلین کشت و در انکوباتور CO_2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و رطوبت اشباع تا رسیدن به تراکم ۸۰ درصدی نگهداری شدند. هر دو روز یک‌بار سلول‌ها پاساژ داده می‌شدند. تعدادی از پاساژهای این سلول ذخیره شدند. این سلول‌ها در مرحله اول برای تست MTT استفاده شد و در مرحله بعدی برای القای سرطان در موش‌های C57BL/6 به‌کار رفت.

به‌منظور اندازه‌گیری میزان بقای‌سلولی و تعیین IC50 از روش MTT (4)-3-(5-Dimethylthiazol-2-Yl)-2، 5-Diphenyltetrazolium Bromide) استفاده شد. اساس این روش، شکستن نمک تترازولیوم توسط آنزیم میتوکندریایی سوکسینات دهیدروژناز سلول‌های زنده و تبدیل آن به کریستال‌های نامحلول فورمازان می‌باشد که در آخر با افزودن یک حلال، این کریستال‌ها حل‌شده و میزان رنگ تولیدی با میزان سلول‌های زنده متناسب است. ابتدا سلول‌ها شمارش شده و در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای به میزان cell/well ۱۵۰۰۰ ریخته و به‌مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار داده شد. سپس غلظت‌های عصاره در محیط کشت حاوی ۶ درصد FBS تهیه و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر جایگزین محیط موجود در چاهک‌ها شد و ۲۴ ساعت در انکوباتور CO_2 قرار گرفت. بعد از زمان موردنظر، محتوای چاهک‌ها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول MTT (۰/۵ mg/ml) به چاهک‌ها اضافه شد. بعد از ۴ ساعت قرارگیری در انکوباتور CO_2، محتویات تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به‌منظور حل‌کردن کریستال‌های فورمازان اضافه و بعد از ۱۰ دقیقه، شدت رنگ تولیدشده در ۵۷۰ نانومتر با الیزا ریدر خوانش شد. تکرارها به‌صورت هشت‌تایی بودند. چاهک‌های حاوی سلول و فاقد عصاره به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند.

مطالعات *in vivo*

برای بررسی مطالعه‌های درون‌تنی ۲۴ موش نر C57BL/6 از مؤسسه رویان اصفهان خریداری و به چهار گروه جداگانه تقسیم شدند که در قفس‌های جداگانه قرار گرفتند.

۱- گروه کنترل: شامل شش عدد موش سرطانی بدون دریافت عصاره.

۲- گروه تیمار اول: شامل شش عدد موش سرطانی با ۱۴ تزریق داخل توموری عصاره با غلظت ۰/۰۸ گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو هفته.

۳- گروه تیمار دوم: شامل شش عدد موش سرطانی با ۱۴ تزریق داخل توموری عصاره با غلظت ۰/۰۴ گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو هفته.

۴- گروه تیمار سوم: شامل شش عدد موش سرطانی با ۱۴ تزریق داخل توموری عصاره با غلظت ۰/۰۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن در دو هفته.

ایجاد مدل ملانوما در موش C57BL/6

برای القای سرطان به‌ازای هر موش یک میلیون سلول B16F10 در ۲۰۰ µL محلول PBS استریل به شکل سوسپانسیون آماده و به‌صورت زیرجلدی تزریق شد. تومورها پس از تشکیل به‌روش ماکروسکوپی بررسی شدند. از زمان قابل‌مشاهده بودن تومور، بیومتری آنها با کولیس انجام و روزانه موش‌ها از نظر سلامت جسمی موردبررسی قرار گرفتند در تمام مراحل تحقیق، طی یک دوره یک ۲۸ روزه، پس از تزریق سلول‌ها و تیمار درنهایت موش‌ها با رعایت اصول اخلاقی کار با حیوانات کشته شدند و نمونه‌های موردنیاز برای آزمایش‌های بعدی تهیه شدند.

آنالیز آماری

در ابتدا نرمال‌بودن داده‌ها توسط تست Shapiro-Wilk normality بررسی شد، سپس آزمون‌های مناسب آنالیز انتخاب شدند. داده‌ها به‌صورت mean±SD گزارش شدند. همچنین P-value<۰/۰۵ معادل اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

محتوی تام فنول و فلاونوئید عصاره

میزان فلاونوئید تام ۱/۷۵±۶۰/۶۵ میلی‌گرم اسید کوئرستین بر گرم عصاره خشک و میزان فنول تام ۱/۲۳±۲۰/۲۵ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم عصاره خشک مشاهده شد. مقدار کل فلاونوئید عصاره با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد و بر مبنای کوئرستین و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان شد.

رابطه ۱) $y = ۰/۰۲۹x + ۰/۱۰۵$

$R^2 = ۰/۹۸۶$

میزان ترکیبات فنلی با استفاده از رابطه (۲) به‌دست‌آمده از منحنی بر مبنای اسیدگالیک و به‌صورت میلی‌گرم در گرم عصاره بیان شد.

رابطه ۲) $Y = ۰/۰۰۶۱ + ۰/۰۰۱۹$

$R^2 = ۰/۹۹۱۲$

بررسی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره

برای تعیین ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی عصاره الکلی مورینگا، از استانداردهای اسید کافئیک، کوئرستین و اسید گالیک استفاده شد. پس از محاسبه نتایج حاصل از استانداردها، عصاره نیز موردسنجش قرار گرفت و با مقایسه نتایج حاصل مشخص شد که در عصاره برگ مورینگا الیفرا ترکیبات کوئرستین، اسید گالیک و اسید کافئیک وجود دارند. با مقایسه زمان بازداری در کروماتوگرام‌های به‌دست‌آمده از عصاره متانولی برگ مورینگا اولیفرا و کروماتوگرام حاصل از نمونه استاندارد، ترکیب فلاونوئیدی (کوئرستین، اسیدگالیک و اسید کافئیک) شناسایی و میزان آن با رسم منحنی کالیبراسیون کوئرستین، اسید گالیک و اسیدکافئیک و با استفاده از رابطه (۳) به‌دست آمد. میزان غلظت آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

رابطه ۳) $y = ۱۳۱۸۲۵x - ۷۹۷۵۵۴$

$R^2 = ۰/۹۹۹$

جدول ۱. ترکیبات پلی‌فنلی شناسایی‌شده با روش HPLC و مقادیر آنها در عصاره برگ مورینگا الیفرا

ترکیبات فنلی	میزان ترکیبات فنلی (عصاره برگ) (mg/100 g)
کوئرستین	۳/۰۸۷ ± ۰/۳۶۳
اسید کافئیک	۲/۲۱۰ ± ۰/۷۷۳
اسید گالیک	۲/۱۰۷ ± ۰/۸۲۹

بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره با روش حذف رادیکال‌های آزاد DPPH

براساس پروتوکل شرح داده‌شده، میزان مهار رادیکال‌های آزاد سنجش شد. نتایج نشان داد که توانایی عصاره در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۰/۷۳ ± ۴۲ است و با افزایش غلظت عصاره میزان مهار رادیکال آزاد DPPH به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵)(شکل ۱). از شاخص IC50 به‌منظور بیان قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد استفاده شد. میزان جذب تمامی نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد، سپس با استفاده از معادله (۴) تبدیل به درصد مهار شدند.

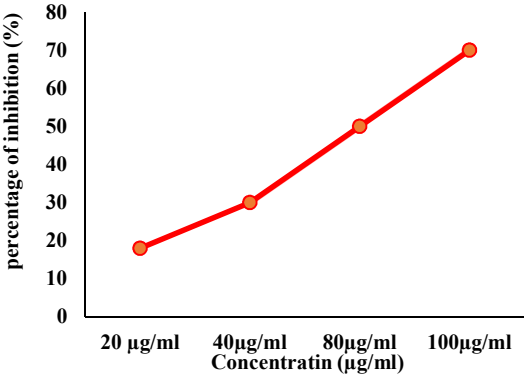
رابطه ۴) $Y=Abc-Abs/Abc*100$

سنجش قدرت احیای ترکیبات آنتی‌اکسیدان (FRAP)[1]

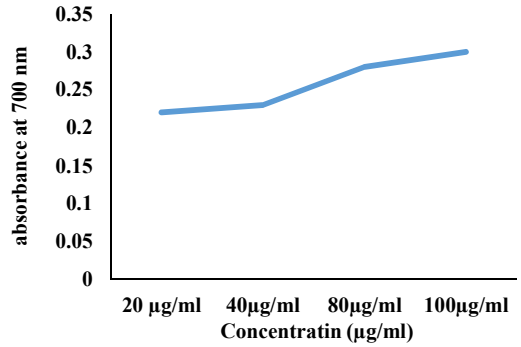
مشخص شد با افزایش غلظت عصاره‌ها، قدرت احیا نیز افزایش می‌یابد. بین قدرت احیا و محتوای فنولی و فلاونوئیدی رابطه خطی و مستقیم وجود داشت (شکل ۲).

تست MTT

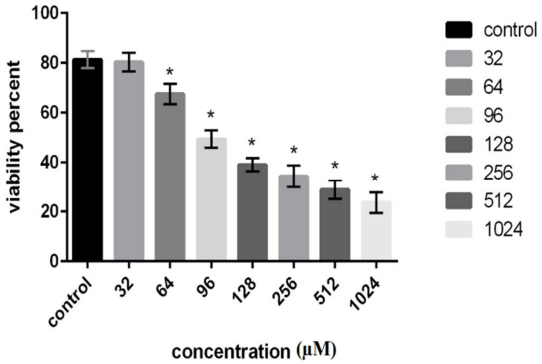
تیمار سلول‌های B16F10 با غلظت‌های ۱۰۲۴، ۵۱۲، ۲۶۵، ۱۲۸، ۹۶، ۶۴، ۳۲ میکرومولار از عصاره مورینگا، کاهش رشد وابسته به دوز را نشان داد. این نتایج مشخص کرد که IC50 عصاره مورینگا ۷۳ میکرومولار بر مول است (شکل ۳).



شکل ۱. فعالیت حذف رادیکال‌های آزاد DPPH عصاره برگ مورینگا الیفرا در غلظت‌های متفاوت



شکل ۲. قدرت احیاکنندگی غلظت‌های مختلف عصاره‌های متانولی برگ مورینگا الیفرا (با افزایش غلظت عصاره برگ تبدیل Fe^{3+} به Fe^{2+} (قدرت احیاء ترکیبات فنلی) افزایش‌یافته و جذب محلول در طول‌موج ۷۰۰ نانومتر افزایش یافت.

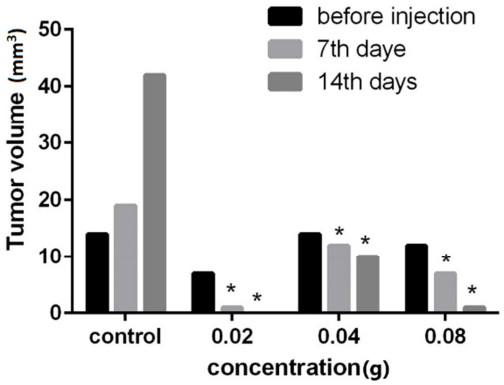


شکل ۳. میزان درصد زنده‌مانی سلولی رده B16F10 در مجاور غلظت‌های مختلف مورینگا الیفرا به روش MTT. ❋: مقایسه با گروه کنترل

1. Ferric reducing antioxidant power assay

نتایج آزمایش *in vivo*

تیمار تومورها توسط عصاره مورینگا با دوزهای ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ گرم بر کیلوگرم وزن بدن، منجر به کاهش معنی‌دار حجم تومورها بعد از گذشت زمان یک و دو هفته شد (P<۰/۰۰۱). میزان حجم تومور در دوز ۰/۰۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش بیشتری نسبت به دو دوز دیگر داشت (P<۰/۰۰۱)(شکل۴).



شکل ٤. مقایسه حجم تومور در مدل حیوانی در دوزهای مختلف مورینگا الیفرا و در گروه کنترل (*:P<0.001)

بحث و نتیجه‌گیری

در سطح مولکولی یکی از مهم‌ترین علل ایجاد سرطان‌ها، اکسیدان‌ها و رادیکال‌های آزاد اکسیژن هستند. این ترکیبات از طریق مکانیسم‌هایی مانند مهار تلومراز، تغییر در نفوذپذیری سلولی و آسیب DNA منجر به آسیب سلول‌ها و ایجاد بسیاری از بیماری‌ها ازجمله سرطان می‌شوند (Lin *et al*., 2018). به همین دلیل درمان سرطان با رویکرد تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن، یکی از مسیرهای موردعلاقه محققان است. گیاهان نیز به‌عنوان یکی از منابع طبیعی و غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌طور گسترده در درمان بیماری‌ها استفاده‌شده‌اند. بر اساس تحقیقات انجام‌شده وجود ۴۶ ترکیب آنتی‌اکسیدان مختلف و ۳۶ عامل ضدالتهابی طبیعی در گیاه مورینگا، به اثبات رسیده است (Lin *et al*., 2018; Bose, 2007)، که ازجمله آنها می‌توان به زیتین (آنتی‌اکسیدان قوی)، کوئرستین (یک فلاونوئید شناخته‌شده برای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد)، بتاسیتوسترول (یک کلسترول ضدالتهابی در بدن)، اسید کافئیک (یکی دیگر از ترکیبات ضدالتهابی قوی) و کائمفرول اشاره کرد (Lin *et al*., 2018).

علاوه بر این، مشخص‌شده است که بخش‌های مختلف گیاه مورینگا اولیفرا (برگ، دانه و غلاف) دارای مقدار زیادی کلسیم، آهن، پتاسیم، اسیدهای آمینه و پروتئین، ویتامین‌های B1، B2، B3، B6، C، E، ریبوفلاوین، فولیک‌اسید و مواد مغذی تقویت‌کننده بدن است که برای سلامت موجودات ضروری هستند (Karim *et al*., 2016). همچنین مشخص‌شده است که گیاه مورینگا اولیفرا دارای اثرات ضد سرطان، هیپوگلیسمی، ضد التهابی، ضد باکتری، ضد قارچی، ضدویروسی، ضد آلرژیک، کاهش درد، مبارزه با عفونت‌ها و ضد انعقادی می‌باشد. نقش این گیاه در برابر بیماری آلزایمر، زخم معده، کنترل و کاهش کلسترول و بهبود زخم‌ها بررسی و اثبات‌شده است (Bose, 2007; Tragulpakseerojn *et al*., 2017). پژوهش‌گران گزارش کرده‌اند که مورینگا سلول‌ها را در برابر شیمی‌درمانی تقویت کرده و آستانه تحمل سلول‌ها را در برابر مواد شیمیایی افزایش می‌دهد (Tragulpakseerojn *et al*., 2017). به همین دلیل در این مطالعه هدف اصلی بررسی اثرات گیاه مورینگا اولیفرا بر سرطان ملانوما در محیط *In vitro* و *In vivo* است.

در این مطالعه ابتدا محتوای تام فلاونوئیدی و فنولی عصاره برگ مورینگا تهیه‌شده به‌دست آمد و سپس ترکیبات فلاونوئیدی غالب در عصاره، شناسایی و تعیین غلظت شدند. در این مطالعه سه ترکیب فنولی و فلاونوئیدی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا (کوئرستین، اسیدگالیک و اسید کافئیک) شناسایی گردید. نتایج نشان داد که در استخراج به وسیله سوکسله به‌همراه حلال متانول میزان فلاونوئید عصاره ۱/۷۵±۶۰/۶۵ میلی‌گرم اسیدکوئرستین بر گرم عصاره

خشک می‌باشد. در مطالعه Ishaqzadeh Torbati (2015) محتوای تام فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی مورینگای تکثیرشده در شیشه ۰/۰۱±۷۸/۱۸۹ میلی‌گرم بر گرم عصاره به‌دست آمد. نتایج مطالعه آنها نشان‌دهنده غلظت بالاتر محتوای تام فلاونوئیدی در مورینگا بود که علت این تفاوت به مبنای بیان غلظت فلاونوئید برمی‌گردد. در این مطالعه بیان براساس میزان کوئرستین انجام شد که بالاترین نوع فلاونوئید بود ولی در مطالعه Ishaqzadeh Torbati (2015) مجموع کل فلاونوئیدها گزارش شده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که عصاره گیاه مورینگا دارای محتوای تام فلاونوئیدی بالایی می‌باشد و با توجه به خواص آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فلاونوئیدی، می‌توان از آن در درمان بیماری‌های مختلف ازجمله سرطان نیز بهره برد.

برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی عصاره استخراج‌شده، در این مطالعه از دو تست مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و تست FRAP استفاده شد. قدرت عصاره برگ‌های مورینگا در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ۰/۷۳ ± ۴۲ به‌دست آمد. از طرفی در این مطالعه مشخص شد که با افزایش غلظت عصاره برگ مورینگا هم قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و هم قدرت احیاء عصاره به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد ($P<0/05$). با بررسی دیگری که انجام شد ارتباط خطی و مستقیم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و وجود ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی مشاهده شد. این نتایج همسو با مطالعه Jeyakumar *et al.* (2020) بود. آنها نشان دادند مهار DPPH به‌ترتیب برای عصاره‌های اتانولی برگ‌های مورینگا به‌ترتیب ۲۹/۴۹، ۴۳/۷۲ و ۵۴/۵۹ در ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ppm ۱۵۰۰ بوده است که به‌طور میانگین به میزان به‌دست‌آمده از مطالعه ما نزدیک بوده است. Abdolshahi *et al.* (2015) در مطالعه خود فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گیاهان دارویی را با روش DPPH ارزیابی کردند و نتیجه گرفتند که عصاره متانولی گیاهان دارویی پتانسیل استفاده به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی را دارد.

در مطالعه حاضر سلول‌های سرطان ملانوما (B16F10) با غلظت‌های متفاوتی از عصاره مورینگا بین ۳۲–۱۰۲۴ میکرومولار تیمار شدند و کاهش رشد وابسته به دوز در آنها مشخص شد. IC50 عصاره مورینگا در این مطالعه ۷۳ میکرومولار بر مول به‌دست آمد. این نتیجه مشخص کرد که عصاره به‌دست‌آمده در این مطالعه دارای فعالیت بسیار خوبی علیه سلول‌های سرطان ملانوما است.

در مطالعه Abdulrahman Khazim Al-Asmari *et al.* (2015) اثرات عصاره‌های مورینگا اولیفرا را روی رده‌های سلولی سرطان سینه (MDA-MB-231) و کولورکتال (HCT-8) ارزیابی کردند. آنها مشاهده کردند که تیمار کردن سلول‌های سرطانی توسط عصاره مورینگا منجر به کاهش میزان زنده‌مانی سلول‌ها می‌گردد. سپس با استفاده از روش رنگ‌آمیزی آنکسین V اثبات کردند که این عصاره منجر به القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد. سپس اثرات عصاره را در توقف چرخه سلولی ارزیابی کردند و سلول‌ها را توسط ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره تیمار کردند. پس از گذشت ۲۴ ساعت مشخص شد که چرخه سلولی در سلول‌های سرطانی در مرحله G2/M متوقف‌شده بود (Al-Asmari *et al.*, 2015). نتایج ما نیز در راستای نتایج مطالعات Al-Asmari et al. (2015) و مطالعات پیشین بود که اثرات ضد سرطانی مورینگا را گزارش کرده بودند. در مطالعات گذشته اثرات ضد سرطانی مورینگا به ترکیبات دیگری غیر از کوئرستین در مورینگا نسبت داده‌شده بود. Lacroix *et al.* (2006) به نقش ترکیب eugenol در القای آپوپتوز در سلول‌های MDA-MB-231 پرداخته بود و مشخص کرد که در این سلول‌ها بیان پروتئین آپوپتوزی Bax افزایش می‌یابد (Lacroix *et al.*, 2006) و از طرفی Al-Sharif *et al.* (2013) گزارش کردند که ترکیب Eugenol منجر به کاهش بیان پروتئین E2F1 می‌گردد که می‌تواند پیامدهای نویدبخشی برای درمان سرطان سینه داشته باشد.

در مطالعه Do *et al*. (2020) اثرات عصاره فنولی برگ‌های مورینگا روی سلول‌های ملانومای انسانی (رده‌های سلولی A375 و A2058) بررسی شد. در طی مطالعه آنها مشخص شد که عصاره مورینگا می‌تواند منجر به القای آپوپتوز از مسیر وابسته به افزایش گونه‌های فعال اکسیژن شود. این نتیجه در تعدادی دیگر از مطالعات نیز تکرار شده است (Do *et al*., 2020; Tiloke *et al*., 2013; Guon & Chung, 2017). در مطالعه Guon & Chung (2017) مشخص شد که عصاره مورینگا منجر به تولید رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن در سلول‌های ملانومای A2058 می‌شود و از این مسیر می‌تواند آپوپتوز را القا کند. باتوجه به اینکه در همه مطالعات به اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره مورینگا و ترکیبات آن اشاره‌شده است و علاوه بر این اثبات‌شده که گونه‌های فعال اکسیژن باعث ایجاد سرطان و بسیاری از بیماری‌ها می‌گردند، نتایج Guon & Chung (2017) نوعی تناقض به نظر می‌رسد، ولی برای روشن شدن آن باید به دو نکته توجه داشت، اول اینکه در مطالعاتی که به القای آپوپتوز توسط مسیر وابسته به گونه‌های فعال اکسیژن اشاره‌شده است، این مسیر در سلول‌های سرطانی مشاهده‌شده است نه سلول‌های سالم و طبیعی و نکته دوم اینکه گونه‌های فعال اکسیژن در کنار اثرات مخرب می‌توانند به‌عنوان یک واسطه سیگنالینگ داخل سلولی عمل کنند (Stadtman, 2001). از طرفی تولید بیش‌ازحد گونه‌های فعال اکسیژن منجر به افزایش استرس اکسیداتیو در نتیجه آسیب سلولی و مهار عملکرد و چرخه سلولی و درنهایت آپوپتور می‌شوند (Kuo *et al*., 2007). مشخص‌شده است که گونه‌های فعال اکسیژن به‌واسطه فرایندهای فعالی در سلول‌های طبیعی تولید می‌شوند و با فرایندهای بیولوژیکی گوناگونی ازجمله تمایز سلولی و بیان ژن‌ها ارتباط دارند (Rhee, 2006). به همین دلیل هموستاز گونه‌های فعال اکسیژن برای بقای سلول‌ها از اهمیت ویژه برخوردار است. بااین‌وجود رابطه بین اثرات دوگانه آنتی‌اکسیدانی و تولید گونه‌های فعال اکسیژن در عصاره گیاه مورینگا اولیفرا هنوز مشخص نشده است.

در این مطالعه پس از القای تومور در موش‌ها، تومورها توسط عصاره مورینگا با دوزهای ۰/۰۲، ۰/۰۴ و ۰/۰۸ گرم بر کیلوگرم وزن بدن تیمار شدند که این نتایج نشان داد که عصاره مورینگا می‌تواند به‌طور معنی‌داری باعث کاهش حجم تومورها بعد از گذشت زمان یک و دو هفته شود. از طرفی میزان حجم تومور در دوز ۰/۰۲ گرم بر کیلوگرم وزن بدن کاهش بیشتری نسبت به دو دوز دیگر داشت. در مطالعه‌ای مشابه، Purwal *et al*. (2010) اثرات ضد سرطانی میوه و برگ‌های مورینگا را در ملانومای مدل موشی مورد ارزیابی قراردادند. آنها عصاره متانولی و هیدروالکلی میوه‌ها و برگ‌های مورینگا را با دوز ۵۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم به‌مدت ۱۵ روز و به صورت خوراکی از طریق دهان به موش‌های C57 سرطانی شده توسط سلول‌های B16F10 تجویز کردند. آنها با بررسی کینتیک رشد تومور نشان دادند که هیچ‌کدام از تیمارهای تهیه‌شده با غلظت ذکرشده پاسخی کامل به عصاره نداده است. در تمام گروه‌ها تأخیر در رشد تومور با افزایش زمان دو برابرشدن حجم مشاهده شد، اما اثر مهاری در رشد تومور برای درمان تومورها کافی نبود (Purwal *et al*., 2010). این نتایج برخلاف نتایج مطالعه حاضر بود. یکی از دلایل اصلی در تفاوت نتایج حاصله به نحوه تجویز عصاره برمی‌گردد، که در مطالعه حاضر به صورت تزریق داخل توموری انجام گرفت، درحالی‌که در مطالعه Purwal *et al*. (2010) به‌صورت خوراکی بود. در روش خوراکی دارو وارد معده و روده شده و دستخوش تغییرات pH و تجزیه تحت آنزیم‌های گوارشی قرار می‌گیرد و میزان ماده مؤثر آن کاهش پیدا می‌کند از طرفی با تغییراتی که روی آن ایجاد می‌گردد، احتمالاً ترکیبات مؤثر که دارای اثرات ضد سرطانی هستند فعالیت آنها کاسته شود و یا از بین برود. در مطالعه حاضر با تزریق

مستقیم به داخل تومور، عصاره بدون هیچ تغییری به‌طور مستقیم در دسترس تومور قرار گرفته و اثر می‌کند. Purwal *et al*. (2010) درنهایت نتیجه گرفتند که مصرف مورینگا به‌عنوان یک غذای گیاهی می‌تواند رشد تومور را به تأخیر انداخته و طول عمر بیماران سرطانی را افزایش دهد.

در این مطالعه مشخص شد که عصاره مورینگا با دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی می‌تواند هم باعث مرگ سلول‌های ملانوما در محیط In Vitro گردد و هم با تزریق در تومورها پس از گذشته یک هفته می‌تواند منجر به کاهش حجم تومورها گردد. با توجه به تجربیات گذشته و بررسی متون تاکنون مطالعه‌ای در این مقیاس با استفاده از عصاره‌ی گیاه Moringa oleifera در مورد ملانوما انجام‌نشده است

نتایج نشان داد که عصاره برگ مورینگا الیفرا حاوی غلظت بالایی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدیکوئرستین، اسید گالیک و اسید کافئیک است. ین عصاره توانست به‌طور معنی‌داری میزان مرگ سلولی را در سلول‌های سرطانی B16F10 افزایش دهد و به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش حجم تومور در موش‌ها بعد از زمان یک هفته گردد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده پیشنهاد می‌گردد در کارایی عصاره مورینگا در درمان سرطان‌های مختلف ارزیابی شود و ایمن بودن آن نیز مورد تأیید قرار گیرد.

REFERENCES

Abdolshahi, A.; Heydari Majd, M.; Sharifi Rad, J.; Taheri, M.; Shabani, A.A.; Jaime, A. (2015). Teixeira Da Silva. Choice of solvent extraction technique affects fatty acid composition of pistachio (*Pistacia vera* L.) oil. *Journal of food science and technology*; 52: 2422-27.

Al-Asmari, A. K.; Albalawi, S. M.; Athar, M. T.; Khan, A. Q.; Al-Shahrani, H.; & Islam, M. (2015). Moringa oleifera as an anti-cancer agent against breast and colorectal cancer cell lines. *PloS one*; 10(8): e0135814.

Al-Sharif, I.; Remmal, A.; Aboussekhra, A. (2013). 'Eugenol triggers apoptosis in breast cancer cells through E2F1/survivin down-regulation'. *BMC cancer*; 13: 1-10.

Ishaqzadeh, A.; Taherkhani,M. (2015). Investigation of total flavonoid content of Moringa oleifera extract grown in glass [in persian]. In *Third National Conference on Recent Innovations in Chemistry and Chemical Engineering*.

Liron, B.; Earon, G.; Ron, I.; Rimmon, A.; Vexler, A.; Lev-Ari, S. (2013). *Moringa Oleifera* aqueous leaf extract down-regulates nuclear factor-kappaB and increases cytotoxic effect of chemotherapy in pancreatic cancer cells. *BMC complementary and alternative medicine*; 13: 1-7.

Chinmoy, B. K. (2007). Possible role of Moringa oleifera Lam. root in epithelial ovarian cancer. *Medscape General Medicine*; 9: 26.

Chinembiri, T. N.; Lissinda, H. Du.; Gerber, P.M.; Hamman, G.S.; Plessis, G. DU. (2014). 'Review of natural compounds for potential skin cancer treatment'. *Molecules*; 19: 11679-721.

Umar, D. M. (1988). Vitamin contents of the flowers and seeds of Moringa oleifera. *Pakistan Journal of Biochemistry*; 21: 21-4.

Zayas-Viera, D. M.; Vivas-Mejia, M. P.; Reyes, R. (2016). Anticancer Effect of Moringa oleifera Leaf Extract in Human Cancer Cell Lines. *Journal of Health Disparities Research & Practice*; 9.

Bich Hang, D.; Hoang, N. S.; Nguyen, T.F.; Chi Ho, N. Q.; Le, T. L.; Doan, CH. (2020). Phenolic Extraction of Moringa Oleifera Leaves Induces Caspase-Dependent and Caspase-Independent Apoptosis through the Generation of Reactive Oxygen Species and the Activation of Intrinsic Mitochondrial Pathway in Human Melanoma Cells.

Nutrition and Cancer; 1-20.

Beatriz, D.; Lopes, J. M.; Soares, P.; Pópulo. H. (2018). Melanoma treatment in review. *ImmunoTargets and therapy*; 7: 35.

Guevara, AP.; Vargas, C.; Milagros, UY. (1996). Anti-inflammtory and antitumor activities of seeds, *Moringa oleifera* L (Moringgaceae). *Philipp J Sci*; 125: 175-84.

Tae Eun, G.; Chung, H. S. (2017). *Moringa oleifera* fruit induce apoptosis via reactive oxygen species dependent activation of mitogen activated protein kinases in human melanoma A2058 cells. *Oncology letters*; 14: 1703-10.

Nagarajan, J.; Narayanasamy, B.; Balasubramanian, D.; Viswanathan, K. (2020). Characterization and effect of *Moringa Oleifera* Lam. antioxidant additive on the storage stability of Jatropha biodiesel. *Fuel*; 281: 118614.

Nurul Ashikin Abd, K.; Din Ibrahim, M.; Kntayya, S.; Rukayadi, Y.; Abd Hamid, H.; Faizal Abdull Razis, A. (2016). *Moringa oleifera* Lam targeting chemoprevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 17: 3675-86.

Mutasim M, K.; Abdellatef, E.; Dafalla, H. M.; Nassrallah, A.; Aboul-Enein, KH.; Lightfoot, D. A.; El-Deeb, F.E.; El-Shemy, H. A. (2010). Active principle from *Moringa oleifera Lam* leaves effective against two leukemias and a hepatocarcinoma. *African Journal of Biotechnology*; 9: 8467-71.

Po-Lin, K.; Chen, CH.; Hsu, Y. (2007). Isoobtusilactone A induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/apoptosis signal-regulating kinase 1 signaling pathway in human breast cancer cells. *Cancer research*; 67: 7406-20.

Marc, L.; Toillon, R. A.; Leclercq, G. (2006). 'p53 and breast cancer. an update', *Endocrine-related cancer*; 13: 293-325.

Mengfei, L.; Zhang, J.; Chen, K. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of functional foods*; 47: 469-79.

Niveen, M.; Dany, M.; Abdoun, S.; Usta. J. (2016). *Moringa oleifera's* nutritious aqueous leaf extract has anticancerous effects by compromising mitochondrial viability in an ROS-dependent manner. *Journal of the American College of Nutrition*; 35: 604-13.

Abdoljalal, M.; Kabir, M. J. (2009). Male skin cancer incidence in Golestan province, Iran. *Journal of the Pakistan Medical Association*; 59: 288-90.

Aline, M.; Lamien, C. E.; Romito, M.; Millogo, J.; Nacoulma, O. G. (2005). Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food chemistry*; 91: 571-77.

Younes, M.; Ghasemi, H. (2013). Medicinal properties of Persian shallot. *European Journal of Experimental Biology*; 3: 371-79.

Moyo, B.; Oyedemi, S.; Masika, P. J.; Muchenje, V. (2012). Polyphenolic content and antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaf extracts and enzymatic activity of liver from goats supplemented with *Moringa oleifera* leaves/sunflower seed cake. *Meat science*; 91: 441-47.

Makoto, O. (1986). Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*; 44: 307-15.

Purwal, L.; Pathak, L.O.; Jain, UK. (2010). In vivo anticancer activity of the leaves and fruits of Moringa oleifera on mouse melanoma. *Pharmacologyonline*; 1: 655-65.

Sue Goo, R. (2006). H2O2, a necessary evil for cell signaling. *Science*; 312: 1882-83.

Miri, S. (2001). Keratinocyte–melanocyte interactions during melanosome

transfer. *Pigment Cell Research*; 14: 236-42.

Siegel, R. L.; Kimberly, D. M.; Hannah, E. F.;, Ahmedin, J. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*; 71: 7-33.

Stadtman, E. R. (2001). Protein oxidation in aging and agerelated diseases. *Annals of the New York Academy of Sciences*; 928: 22-38.

Charlette, T.; Phulukdaree, A.; Chuturgoon, A. (2013). The antiproliferative effect of *Moringa oleifera* crude aqueous leaf extract on cancerous human alveolar epithelial cells. *BMC complementary and alternative medicine*; 13: 1-8.

Jintana, T.; Yamaguchi, N.; Pamonsinlapatham, P.; Wetwitayaklung, P. (2017). Anti-proliferative effect of *Moringa oleifera Lam* (Moringaceae) leaf extract on human colon cancer HCT116 cell line. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 16: 371-78.

Willcox, M. L.; Bodeker, J. (2004). 'Traditional herbal medicines for malaria', *Bmj*; 329: 1156-59.

Williams, P. F.; Catherine, M. O.; Hayward, N.; Whiteman. D. S. (2011). Melanocortin 1 receptor and risk of cutaneous melanoma: A metaanalysis and estimates of population burden. *International Journal of Cancer*; 129: 1730-40.