

## Evaluation of the effects of chrysin- omega-3 and quercetin- omega-3 fatty acids complexes on proliferation and apoptosis in A-735 melanomas cell line

Hamide Malikhan<sup>1</sup>, Elham Siasi Torbati<sup>2</sup>, Ahmad majd<sup>3</sup>, Nematollah Gheibi<sup>4</sup>

1. Ph.D. Student in Molecular Genetic, Department of Genetics, Collage of Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-1741-4181

2. Assistant Professor, Department of Genetic, Collage of Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2204-0508

3. Professor, Department of Biology, Collage of Sciences, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. ORCID ID: I0000-0003-4272-021X

4. Professor, Cellular and Molecular Research Center, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran., (Corresponding Author), Tel:028-22302634, Email: gheibi\_n@yahoo.com, ORCID ID: 0000-0001-7503-0894

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Recent studies on the treatment of melanoma, have focused on designing efficient methods with low side effects. The aim of the present study was to investigate the effect of quercetin- omega-3 and chrysin- omega-3 complexes on proliferation and apoptosis in the A-375 melanoma cell line.

**Materials and Methods:** The cells were cultured and then were treated with different concentrations of quercetin- omega-3 and chrysin- omega-3 complexes. MTT assay and flow cytometry were used to evaluate the effects of the above compounds on the rate of cell proliferation and apoptosis.

**Results:** Chrysin- omega-3 and quercetin- omega-3 complexes in the experimental concentrations, inhibited cell growth in a time and concentration-dependent manner. No significant changes in cell growth rate were observed after 24 and 48 hours of treatment with 0-125 $\mu$ M of chrysin- omega-3 complex. However, concentrations of 150, 175 ,and 200 $\mu$ M chrysin- omega-3 complex significantly decreased the growth of melanoma cells after 24 and 48h ( $p < 0.05$ ). After 72hours, the inhibitory effect was more potent, so that the inhibitory effect was also seen in lower concentrations (100 and 125 $\mu$ m). The highest rate of induction of apoptosis was observed after 72hours ( $p < 0.05$ ). In regard to quercetin- omega-3 complex, the results of the study were similar.

**Conclusion:** Antiproliferative effects of quercetin- omega-3 and chrysin- omega-3 complexes on melanoma cells are very promising, and suggest these compounds can be considered as potential therapeutic candidates.

**Keywords:** Melanoma, Quercetin, Chrysin, Omega-3, Apoptosis

**Received:** Sep 19, 2019

**Accepted:** Oct 3, 2020

**How to cite the article:** Hamide Malikhan, Elham Siasi Torbati, Ahmad majd, Nematollah Gheibi. Evaluation of the effects of chrysin- omega-3 and quercetin- omega-3 fatty acids complexes on proliferation and apoptosis in A-735 melanomas cell line. SJKU 2021;25(6):35-47.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

## بررسی اثر کمپلکس کرایسین و کوئرستین با اسید چرب امگا-۳ بر روی میزان تکثیر و آپتوز در سلول های A-375 ملانوما

حمیده ملیخان<sup>۱</sup>، الهام سیاسی تربتی<sup>۲</sup>، احمد مجد<sup>۳</sup>، نعمت الله غیبی<sup>۴</sup>

۱. دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: ۴۱۸۱-۱۷۴۱-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۲. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: ۰۵۰۸-۲۲۰۴-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۳. استاد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران. کد ارکید: X-۰۰۰۳-۰۰۰۰-۴۲۷۲-۱۰۲۱

۴. استاد، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران (نویسنده مسئول). تلفن: ۲۶۳۴-۲۲۳۰-۰۲۸-۰۰۰۰ پست الکترونیک:

gheibi\_n@yahoo.com. کد ارکید: ۰۸۹۴-۷۵۰۳-۰۰۰۱-۰۰۰۰

### چکیده

**زمینه و هدف:** برای درمان ملانوما، مطالعات اخیر بر طراحی روش های کارآمد و با عوارض جانبی کم، متمرکز شده اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر کمپلکس کوئرستین و کرایسین با امگا-۳ بر میزان تکثیر سلولی و آپتوز در رده سلولی A-375 ملانوما می باشد.

**مواد و روش ها:** سلول های رده A-375 ملانوما کشت داده شده، سپس با غلظت های مختلف کمپلکس کوئرستین و کرایسین با امگا-۳ تیمار شدند. برای بررسی اثر ترکیبات فوق بر میزان تکثیر سلول های ملانوما از تست MTT و برای بررسی اثر آنها بر میزان آپتوز از روش فلوسایتومتری استفاده شد.

**یافته ها:** کمپلکس کرایسین و کوئرستین با امگا-۳ در غلظت های مورد آزمایش، باعث مهار رشد وابسته به زمان و غلظت سلول های ملانوما شد. بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار سلول های با ۱۲۵-۰ میکرومولار کرایسین، تغییر معنی داری بر میزان رشد سلول ها دیده نشد. اما غلظت های ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکرومولار کرایسین در ترکیب با اسید چرب امگا-۳ باعث کاهش معنی دار رشد سلول های ملانوما بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت گردید ( $p < 0.05$ ). بعد از گذشت ۷۲ ساعت، اثر مهار قوی تر بود، به طوری که در غلظت های پایین تر کرایسین (۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومولار) نیز اثر مهار دیده شد. بیشترین القای آپتوز بعد از گذشت ۷۲ ساعت مشاهده شد ( $p < 0.05$ ) نتایج در مورد کوئرستین نیز مشابه بود.

**نتیجه گیری:** اثرات ضد تکثیری ترکیب کوئرستین و کرایسین با امگا-۳ بر روی سلول های ملانوما بسیار امیدوارکننده است و نشان می دهد که این ترکیبات می توانند به عنوان یکی از گزینه های بالقوه درمانی در نظر گرفته شوند.

**کلمات کلیدی:** ملانوما، کوئرستین، کرایسین، امگا-۳، آپتوز

و وصول مقاله: ۹۸/۶/۲۸ اصلاحیه نهایی: ۹۹/۶/۸ پذیرش: ۹۹/۷/۱۲

## مقدمه

ملانوما تهاجمی‌ترین سرطان پوست است که منشاء آن از ملانوسیت‌های پوستی، و ایجاد آن عمدتاً به دلیل اثر پرتوهای فرابنفش است (۱). داده‌های اپیدمیولوژیک، حاکی از افزایش مداوم و چشم‌گیر بروز این سرطان در طی دهه‌های گذشته است (۲). از عوامل خطر دیگر، می‌توان خال‌های چندگانه مادرزادی، قرار گرفتن در معرض عوامل سمی و سرکوب سیستم ایمنی بدن را نام برد (۲). همانند اشکال دیگر سرطان، پیشرفت ملانوما با برخی تغییرات مولکولی در سلول‌های سرطانی مرتبط است که به آن‌ها امکان پایداری و زنده ماندن به هنگام کمبود مواد مغذی، و مقاومت در برابر شرایط نامساعد را می‌دهد (۳). این سلول‌ها می‌توانند سیستم ایمنی میزبان را فریب دهند، در هیپوکسی زنده بمانند، استرس اکسیداتیو ایجاد کنند، و در نهایت تمایل روزافزونی برای متاستاز دارند که خطرناک‌ترین مرحله بیماری در بیماران ملانوم به شمار می‌رود (۴). در طی چند سال گذشته، درمان ملانوما با معرفی رویکردهای جدید از جمله روش‌های هدف‌مند و ایمونولوژیک، پیشرفت‌های چشم‌گیری را نشان داده است و دوره جدیدی در درمان این نوع سرطان، پیش رو وجود دارد (۴).

اسیدهای چرب امگا ۳ (ω-3 یا n-3) خانواده مهمی از اسیدهای چرب اشباع نشده (Polyunsaturated fatty acid: PUFAs) و مواد مغذی مهمی هستند که در رشد طبیعی و توسعه بافت‌های مختلف انسانی نقش دارند (۵-۷). این اسیدهای چرب اشباع نشده بلند زنجیره، به طور عمده از ایکوزاپنتانویک اسید (Eicosapentaenoic Acid: EPA) و دکوزاهگزانویک اسید (Docosahexaenoic Acid: DHA) تشکیل شده‌اند. DHA همراه با غذا، دریافت و یا از طریق اکسیداسیون EPA-β-تامین می‌شود (۸). PUFAهای n-3 به‌جز نقشی که در عملکردهای فیزیولوژیک دارند، می‌توانند بر برخی بیماری‌های مزمن مانند سرطان تأثیر بگذارند. در واقع n-3 PUFAs یا هر

یک از اسیدهای چرب EPA و DHA به صورت خالص می‌توانند فعالیت ضد نئوپلاستیکی انجام دهند، و در پیش‌گیری از سرطان و هم‌چنین در درمان آن نقش مهمی داشته باشند (۶, ۷, ۹, ۱۰). آثار ضدسرطانی این اسیدهای چرب به دلیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در بدن است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که اسیدهای چرب امگا-۳ باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی، القاء آپوپتوز، تعدیل بیان ژن‌های دخیل در تنظیم بقای سلولی، و تنظیم مسیرهای سیگنالینگ مرتبط با مرگ و یا رشد سلولی مثل مسیر WNT/β-catenin، به‌ویژه در ملانوما می‌شوند (۱۱, ۱۲).

از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده است که فلاونوئیدهای طبیعی مانند کوئرستین و کرایسین می‌توانند گزینه‌های مناسبی برای درمان ملانوما باشند (۱۳, ۱۴). کوئرستین یکی از پلی‌فنول‌های موجود در رژیم غذایی است که در میوه‌ها، سبزیجات و سایر محصولات گیاهی از جمله پیاز، کلم بروکلی، کلم، پرتقال، زغال‌اخته، سیب و چای یافت می‌شود (۱۵). کوئرستین فعالیت ضد تکثیری و پیش‌آپوپتوزی را در انواع مختلف سلول‌های سرطانی نشان داده است. کوئرستین به آسانی توسط تائروزیناز به ترکیبات مختلفی تبدیل می‌شود و همین امر، سبب افزایش فعالیت ضد سرطانی آن می‌شود (۱۶). علاوه بر این، با توجه به این‌که بیان تائروزیناز در طول تومورزایی افزایش می‌یابد، و فعالیت آن با تغییرات پیگمنتاسیون در هر دو مرحله ابتدایی و انتهایی آسیب‌های ملانوسیتیک همراه است، پس کوئرستین می‌تواند برای درمان ملانوما استفاده شود (۱۴, ۱۶). کرایسین در غسل و برخی گیاهان وجود دارد (۱۳). مطالعات نشان داده‌اند که کرایسین از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ میتوکندریایی (داخلی) آپوپتوز، آثار ضد تکثیری قوی خود را در ملانوما اعمال می‌کند (۱۳, ۱۷). در نتیجه با توجه به اهمیت این دو فلاونوئید در درمان ملانوما، و نیز نظر به اثرات قوی ضد سرطانی اسیدچرب‌های امگا-۳، هدف پژوهش حاضر آن است تا اثرات کمپلکس

کوئرستین و کرایسین با اسیدهای چرب امگا-۳ را در میزان تکثیر و آپتوتوز سلول‌های رده A-375 ملانوما مورد بررسی قرار دهد.

## مواد و روش‌ها

کشت سلول:

رده سلولی A-375 ملانوما از مجموعه بانک سلولی انستیتو پاستور (تهران، ایران) خریداری شد. محیط DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنینی غیرفعال شده با گرما و 100U/ml پنی سیلین/استرپتومایسین برای کشت سلول‌ها استفاده شد. پلیت‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت CO<sub>2</sub> ۵٪ نگهداری شدند.

بررسی میزان بقا و تکثیر سلولی به روش MTT:

برای تعیین میزان بقا و تکثیر سلول‌ها از روش MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) بر اساس پروتوکول قبلی (۱۸) استفاده شد. به طور خلاصه، ۲۵۰۰ سلول از رده A-375 ملانوما در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۹۶ خانه کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سلول‌ها در معرض غلظت‌های مورد نظر از کمپلکس کوئرستین و کرایسین با امگا-۳ قرار گرفتند. آزمایشات برای هر گروه در سه تکرار و با گروه کنترل تیمار نشده در سه زمان مختلف ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. پس از گذشت زمان‌های مورد نظر، محیط کشت قبلی، حذف و ۲۰۰ μl از محیط DMEM با ۱۰٪ FBS و ۱۰٪ MTT (5 mg/mL) (سیگما، ایالات متحده) اضافه شد. پس از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت دیگر، محصول فورمازون احیا یافته داخل سلولی با جایگزینی ۱۰۰ میکرولیتر از محیط DMEM-1640 با همان حجم دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد. مقادیر جذب در ۵۷۰ نانومتر با دستگاه میکروپلیت‌ریدر (BioTek ELX800, USA) اندازه‌گیری شد. غلظت مهار کننده نصف حداکثر (IC<sub>50</sub>) از هر آزمایش محاسبه شد.

بررسی میزان آپتوتوز با روش فلوسایتومتری:

سلول‌ها (۱۰۰۰۰ سلول) در مراحل اولیه و انتهایی آپتوتوز با رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC و پروپیدایومیدید (PI) کیت تجاری شرکت IQ product، و با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری BD FACS Calibur (BD biosciences, San Jose, CA, USA) شناسایی قرار گرفتند. به طور خلاصه، سلول‌های A-375 در پلیت‌های ۶ خانه با تراکم  $10^5 \times 2/5$  کشت داده شدند و با غلظت‌های محاسبه شده برای IC<sub>50</sub> هر یک، یعنی ۱۵۲، ۱۴۹ و ۱۳۰ میکرومولار کرایسین، و ۱۹۰، ۹۳ و ۱۸۱ میکرومولار کمپلکس کوئرستین با امگا-۳، به ترتیب هر یک به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شدند. برای رنگ‌آمیزی، سلول‌ها با PBS شسته و با بافر اتصال انکوبه شدند. به ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی، ۵ میکرولیتر از انکسین V-FITC و ۱۰ میکرولیتر از ترکیب PI اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد (۱۸). سپس سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

آنالیز آماری:

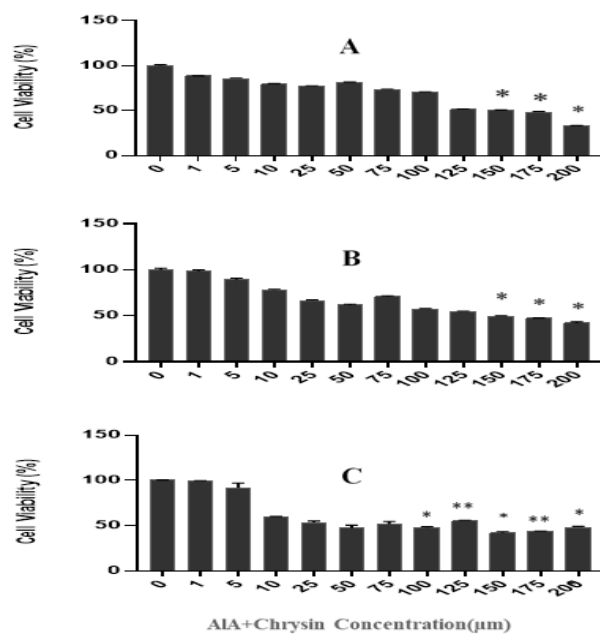
کلید نتایج حاصل از این مطالعه در رابطه با MTT و فلوسایتومتری با استفاده از روشهای آماری one way ANOVA و two way ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفته و نمودارها در هر دو مورد با استفاده از نرم افزار گراف پد، با سطح معنی داری  $p < 0.05$  گزارش شده‌اند.

## یافته‌ها

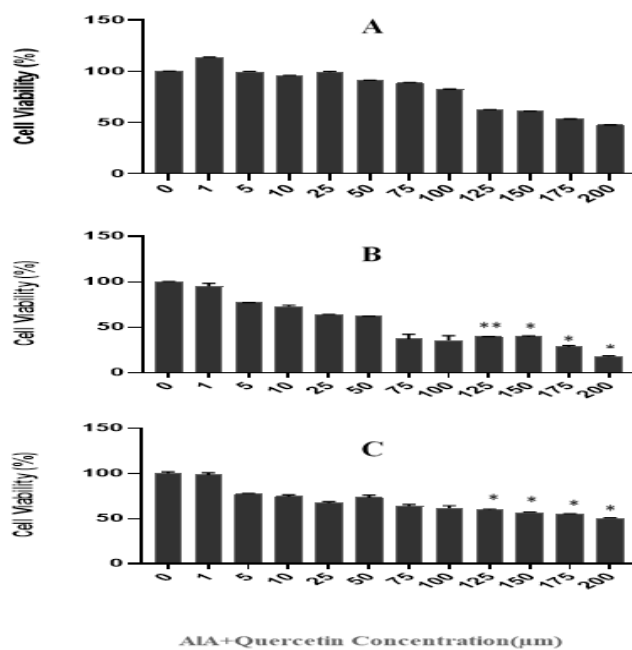
تیمار سلول‌ها با غلظت‌های (۲۰۰-۰ میکرومولار) کمپلکس کرایسین با اسید چرب امگا-۳ باعث مهار معنی‌دار رشد سلول‌های ملانوما به صورت وابسته به غلظت و وابسته به زمان شد. همان‌طور که در شکل ۱ نشان داده شده است، بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از تیمار سلول‌ها با ۱۲۵-۰ میکرومولار کمپلکس کرایسین با اسید چرب امگا-۳، تغییر

ولی کمپلکس کوئرستین با امگا ۳ در همین زمان‌ها، در غلظت ۱۰۰ نیز اثر را نشان داد. هم‌چنین در زمان ۷۲ ساعت، اثر مهاری برای کرایسین در غلظت‌های ۱۰۰ و ۱۲۵ نیز مشاهده شد که این امر در مورد کوئرستین مربوط به غلظت پایین‌تر یعنی ۷۵ میکرومولار بود. در مرحله بعد، برای بررسی تاثیر کمپلکس کرایسین و کوئرستین با اسیدهای چرب امگا-۳ بر میزان آپوپتوز رده سلولی A-375 ملانوما، از روش فلوسایتومتری با انکسین-V استفاده شد. ابتدا سلول‌ها با غلظت‌های محاسبه شده برای IC50 هر یک یعنی ۱۵۲، ۱۴۹ و ۱۳۰ میکرومولار کرایسین و ۱۹۰، ۹۳ و ۱۸۱ میکرومولار کمپلکس کوئرستین با اسید چرب امگا-۳، به ترتیب هر یک به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، بیشترین القای آپوپتوز بعد از گذشت ۷۲ ساعت رخ داده است ( $p < 0.05$ ). طبق شکل ۴، نتایج در مورد کوئرستین نیز مشابه بود و تیمار سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت اثر قوی‌تری بر میزان القای آپوپتوز در سلول‌های ملانوما داشت ( $p < 0.05$ ) کمپلکس کرایسین یا کوئرستین با اسیدهای چرب امگا-۳ با غلظت‌های فوق باعث القای معنی‌دار آپوپتوز به صورت وابسته به زمان و غلظت گردید؛ به‌طوری که قوی‌ترین اثر بعد از گذشت ۷۲ ساعت و در غلظت‌های بالاتر دیده شد (شکل ۵)

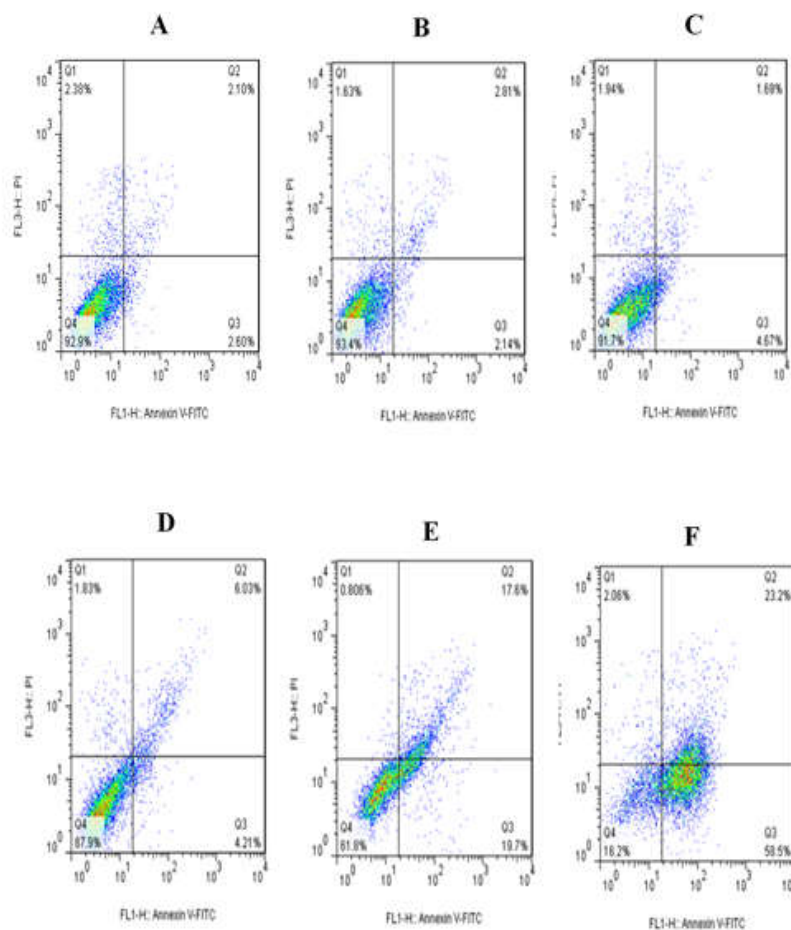
معنی‌داری در میزان رشد سلول‌ها دیده نشد. اما غلظت‌های ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکرومولار کمپلکس کرایسین با اسیدچرب امگا-۳ باعث کاهش معنی‌دار رشد سلول‌های ملانوما بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت گردید ( $p < 0.05$ ). بعد از گذشت ۷۲ ساعت اثر مهاری قوی‌تر بود، به طوری-که در غلظت‌های پایین‌تر کرایسین (۱۰۰ و ۱۲۵ میکرومولار) نیز اثر مهاری دیده شد. یافته‌های حاصل در مورد کمپلکس کوئرستین با اسید چرب امگا-۳ نیز مشابه بود. اثرات مهاری این ترکیب نیز وابسته به غلظت و زمان بود (شکل ۲). بعد از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت در محدوده غلظتی ۲۰۰-۱۲۵ میکرومولار کوئرستین، بیشترین اثر مهاری بر میزان رشد سلولی سلول‌های ملانوما دیده شد ( $p < 0.05$ ). میزان مهار در غلظت‌های کمتر (۱۰۰-۰ میکرومولار) از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. از طرفی ۷۲ ساعت بعد از تیمار سلول‌ها با غلظت ۲۰۰-۷۵ میکرومولار کمپلکس کوئرستین با اسیدچرب امگا-۳، مهار رشد سلول‌ها از لحاظ آماری معنی‌دار بود که نشان دهنده اثرات قوی‌تر در مقایسه با ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار می‌باشد. با مقایسه نتایج فوق، اثر مهاری کمپلکس کوئرستین با امگا ۳، در هر سه زمان مورد مطالعه، بیشتر از اثر مهاری کمپلکس کرایسین با امگا ۳ نشان داده شد؛ به این صورت که در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، کمپلکس کرایسین با امگا ۳ در غلظت‌های پایین‌تر از ۱۲۵ میکرومولار اثر مهاری معنی‌دار نشان نداد،



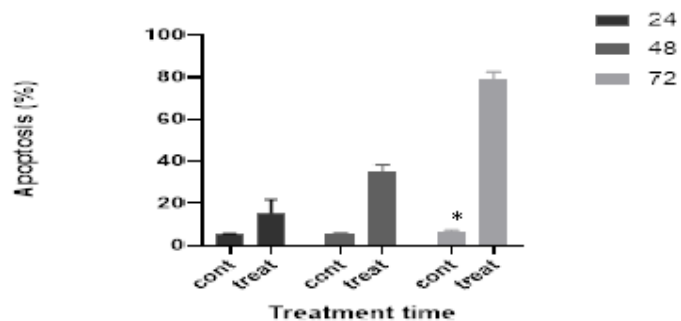
شکل ۱. آنالیز بقای سلول‌ها پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف کمپلکس کرایسین با امگا-۳  
A: پس از ۲۴ ساعت، B: پس از ۴۸ ساعت، C: پس از ۷۲ ساعت



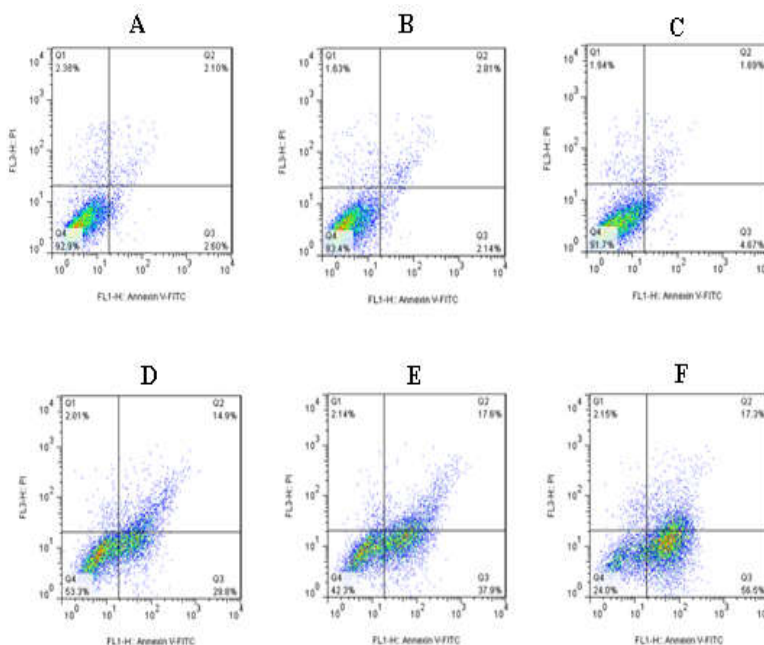
شکل ۲. آنالیز بقای سلول‌ها پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف کمپلکس کوئرستین با ترکیب امگا-۳  
A: پس از ۲۴ ساعت، B: پس از ۴۸ ساعت، C: پس از ۷۲ ساعت



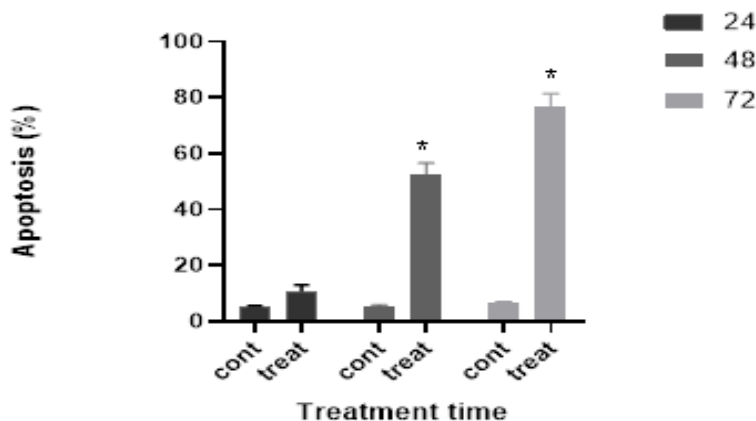
شکل ۳. نتایج مربوط به آزمون رنگ آمیزی Annexin/PI سلول‌های A: کنترل ۲۴ ساعت، B: کنترل ۴۸ ساعت، C: کنترل ۷۲ ساعت، D: تیمار شده با غلظت ۱۵۲ μm کمپلکس کرایسین با امگا-۳ بعد از ۲۴ ساعت، E: تیمار شده با غلظت ۱۴۹ μm کمپلکس کرایسین با امگا-۳ بعد از ۴۸ ساعت، F: تیمار شده با غلظت ۱۳۰ μm کمپلکس کرایسین با امگا-۳ بعد از ۷۲ ساعت.



شکل ۴. مقایسه میزان آپوپتوز سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۵۲ μm، ۱۴۹ μm و ۱۳۰ μm کمپلکس کرایسین با امگا-۳ به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با کنترل



شکل ۵. نتایج مربوط به آزمون رنگ آمیزی Annexin/PI سلول‌های A: کنترل ۲۴ ساعت، B: کنترل ۴۸ ساعت، C: کنترل ۷۲ ساعت، D: تیمار شده با غلظت ۱۹۰µm کمپلکس کوئرستین با امگا-۳ بعد از ۲۴ ساعت، E: تیمار شده با غلظت ۹۳µm کمپلکس کوئرستین با امگا-۳ بعد از ۴۸ ساعت، F: تیمار شده با غلظت ۱۸۱µm کمپلکس کوئرستین با امگا-۳ بعد از ۷۲ ساعت.



شکل ۶. مقایسه میزان آپوپتوز سلول‌های تیمار شده با غلظت‌های ۱۹۰µm، ۹۳µm و ۱۸۱µm کمپلکس کوئرستین با امگا-۳ به ترتیب به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با کنترل

به زمان و غلظت شد. از طرفی این ترکیبات باعث القای قوی آپوپتوز نیز شدند. در دهه گذشته نتایج مطالعات اپیدمیولوژیک بیانگر اثرات مهای اسیدهای چرب امگا-۳

بحث  
در مطالعه حاضر، تیمار سلول‌های A-375 ملانوما با غلظت‌های مختلف کمپلکس کرایسین و کوئرستین با اسیدهای چرب امگا-۳، باعث مهار رشد به صورت وابسته

پروتازوم را افزایش می‌دهند؛ در حالی که اسیدهای چرب اشباع، عملکرد متضادی دارند (۲۶).

بیوستنز ملانین و سایر رنگدانه‌ها در ملانوسیت‌ها توسط آنزیمی حاوی مس به نام تایروزیناز، کاتالیز می‌شود (۱۶). تایروزیناز، هیدروکسیلاسیون تیروزین به دی-هیدروکسی‌فیل‌آلانین (L-DOPA) و L-DOPA به دوپاکوئینین را کاتالیز می‌کند. کوئینون‌ها به نوبه خود به ملانین و دیگر ترکیبات پلی‌فنولی تبدیل می‌شوند (۲۹). سنتز ملانین سبب تولید پراکسید هیدروژن و دیگر گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) شده و این امر سبب می‌شود ملانوسیت‌ها تحت استرس شدید اکسیداتیو قرار بگیرند (۳۰).

در میان ترکیبات طبیعی، فلاونوئیدها، ترکیباتی پلی‌فنولی با وزن مولکولی کم و از لحاظ شیمیایی دارای ساختار فنیل بنزوپیرون (C6-C3-C6) هستند و بر اساس سطح اشباع، جانشینی حلقه C و باز بودن حلقه مرکزی پیرون به گروه‌های مختلفی تقسیم می‌شوند (۳۱). مطالعات بیولوژیکی و فارماکولوژیکی نشان می‌دهند که پلی‌فنول‌های رژیم غذایی، مانند کوئرستین و کرایسین، دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی، ضد چاقی، ضد سرطانی و سایر خواص می‌باشند (۲۸، ۳۲، ۳۳). به‌ویژه نقش ضد سرطانی کوئرستین و کرایسین به طور گسترده در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفته است (۳۴). اتیولوژی و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها به طور مستقیم با استرس اکسیداتیو ناشی از عدم تعادل بین تشکیل و خنثی‌سازی اکسیدان‌ها، مرتبط است (۳۵-۳۸). اثرات مفید کوئرستین بر روی بافت‌های طبیعی به مکانیسم‌های مختلف، به ویژه اثرات آنتی‌اکسیدانی آن نسبت داده شده است. در خانواده فلاونوئیدها، کوئرستین قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان در برابر گونه‌های اکسیداتیو واکنش‌پذیر (ROS) است و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی آن عمدتاً به دلیل وجود گروه‌های هیدروکسیل روی حلقه فنلی B است (۳۹). اثرات ضد سرطانی کوئرستین در سرطان‌های روده بزرگ، کبد و

در سرطان‌های مختلف می‌باشد. به عنوان مثال، تیمار سلول‌های سرطانی کولورکتال با اسیدهای چرب امگا-۳ موجب مهار رشد سلول‌ها و القای آپوپتوز با تجمع سلول‌ها در فاز G2/M شد (۱۹، ۲۰). در مطالعه‌ای دیگر، Hawcroft و همکارانش با تیمار سلول‌های سرطانی روده بزرگ با اسیدهای چرب امگا-۳ باعث کاهش رشد تومور و کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی شدند (۲۱). Sam و همکاران در مطالعه‌ای بر روی سلول‌های سرطانی خون نشان دادند که اسیدهای چرب امگا-۳ به صورت وابسته به زمان و وابسته به غلظت باعث مهار سلول‌های سرطانی می‌شوند (۲۲). نتایج مشابه در سرطان ملانوما نیز مشاهده شده است که در آن، تیمار سلول‌های سرطانی ملانوما با اسیدهای چرب امگا-۳ باعث مهار قوی سلول‌های سرطانی و القای آپوپتوز و نیز مهار متاستاز شده است (۲۳). رحمانی و همکاران نیز در پژوهش خود، علاوه بر بررسی اثر اسیدهای چرب امگا-۳ بر روی بیان ژن Wt-1، اثر آنتی‌پرولیفراتیو آن بر روی سلول‌های رده MIA PaCa-2 (سرطان پانکراس) را در غلظت‌های ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرومولار نشان دادند (۲۴). در مطالعه‌ای دیگر، اسیدهای چرب امگا-۳ و امگا-۶ اثر قابل توجهی بر بقای سلول‌های SKOV-3 (سلول‌های سرطانی تخمدان) نشان ندادند ولی قادر به القای آپوپتوز در آنها بودند؛ این مطالعه پیشنهاد داد اثر این اسیدهای چرب بر بقای سلول‌ها بستگی به غلظت آنها و هم چنین بستگی به نوع سلول مورد مطالعه دارد؛ به این صورت که در غلظت‌های پایین (۵۰۰-۳۰۰ میکرومولار) سبب پیشرفت چرخه سلولی و در غلظت‌های بالای ۵۰۰ میکرومولار سبب مهار رشد سلول‌های SKOV-3 می‌شود. غلظت‌های مشخصی (Critical concentration) از اسیدهای چرب قادر به مقابله با سلول‌های سرطانی خواهند بود که این غلظت به نوع سلول و نوع اسید چرب بستگی دارد (۲۵). هم چنین اسیدهای چرب غیر اشباع، تخریب تایروزیناز توسط کمپلکس

تکثیر زیادی دارد ولی استفاده از آن به دلیل این که مستعد اکسیداسیون است، محدود است؛ ترکیب اسیدهای چرب غیر اشباع با فلاونوئیدهای مشخصی با خواص آنتی اکسیدانی قوی، آنها را از اکسیداسیون محافظت و خواص بیولوژیکی فلاونوئیدها را افزایش می دهد. استرهای Q3G خواص آنتی اکسیدانی تشدید یافته ای به خاطر افزایش لیپوفیلیسته نشان داده اند. همچنین آنتی اکسیدانت های لیپوفیلیک و هیدروفوبیک، در محیط های با لیپوفیلیسته مختلف، اثرات متفاوتی خواهند داشت (۴۵).

مطالعات نشان داده اند علاوه بر کوئرستین، کرایسین نیز یک ترکیب پلی فنولی قوی با اثرات مهاری بر روی سلول های سرطانی مختلف به ویژه ملانوما می باشد. برای مثال، Xue و همکاران گزارش کرده اند که کرایسین باعث مهار رشد سلول های سرطانی ملانوما بدون تاثیر بر روی سلول های سالم از طریق فعال سازی مسیر میتوکندریایی آپوپتوز می شود (۱۳). از طرفی، Sassi و همکاران نیز نشان دادند که در مدل حیوانی و نیز رده های سلولی ملانوما، کرایسین باعث القای آپوپتوز و مهار رشد تومور می شود (۱۷). مطالعه جمالی و همکاران نشان داد استریفیکاسیون امگا-۳ با کرایسین اثر مهاری از نوع رقابتی بر روی تایروزیناز قارچی دارد. این مطالعه به وضوح نشان داد الحاق دو ماده اسید چرب امگا-۳ و امگا-۶ با کرایسین در قالب مشتقات جدید، آثار مهاری قوی تری نسبت به هر یک از این ترکیبات به صورت جداگانه دارد (۲۶).

### نتیجه گیری

در پژوهش حاضر، برای اولین بار اثر کمپلکس کوئرستین و کرایسین با اسید چرب امگا-۳ بر روی میزان تکثیر و آپوپتوز سلول های سرطانی ملانوما بررسی گردید. مطابق با مطالعات فوق، این مطالعه کاهش معنی دار تکثیر در این سلولها به صورت وابسته به زمان و غلظت را نشان داد. هم چنین بررسی نتایج حاصل از تکنیک فلوسایتومتری، بعد از تیمار سلول ها با این ترکیبات، افزایش معنی دار مرگ

ملانوما نیز به طور مستقیم با خصوصیات آنتی اکسیدانی آن مرتبط است. کوئرستین مهار کننده قوی رشد سلول های سرطانی ملانوما و القا کننده آپوپتوز می باشد (۴۰). مطالعات نشان داده اند که اثرات کوئرستین به غلظت آن در بافت، نحوه متابولیسم و دسترسی زیستی به آن بستگی دارد (۴۳). در مطالعه راپاسینگ و همکاران با عنوان بررسی فعالیت آنتی پرولیفراتیو آسپل های بلند زنجیره استری شده با کوئرستین گلوکوزید (Quercetin-3-O-glucoside) بر سلول های HepG2 کارسینوما هیپاتوسلولار، شش اسید چرب از جمله EPA و DHA با کوئرستین-۳-O-گلوکوزید (فرم رایج کوئرستین در گیاهان) بصورت آنزیماتیک، استریفیه شده و اثرات آنتی پرولیفراتیو آنها بر سلول های HepG2 کارسینوما هیپاتوسلولار در مقایسه با دو داروی شیمی درمانی به نام های سیس پلاتین و سورافنیب، بررسی گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که استر اسیدهای چرب با کوئرستین گلوکوزید، اثر مهاری قابل توجهی بر سلول های HepG2 داشت؛ به طوری که پس از ۶ تا ۲۴ ساعت تیمار سلولی با این استرها، رشد ۸۵ تا ۹۰٪ از سلولها مهار گردید. این در حالی است که استر اسیدهای چرب با کوئرستین گلوکوزید، نسبت به داروی سورافنیب، اثر سمی ناچیزی بر سلول های نرمال کبدی داشت (۴۴). در مطالعه ای دیگر، استرهای EPA, DHA و ALA با Q3G، در مقایسه با Q3G به تنهایی، اثر مهاری قابل توجهی بر اکسیداسیون LDL القا شده با  $Cu^{2+}$  و رادیکال پراکسیل داشتند. در نهایت، نتایج این مطالعه نشان داد که استریفیکاسیون خاصیت لیپوفیلیسته آنتی اکسیدانت-ها را افزایش داده، کوئرستین استریفیه شده با اسیدهای چرب، لیپوفیلیسته بیشتری از کوئرستین غیر کوئزوگه داشته، و قدرت بیشتری برای مهار اکسیداسیون لیپیدهایی مانند LDL دارد.

افزایش لیپوفیلیسته دسترسی زیستی فلاونوئیدها را تحت تاثیر قرار می دهد و می تواند جذب سلولی و در نتیجه دسترسی زیستی آنها را افزایش دهد. امگا-۳ خواص ضد

تر نسبت به کرایسین مشاهده شد. به این ترتیب استفاده از کمپلکس‌های فوق برای درمان ملانوما می‌تواند بسیار امیدبخش باشد. لذا بررسی اثرات ضد توموری این ترکیبات جدید در مطالعات *In vivo* و بررسی کامل ویژگی‌های ضد سرطانی آنها پیشنهاد می‌گردد.

### تشکر و قدردانی

ضمن سپاس و قدردانی از حمایت معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی قزوین و واحد تهران شمال دانشگاه آزاد اسلامی، در این مطالعه هیچ حمایت مالی و تعارض منافع وجود ندارد. کد کمیته اخلاق این پژوهش IR.QUMS.REC.1397.329 می‌باشد.

سلولی به روش آپوتوز را به صورت وابسته به غلظت و زمان نشان داد. نتایج این مطالعه در قیاس با مطالعات ذکر شده، نشان می‌دهد که عملکرد ضد توموری کمپلکس اسیدهای چرب امگا-۳ با کوئرستین و کرایسین بر روی سلول‌های ملانوما، قوی‌تر از اثر هر یک از آنها به تنهایی، و هم‌چنین اثر کمپلکس کوئرستین با امگا-۳، قوی‌تر از اثر کمپلکس کرایسین با آن است. به این صورت که در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت، کمپلکس کرایسین با امگا-۳ در غلظت‌های پایین فاقد اثر مهاری معنی‌دار، ولی کمپلکس کوئرستین با امگا-۳ در این زمان‌ها، با وجود غلظت پایین‌تر، واجد اثر مهاری بر سلول‌های ملانوما بود. هم‌چنین، اثر مهاری برای کوئرستین در زمان ۷۲ ساعت، در غلظتی پایین-

### منابع

- Geller AC, Clapp RW, Sober AJ, Gonsalves L, Mueller L, Christiansen CL, et al. Melanoma epidemic: an analysis of six decades of data from the Connecticut Tumor Registry. *J Clin Oncol*. 2013;31(33):4172.
- Mattia G, Puglisi R, Ascione B, Malorni W, Carè A, Matarrese P. Cell death-based treatments of melanoma: conventional treatments and new therapeutic strategies. *Cell Death Dis*. 2018;9(2):112.
- Apalla Z, Lallas A, Sotiriou E, Lazaridou E, Ioannides D. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatol Pract Concept*. 2017;7(2):1.
- Matarrese P, Ascione B, Ciarlo L, Vona R, Leonetti C, Scarsella M, et al. Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: an in vitro and in vivo study. *Mol cancer*. 2010;9(1):207.
- Burlingame B, Nishida C, Uauy R, Weisell R. Fats and fatty acids in human nutrition: introduction. *Ann Nutr Metab*. 2009;55(1-3):5-7.
- Riediger ND, Othman RA, Suh M, Moghadasian MH. A systemic review of the roles of n-3 fatty acids in health and disease. *J Am Diet Assoc*. 2009;109(4):668-79.
- Calder PC. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: effects, mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1851(4):469-84.
- Abdi J, Garssen J, Faber J, Redegeld F. Omega-3 fatty acids, EPA and DHA induce apoptosis and enhance drug sensitivity in multiple myeloma cells but not in normal peripheral mononuclear cells. *J Nutr Biochem*. 2014;25(12):1254-62.
- Molfino A, Amabile MI, Mazzucco S, Biolo G, Farcomeni A, Ramaccini C, et al. Effect of oral docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on DHA levels and omega-3 index in red blood cell membranes of breast cancer patients. *Front Physiol*. 2017;8:549.
- Bhagat U, Das UN. Potential role of dietary lipids in the prophylaxis of some clinical conditions. *Arch Med Sci*. 2015;11(4):807.

11. Serini S, Zinzi A, Vasconcelos RO, Fasano E, Riillo MG, Celleno L, et al. Role of  $\beta$ -catenin signaling in the anti-invasive effect of the omega-3 fatty acid DHA in human melanoma cells. *J Dermatol Sci*. 2016;84(2):149-59.
12. Serini S, Fasano E, Piccioni E, Monego G, Cittadini AR, Celleno L, et al. DHA induces apoptosis and differentiation in human melanoma cells in vitro: involvement of HuR-mediated COX-2 mRNA stabilization and  $\beta$ -catenin nuclear translocation. *Carcinogenesis*. 2011;33(1):164-73.
13. Xue C, Chen Y, Hu DN, Jacob C, Lu C, Huang Z. Chrysin induces cell apoptosis in human uveal melanoma cells via intrinsic apoptosis. *Oncol Lett*. 2016;12(6):4813-20.
14. Harris Z, Donovan MG, Branco GM, Limesand KH, Burd R. Quercetin as an emerging anti-melanoma agent: a four-focus area therapeutic development strategy. *Front Nutr*. 2016;3:48.
15. Russo GL, Ungaro P. Epigenetic Mechanisms of Quercetin and Other Flavonoids in Cancer Therapy and Prevention. *Epigenetics of Cancer Prevention*: Elsevier; 2019. 187-202.
16. Kubo I, Nitoda T, Nihei K-i. Effects of quercetin on mushroom tyrosinase and B16-F10 melanoma cells. *Molecules*. 2007;12(5):1045-56.
17. Sassi A, Maatouk M, Bz  ouich IM, Hatira SA-B, Jemni-Yacoub S, Ghedira K, et al. Chrysin, a natural and biologically active flavonoid suppresses tumor growth of mouse B16F10 melanoma cells: In vitro and In vivo study. *Chem Biol Interact*. 2018;283:10-9.
18. Yousefi R, Imani M, Ardestani SK, Saboury AA, Gheibi N, Ranjbar B. Human calprotectin: effect of calcium and zinc on its secondary and tertiary structures, and role of pH in its thermal stability. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2007;39(10):795-802.
19. Jordan A, Stein J. Effect of an omega-3 fatty acid containing lipid emulsion alone and in combination with 5-fluorouracil (5-FU) on growth of the colon cancer cell line Caco-2. *Eur J Nutr*. 2003;42(6):324-31.
20. Kalbkhani F, Sam MR. The effect of fish-oil derived eicosapentaenoic acid on cell proliferation and caspase-3 activity in human colorectal cancer cell line. *Tehran Univ Med J*. 2018;76(6):374-9.
21. Hawcroft G, Loadman PM, Belluzzi A, Hull MA. Effect of eicosapentaenoic acid on E-type prostaglandin synthesis and EP4 receptor signaling in human colorectal cancer cells. *Neoplasia*. 2010;12(8):618.
22. Sam MR, Esmaeillou M, Sam S, Shokrgozar MA. Fish-oil-derived eicosapentaenoic acid decreases survivin expression and induces wt-p53 accumulation with caspase-3 activation in acute lymphoblastic leukemia cells. *Hum Exp Toxicol*. 2018;37(7):714-24.
23. Li J, Chen CY, Arita M, Kim K, Li X, Zhang H, et al. An omega-3 polyunsaturated fatty acid derivative, 18-HEPE, protects against CXCR4-associated melanoma metastasis. *Carcinogenesis*. 2018;39(11):1380-8.
24. Rahmani B, Naserpour Farivar T, Azad M, Sahmani M, Gheibi N. The effects of omega-3 PUFA (ALA) on WT1 gene expression in pancreatic cancer cell line (MIA PaCa-2). *World Family Medicine*. 2018;16(2):275-281.
25. Hajjghasemi S, Azad M, Karimipoor M, Rahimi H, Foroughi F, et al. (2018) Dual Effects of Omega -6, and -9 Fatty Acids on Ovarian Cancer Cell Viability and Their Ability to Induce Apoptosis. *Adv Proteomics Bioinform: APBI-106*. DOI: 10.29011/APBI -106.100006
26. Jamali Z, Zare K, Gheibi N. Effect of chrysin omega-3 and 6 fatty acid esters on mushroom tyrosinase activity, stability, and structure. *J Food Biochem*. 2018;e12728.

27. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaite E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med.* 1999;26:107–116.
28. Gheibi N, Taherkhani N, Ahmadi A, Haghbeen K, Ilghari D. Characterization of inhibitory effects of the potential therapeutic inhibitors, benzoic acid and pyridine derivatives, on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase. *Iran J Basic Med Sci.* 2015;18(2):122-9.
29. Baharara J, Tayarani Najjaran Z, Amini E, Salek F. The Inhibitory Effect of Crocin on Melanogenesis of B16F10 Melanoma Cell Line. *JSSU.* 2016; 24 (6) :479-490.
30. Abdolmaleki F, Gheibi N, Ahmadpour Yazdi H. Inhibitory Effect of Myricetin on Melanoma Cells (A375). *Novel Biomed.* 2017;5(3):104-8.
31. Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. *J Agric Food Chem.* 2006; 54(26):9798-804.
32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:933–956.
33. Nam JS, Sharma AR, Nguyen LT, Chakraborty C, Sharma G, Lee SS. Application of Bioactive Quercetin in Oncotherapy: From Nutrition to Nanomedicine. *Molecules.* 2016; 21(1):E108.
34. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens.* 2000; 18(6):655-73.
35. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7(1):65-74.
36. Reddy VP, Zhu X, Perry G, Smith MA. Oxidative stress in diabetes and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis.* 2009;16(4):763-74.
37. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Jul;18(7):1272-80.
38. Murota K, Terao J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. *Arch Biochem Biophys.* 2003 ;417(1):12-7
39. Tanigawa S, Fujii M, Hou DX. Stabilization of p53 is involved in quercetin-induced cell cycle arrest and apoptosis in HepG2 cells. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2008;72(3):797-804.
40. Ranelletti FO, Maggiano N, Serra FG, Ricci R, Larocca LM, Lanza P, Scambia G, Fattorossi A, Capelli A, Piantelli M. Quercetin inhibits p21-RAS expression in human colon cancer cell lines and in primary colorectal tumors. *Int J Cancer.* 2000; 85(3):438-45.
41. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene.* 2003; 22(20):3138-51.
42. Awad HM, Boersma MG, Vervoort J, Rietjens IM. Peroxidase-catalyzed formation of quercetin quinone methide-glutathione adducts. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 378(2):224-33.
43. Sudan S., Rupasinghe H. V. Antiproliferative activity of long chain acylated esters of quercetin-3-O-glucoside in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Exp. Biol. Med.* 2015; 240(11): 1452–64.
44. Warnakulasuriya SN, Ziaullah, Rupasinghe HP. Long chain fatty acid acylated derivatives of quercetin-3-o-glucoside as antioxidants to prevent lipid oxidation. *Biomolecules.* 2014; 4(4):980-93