



Research Article

Effect of Hydroalcoholic Extract of Prosopis Farcta Fruit on the Toxicity Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cell Line In Vitro

Mahdi Taghadosi¹, Mona Pazhouhi², Kaveh Shahveisi³, Fuzieh Khani-hematabadi⁴, Zahra Khalvandi⁵, Cyrus Jalili^{6*}

¹Associate Professor, Department of Immunology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

²Researcher, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

³Assistant Professor, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁴Assistant Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁵Student, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

⁶Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

*Corresponding author: Cyrus Jalili, Professor, Department of Anatomical Sciences, Faculty of Medicine, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran. E-mail: cjalili@yahoo.com.

DOI: [10.32592/nkums.16.1.44](https://doi.org/10.32592/nkums.16.1.44)

How to Cite this Article:

Taghadosi M, Pazhouhi M, Shahveisi K, Khani-hematabadi F, Khalvandi Z, Jalili C. Effect of Hydroalcoholic Extract of Prosopis Farcta Fruit on the Toxicity Induced by Temozolomide in Glioblastoma Cell Line In Vitro. J North Khorasan Univ Med Sci. 2024;16(1):44-53. DOI: 10.32592/nkums.16.1.44

Received: 10 Sep 2023

Accepted: 25 Dec 2023

Keywords:

Cell tototoxicity
Drug resistance
Glioblastoma multiforme
MGMT gene
Prosopis farcta
Temozolomide

Abstract

Introduction: Glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most common human brain tumors. The use of temozolomide drug can be mentioned among the treatment methods. Researchers are trying to use methods to overcome resistance to temozolomide. Regarding the anticancer effects of Prosopis farcta in traditional Iranian medicine, the present study aimed to investigate the effect of the fruit hydroalcoholic extract of Prosopis farcta on the toxicity induced by temozolomide in the GBM cell line.

Method: The T98G cell line was treated with plant extract and temozolomide. The cell survival rate was evaluated by MTT assay. The type of interaction between herbal extract and temozolomide was evaluated using the MTT test and Compusyn software. In addition, the amount of nitric oxide production in cancer cells was measured. Furthermore, the expression of the O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) gene was evaluated by Real-time PCR.

Results: Hydroalcoholic extract of the plant and temozolomide decreased cell viability in a concentration- and time-dependent manner. The combination of extract and temozolomide had a synergistic effect in reducing cell survival. The hydroalcoholic extract and/or temozolomide caused a significant decrease in nitric oxide production and secretion ($P < 0.05$). Considering the expression of MGMT, the hydroalcoholic extract and temozolomide significantly decreased and increased the expression of this gene, respectively ($P < 0.05$). Simultaneous treatment caused a significant decrease in MGMT expression compared to the group treated with temozolomide ($P < 0.05$).

Conclusion: The combination of Prosopis farcta fruit extract and temozolomide had synergistic antitumor potential in GBM cells. This extract could reduce cellular resistance to temozolomide through the downregulation of MGMT expression.



بررسی اثر عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک (*Prosopis Farcta*) بر سمیت القاشده توسط تموزولومید در رده سلولی گلیوبلاستوم در شرایط برون تنی

مهدی تقدسی^۱، مونا پژوهی^۲، کاوه شاه ویسی^۳، فوزیه خانی-همت آبادی^۴، زهرا خالوندی^۵، سیروس جلیلی^{۶*}

^۱دانشیار گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۲پژوهشگر گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۳استادیار گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۴استادیار گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۵دانشجوی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
^۶استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
*نویسنده مسئول: سیروس جلیلی، استاد گروه علوم تشریح، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران.
ایمیل: cjalili@yahoo.com

DOI: 10.32592/nkums.16.1.44

چکیده	تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۰۴
مقدمه: گلیوبلاستوم مولتی فرم (GBM) از تومورهای شایع مغزی انسان است. از روش‌های درمان این بیماری می‌توان به استفاده از داروی تموزولومید اشاره کرد. با توجه به مقاومت و عود تومور پس از تیمار با تموزولومید، محققان درصدد این برآمدند که از روش‌هایی برای غلبه بر مقاومت به تموزولومید استفاده کنند. با توجه به اثرهای ضدسرطانی جغجغه یا کهورک (<i>Prosopis farcta</i>) در طب سنتی ایران، هدف مطالعه حاضر بررسی اثر عصاره میوه گیاه کهورک بر سمیت القاشده توسط تموزولومید در رده سلولی GBM است.	واژگان کلیدی: گیاه کهورک تموزولومید گلیوبلاستوم مولتی فرم مقاومت دارویی سمیت سلولی ژن <i>MGMT</i>
روش کار: رده سلولی گلیوبلاستوم (T98G) با غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی و تموزولومید تیمار شد. میزان بقای سلولی با روش MTT ارزیابی شد. نوع اینترکشن بین عصاره گیاهی و داروی تموزولومید با استفاده از نتایج تست MTT و همچنین، نرم‌افزار Compusyn ارزیابی شد. میزان تولید نیتریک اکساید در سلول‌های سرطانی سنجیده شد. بیان ژن O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) نیز با روش Real-time PCR ارزیابی شد.	
یافته‌ها: عصاره هیدروالکلی و تموزولومید زنده ماندن سلولی را به روشی وابسته به غلظت و زمان کاهش دادند. ترکیب عصاره و تموزولومید دارای اثرهای هم‌افزا در کاهش زنده‌مانی سلولی بود. عصاره هیدروالکلی و/یا تموزولومید باعث کاهش معنی‌دار در تولید و ترشح نیتریک اکساید شدند ($P < 0.05$). عصاره هیدروالکلی باعث کاهش معنی‌دار و تموزولومید باعث افزایش معنی‌دار بیان ژن <i>MGMT</i> شد ($P < 0.05$). تیمار ترکیبی هم‌زمان عصاره و دارو باعث کاهش معنی‌دار بیان ژن <i>MGMT</i> نسبت به گروه تیمار شده با تموزولومید شد ($P < 0.05$).	
نتیجه‌گیری: ترکیب عصاره میوه کهورک و تموزولومید پتانسیل ضدتوموری هم‌افزا در سلول‌های GBM نشان داد. این عصاره مقاومت سلولی به تموزولومید را از طریق کاهش بیان <i>MGMT</i> کاهش داد.	

مقدمه

تمپورال (۲۰ درصد)، جداری (۱۳ درصد) و پس سری (۳ درصد) [۵]. در ابتدا، تصور بر این بود که GBMها فقط از سلول‌های گلیال مشتق می‌شوند. با این حال، شواهد نشان می‌دهند که آن‌ها ممکن است از انواع سلول‌های متعدد با خواص مشابه سلول‌های بنیادی عصبی ناشی شوند. این سلول‌ها در مراحل مختلف تمایز از سلول بنیادی به گلیا، با تغییرات فنوتیپی که عمدتاً توسط تغییرات مولکولی در مسیرهای سیگنالینگ تعیین می‌شوند، قرار دارند [۶]. درمان

گلیوبلاستوم مولتی فرم (GBM)، به اختصار گلیوبلاستوم، شایع‌ترین تومور بدخیم مغزی اولیه است که ۱۶ درصد از نئوپلاسم‌های اولیه مغز و سیستم عصبی مرکزی را شامل می‌شود [۱]. متوسط نرخ بروز تعدیل‌شده با سن ۳/۲ سال در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر جمعیت است [۲-۴]. اگرچه GBMها تقریباً منحصراً در مغز ایجاد می‌شوند، می‌توانند در ساقه مغز، مخچه و نخاع نیز ظاهر شوند. ۶۱ درصد از تمام گلیوم‌های اولیه در چهار لوب مغز رخ می‌دهند: فرونتال (۲۵ درصد)،

در کتب گیاهان دارویی ایران برای درمان سرطان اشاره شده است. جراحی، شیمی‌درمانی و پرتودرمانی از روش‌های مرسوم در درمان اغلب سرطان‌ها است. به‌طور معمول، تومورهای GBM به شیمی‌درمانی پاسخ نمی‌دهند. همچنین، شیمی‌درمانی دارای عوارض جانبی بسیار زیادی است. لذا، تلاش برای کشف درمان‌های جدید همواره ادامه دارد. هدف تحقیق حاضر تعیین اثر عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک (*Prosopis farcta*) بر سمیت القاشده توسط تموزولومید در رده سلولی GBM است.

روش کار

این مطالعه از نوع تجربی و آزمایشگاهی است که در آزمایشگاه کشت سلول گروه علوم تشریح دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه از اردیبهشت ۱۴۰۲ تا تیر ۱۴۰۲ انجام شد.

تهیه عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک (*Prosopis farcta*)

میوه‌های گیاه کهورک (*Prosopis farcta*) از فروشگاه گیاهان دارویی خریداری شد و از نظر گونه، یک گیاه‌شناس آن‌ها را شناسایی کرد (کد هرباریوم A18255). سپس، میوه گیاه خشک و پودر شد و ۱۵ گرم پودر در ۱۵۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت، در تاریکی خیسانده شد. سپس، محلول از طریق کاغذ فیلتر (واتمن، درجه ۴۲)، فیلتر و خشک شد تا امکان تبخیر الکل در دمای اتاق فراهم شود. سرانجام، پودر در محیط کشت بدون سرم (Gibco, Germany) حل شد و از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر عبور کرد [۲۰].

کشت سلولی

رده سلولی T98G (انستیتوپاستور، ایران) که از نوع سلول‌های چسبیده بود، با ۱۰ درصد FBS (Gibco, Germany) و ۱ درصد محلول پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Gibco, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵ درصد CO₂ در اتمسفری مرطوب کشت داده شدند و پس از رسیدن به تراکم مناسب، با استفاده از محلول تریپسین/EDTA (Gibco, Germany) از کف فلاسک جدا شدند.

سنجش زنده بودن سلول‌ها

سلول‌ها در پلیت ۹۶‌چاهکی (۱۵ هزار سلول در هر چاهک) کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت، با عصاره هیدروالکلی گیاه (۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) یا TMZ (Sigma, Germany) (۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) انکوبه شدند. پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، محیط دور ریخته شد و ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) (Merck, Germany) به چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۴ ساعت، محلول DMSO (Merck, Germany) (۱۵۰ میکرولیتر) به چاهک‌ها اضافه شد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا (BIOTEK ELX800TS, Iran) ثبت شد. سلول‌های کنترل محیط بدون سرم دریافت کردند. مقادیر IC₅₀ برای عصاره و TMZ توسط نرم‌افزار پریم نسخه ۵ (Graphpad Prism 5.0)

GBM تازه تشخیص داده شده به رویکردی چندرشته‌ای نیاز دارد. درمان استاندارد کنونی شامل برداشتن تومور با جراحی ایمن و به دنبال آن، پرتودهی هم‌زمان با تموزولومید (TMZ) (Temodar®) (عامل شیمی‌درمانی آلیکله‌کننده خوراکی) و سپس، شیمی‌درمانی کمکی (Adjuvant Chemotherapy) با TMZ است [۷]. پرتودرمانی (RT) به‌تنهایی تا سال ۲۰۰۵ درمان استاندارد بود، تا زمانی که نتایج یک کارآزمایی محوری فاز III تأیید کرد که RT به همراه شیمی‌درمانی TMZ مؤثرتر از RT به‌تنهایی است [۸،۹].

متیلاسیون ژن *MGMT* یکی دیگر از پیش‌بینی‌کننده‌های قوی پیامدهای مرتبط با GBM است. این ژن آنزیمی را کد می‌کند که در ترمیم DNA نقش دارد. ترمیم DNA در بیماران که *MGMT* متیله (فعال نشده) دارند، به خطر می‌افتد. هنگامی که آنزیم *MGMT* فعال می‌شود، ممکن است با اثرهای درمان تداخل کند. RT و شیمی‌درمانی آلیکله‌کننده اثرهای درمانی خود را با ایجاد آسیب DNA و سمیت سلولی و تحریک آپوپتوز اعمال می‌کنند؛ بنابراین، بیان *MGMT* متیله برای بیماران تحت شیمی‌درمانی TMZ و RT مفید است. در مطالعه استاپ و همکاران (۲۰۰۹)، متیلاسیون *MGMT* پیش‌بینی‌کننده‌ای خوب برای پاسخ به درمان با TMZ گزارش شد [۱۰]. TMZ به سنگ بنای درمان GBM تبدیل شده است، اما متأسفانه، عاملی کلیدی در مقاومت و عود تومور است. متأسفانه، بیش از ۵۰ درصد از بیماران GBM تحت درمان با TMZ به درمان پاسخ نمی‌دهند، اما نشانگرهای پیش‌بینی‌کننده محدودی برای پاسخ TMZ فراتر از وضعیت *MGMT* وجود دارد [۱۱-۱۳]. درک و مبارزه با مقاومت TMZ با این واقعیت پیچیده‌تر می‌شود که مقاومت می‌تواند ذاتاً مشخصه تومورهای خاص باشد یا پس از درمان اولیه به دست آید [۱۴]. مقاومت TMZ مانع بالینی اساسی و معنی‌داری است که برای درمان موفقیت‌آمیز GBM باید بر آن غلبه کرد [۱۵].

کهورک یا *Prosopis farcta* از خانواده Fabaceae است و ارتفاع درختچه‌های آن ۲ تا ۳ متر است. این گیاه بومی آسیا است و از هند به ایران آورده شده است. این گیاه دارای اجزایی مانند لکتین، ال-آرابینوز، ۵-هیدروکسی کورستین (فلاونوئید)، تریپتامین (آلکالوئید) و آپیزنین است [۱۶]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی فلاونوئیدهای موجود در کهورک گزارش شده است [۱۷]. نتایج به‌دست‌آمده از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گرده جمع‌آوری شده زنبور عسل از *Prosopis juliflora* حاکی از آن است که این گیاه منبع مهمی از فلاونوئیدها است که می‌توان آن‌ها را آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفت [۱۸]. فلاونوئیدهای این گیاه به‌عنوان آنتی‌اکسیدان قوی باعث کاهش کلسترول، تری‌گلیسیرید، مالون‌دی‌آلدئید و همچنین، افزایش HDL-C در موش‌های دچار مسمومیت کبدی ناشی از تتراکلرید می‌شوند؛ بنابراین، این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدچربی است [۱۹] و ممکن است در درمان دیابت نیز مفید باشد. به این گیاه

غلظت‌های ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار به‌عنوان استاندارد تهیه شد. درون هر یک از چاهک‌های پلیت الایزا، ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های پروتئین‌زدایی‌شده و استاندارد ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر محلول کلرید وانادیوم III (Merck, Germany) (۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اضافه شد تا نیترات‌ها به نیتريت تبدیل شوند. مرحله بعدی اضافه کردن عامل گریس است که نیتريت را به ترکیب آزو با رنگ بنفش تبدیل می‌کند. در این مرحله، ۵۰ میکرولیتر سولفانامید و ۵۰ میکرولیتر NEDD (Merck, Germany) افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از انجام واکنش و تشکیل رنگ، جذب نوری نمونه‌ها در ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه خوانشگر الایزا اندازه‌گیری شد. با استفاده از نمودار استاندارد به‌دست‌آمده، غلظت نیتريت و نیترات برحسب میکرومولار محاسبه شد و با مقایسه نتایج به‌دست‌آمده با نمونه‌های کنترل، میزان تغییر در تولید نیتريك اکساید سلول‌ها تحت اثر داروها محاسبه شد.

آنالیزهای مولکولی

تجزیه و تحلیل بیان ژن MGMT با روش Real-time PCR انجام شد. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت IC50، داروها به مدت ۲۴ ساعت، RNA با استفاده از یک میلیون سلول کنترل و گروه تیمار شده با معرف TRIZol (Invitrogen, Life Technologies, UK) جدا شد. خلوص و یکپارچگی RNA با استفاده از نانودراپ (Thermo Scientific, USA) ارزیابی شد. DNA مکمل (cDNA) طبق روش کیت Vivantis (Vivantis Technologies, Malaysia) سنتز شد. Real-time PCR توسط SYBR Premix Ex Taq Technology (Vivantis Technologies, Selangor DE, Malaysia) و طبق پروتکل سازنده انجام شد. تغییرات بر اساس روش مقایسه‌ای Ct (2-ΔΔCt) به دست آمد. از GAPDH به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی‌های پرایمر توسط نرم‌افزار GeneRunner نسخه ۳.۰۵ طراحی شد که در جدول ۲ فهرست شده‌اند.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده، از نرم‌افزار SPSS25 استفاده شد. برای سنجش نرمال بودن توزیع داده‌های به‌دست‌آمده، از آزمون آماری K-S 1-sample استفاده شد و بعد از تعیین نرمال بودن توزیع داده‌ها، از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (ANOVA) با سطح معنی‌داری $P < 0.05$ برای بررسی وجود اختلاف در میانگین گروه‌ها استفاده شد.

software, USA) محاسبه شد.

تحلیل اثر میانه برای بررسی اثر تیمار ترکیبی عصاره هیدروالکی گیاه و دارو

تیمار سلولی با ترکیب دو عامل (عصاره هیدروالکی گیاه و TMZ) به‌طور هم‌زمان، در دو غلظت بالاتر و دو غلظت پایین‌تر از مقدار IC50 انجام شد و آزمون MTT تکرار شد. از ۵ گروه تیمار هم‌زمان عصاره و دارو استفاده شد: گروه ۱: ۳۲۴۴/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۸۱۱/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره؛ گروه ۲: ۶۴۸۸/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر تموزولومید + ۱۶۲۲/۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره؛ گروه ۳: ۲۵۴۱/۷۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تموزولومید + ۳۲۴۴/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره؛ گروه ۴: ۵۱۹۱/۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۴۶۸۸/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره؛ گروه ۵: ۱۰۳۸۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۱۲۹۷۷/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره (جدول ۱).

تعیین شاخص‌های ترکیبی (CI) و شاخص‌های کاهش دوز (DRI) توسط نرم‌افزار CompuSyn انجام شد. CI بر اساس معادله $CI = (Dx)1/(Dx)2 + (Dx)1/(Dx)2$ تعیین شد که در آن، $(Dx)1$ و $(Dx)2$ عصاره و TMZ به‌تنهایی هستند که x درصد را مهار می‌کنند و $(D)1$ و $(D)2$ مقادیر عصاره و TMZ در تیمار ترکیبی هستند که همان میزان x درصد را مهار می‌کنند. $CI < 1$ نشان‌دهنده اثرهای هم‌افزا، $CI = 1$ نشان‌دهنده اثرهای افزایشی و $CI > 1$ نشان‌دهنده اثرهای آنتاگونیسم است. علاوه بر این، DRI با توجه به معادله $DRI = (Dx)1/(D)1$ و $DRI = (Dx)2/(D)2$ محاسبه شد. مقدار DRI درجه کاهش غلظت یک دارو را هنگام ترکیب با داروی دیگر برای حفظ اثربخشی یکسان تعریف می‌کند و Fa کسری از مرگ سلولی است که از ۰ (بدون مرگ) تا ۱ (مرگ ۱۰۰ درصد) متغیر است.

سنجش نیتريك اکساید

بدین منظور، هفتاد هزار سلول در چاهک‌های پلیتی ۲۴ چاهکی کشت داده شد و با محیط کشت دارای غلظت IC50 عصاره و/یا دارو تیمار شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ۴۰۰ میکرولیتر از محیط کشت رویی هر گروه آزمایش به یک میکروتیوب منتقل شد. به‌منظور پروتئین‌زدایی محیط کشت و حذف تداخلات پروتئینی به هر میکروتیوب ۶ میلی‌گرم پودر سولفات روی اضافه شد و به مدت ۱۲ دقیقه، در ۱۲۰۰۰ rpm و دمای ۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (بهسان، ایران) شد. محلول ذخیره ۱ میلی‌مولار سدیم نیترات

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده

Genes	Sequences	Size
MGMT	F: 5'- CCTGGCTGAATGCCTATTTC-3'	۱۰۰ bp
	R: 5'- TGTCTGGTGAACGACTCTTG-3'	
GAPDH	F: 5'-TCCCTGAGCTGAACGGGAAG-3'	۱۱۲ bp
	R: 5'-GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT-3'	

یافته‌ها

سنجش زنده‌مانی

میلی‌لیتر تموزولومید + ۴۶۸۸/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره و گروه ۵: ۱۰۳۸۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۱۲۹۷۷/۸۸ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره

سنجش نیتریک اکساید

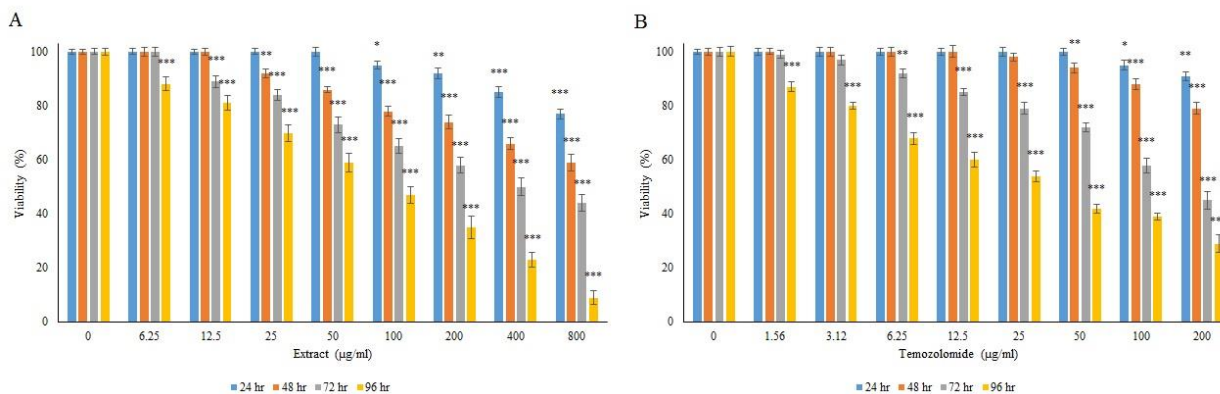
داده‌های حاصل از سنجش نیتریک اکساید نشان داد که هر دو عصاره هیدروالکلی (به میزان ۲۰/۸ درصد) و تموزولومید (به میزان ۳۰/۸ درصد) در غلظت‌های IC50 خود باعث کاهش معنی‌دار در تولید و ترشح نیتریک اکساید می‌شوند ($P < 0.05$). همچنین، تیمار هم‌زمان در غلظت‌های IC50 باعث کاهش معنی‌دار بیشتری (به میزان ۳۶/۵ درصد) در تولید نیتریک اکساید در مقایسه با هریک از تیمارهای جداگانه شد ($P < 0.05$) (شکل ۲).

سنجش Real-time PCR

بیان ژن *MGMT* دخیل در مقاومت دارویی توسط Real Time PCR سنجش شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار سلولی با عصاره هیدروالکلی و/یا تموزولومید، عصاره هیدروالکلی باعث کاهش معنی‌دار (به میزان ۲۳ درصد) و تموزولومید باعث افزایش معنی‌دار (به میزان ۲۱۰ درصد) بیان این ژن نسبت به گروه کنترل بدون تیمار شد ($P < 0.05$). همچنین، تیمار هم‌زمان باعث کاهش معنی‌دار (به میزان ۶۵ درصد) بیان ژن *MGMT* نسبت به گروه تیمار شده با تموزولومید شد ($P < 0.05$) (شکل ۳).

اثر عصاره هیدروالکلی و تموزولومید بر زنده ماندن سلول در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت، هر دو عصاره هیدروالکلی و تموزولومید زنده ماندن سلولی را به روشی وابسته به غلظت و زمان کاهش دادند. مقادیر IC50 برای عصاره هیدروالکلی ۳۲۴۴/۴۷، ۱۲۵۵/۳۵، ۳۹۵/۲ و ۷۵/۰۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای تموزولومید ۲۵۴۱/۷۶، ۵۴۳/۹۷، ۱۵۵/۲ و ۳۴/۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به ترتیب برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود. مقادیر CI در جدول ۱ ارائه شده است. مقادیر به دست آمده کمتر از ۱ (اثر هم‌افزایی) بود. مقادیر DRI بیشتر از ۱ بود که نشان‌دهنده کاهش دوز هریک از عوامل برای یک اثر درمانی معین نسبت به هریک از آن‌ها به تنهایی بود. با توجه به CI‌های به دست آمده، می‌توان نتیجه گرفت که بهترین غلظت ترکیبی گروه ۴ است که دارای کمترین میزان CI (۰/۴۵) است.

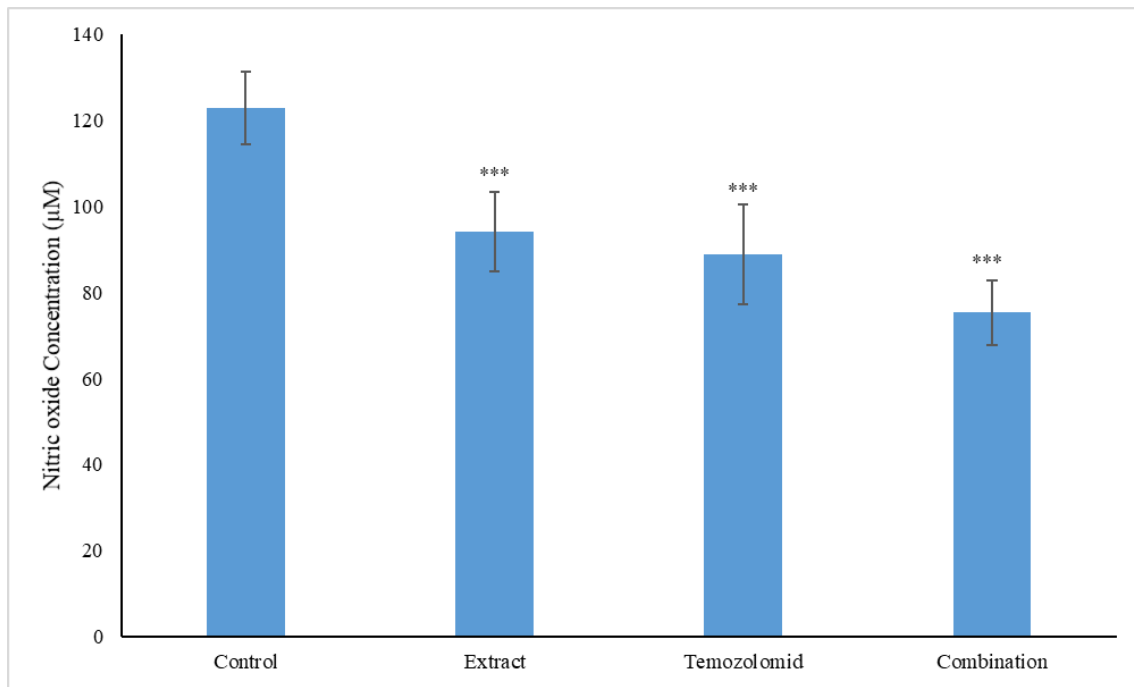
گروه ۱: ۳۲۴۴/۴۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۸۱۱/۱۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره، گروه ۲: ۶۴۸۸/۹۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۱۶۲۲/۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، گروه ۳: ۲۵۴۱/۷۶ میکروگرم در میلی‌لیتر تموزولومید + ۳۲۴۴/۴۷ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره، گروه ۴: ۵۱۹۱/۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره،



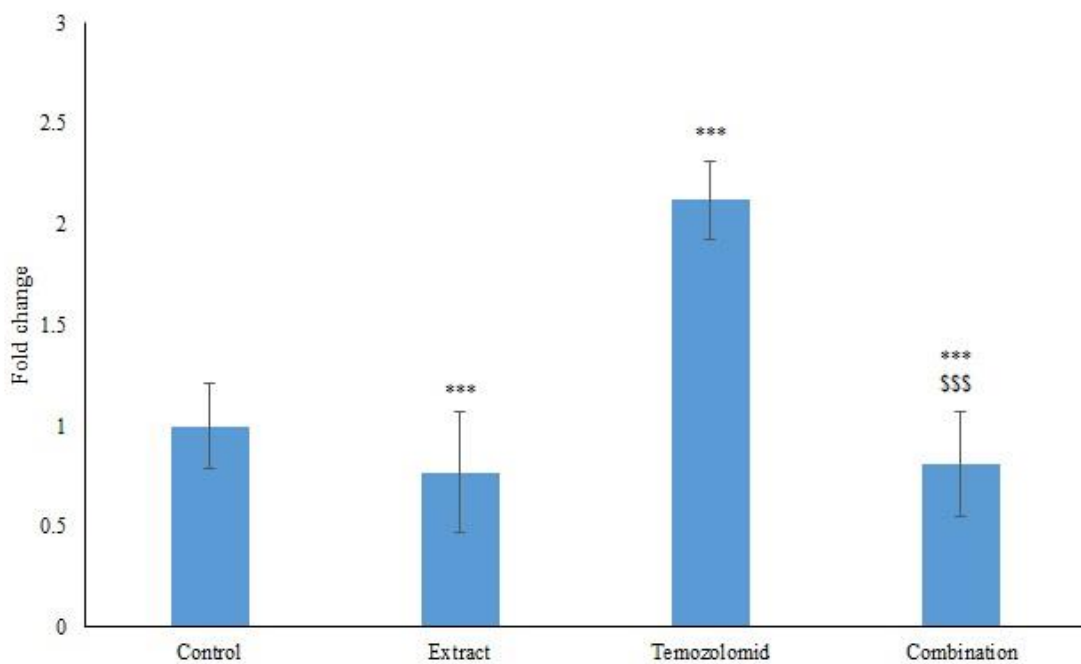
شکل ۱. اثرهای (A) عصاره هیدروالکلی و (B) تموزولومید بر زنده ماندن سلول‌های GBM. داده‌های میانگین \pm SEM حاصل از سه آزمایش مستقل است. * نشان‌دهنده $P < 0.05$ ، ** نشان‌دهنده $P < 0.01$ و *** نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل است.

جدول ۲. مقادیر کسر تحت تأثیر (Fa)، شاخص ترکیبی (CI) و شاخص کاهش دوز (DRI) برای ترکیب عصاره هیدروالکلی و تموزولومید

DRI temozolomide	DRI extract	CI	Fa	گروه‌های تیمار ترکیبی (عصاره هیدروالکلی+تموزولومید)
۲/۶۲	۱/۷۵	۰/۹۵	۰/۳۹ \pm ۰/۰۹	۱
۲/۴۳	۳/۰۳	۰/۷۴	۰/۵۶ \pm ۰/۰۷	۲
۲/۳۵	۶/۰۷	۰/۵۹	۰/۷۴ \pm ۰/۰۸	۳
۲/۵۵	۱۵/۵۳	۰/۴۵	۰/۸۸ \pm ۰/۰۷	۴
۱/۶۶	۱۳/۵۱	۰/۶۷	۰/۹۱ \pm ۰/۰۹	۵



شکل ۲. اثرهای غلظت‌های IC50 عصاره هیدروالکلی و/یا تموزولومید بر تولید نیتریک اکساید در سلول‌های GBM. داده‌های میانگین \pm SEM حاصل از سه آزمایش مستقل است. *** نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل است.



شکل ۳. اثرهای غلظت‌های IC50 عصاره هیدروالکلی و/یا تموزولومید بر بیان ژن *MGMT* در سلول‌های GBM. داده‌های میانگین \pm SEM حاصل از سه آزمایش مستقل است. *** نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با کنترل و \$\$\$ نشان‌دهنده $P < 0.001$ در مقایسه با گروه تیمار شده با تموزولومید است.

۲۴ ساعت در غلظت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و بعد از ۹۶ ساعت در تمامی غلظت‌های مورد استفاده معنی‌دار بود. در مرحله بعد، IC50 برای هر چهار دوره تیمار محاسبه شد. مقادیر IC50 برای تموزولومید ۲۵۴۱/۷۶، ۵۴۳/۹۷،

بحث

در این پروژه، اثر سمیت عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک و تموزولومید بر رده سلولی T98G به صورت *in vitro* بررسی شد. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بعد از هر چهار دوره زمانی تیمار با تموزولومید، زنده‌مانی سلول‌ها با افزایش دوز تموزولومید، به تدریج کاهش می‌یابد. کاهش زنده‌مانی بعد از تیمار با تموزولومید به مدت

داشته باشند [۲۵]. همچنین، در سال ۲۰۲۰، نشان داده شد که اثرهای ضدسرطانی نانوذرات اکسید زینک سنتز شده با عصاره میوه کهورک در برابر سلول‌های سرطانی پستان (MCF7) با IC50 معادل ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر است [۲۶]. در نزدیک‌ترین مطالعه به مطالعه ما، اثرهای عصاره متانولی گیاه کهورک در سلول‌های HT-29 ارزیابی شد و مشخص شد که این عصاره از طریق تغییرات وابسته به میتوکندری، فعالیت ضدسرطانی خود را اعمال می‌کند که با افزایش سطح ROS، فعالیت Sirt3 و مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی HT-29 همراه بود [۲۷].

با وجود پیشرفت‌های اخیر در درمان سرطان، هنوز بهبودی در طول عمر و کیفیت زندگی بیماران مبتلا به GBM حاصل نشده است که یکی از علل عمده این مسئله مقاومت دارویی است؛ بنابراین، توسعه راهبردهای جدید برای غلبه بر این مشکل ضروری است. به‌تازگی، استفاده از ترکیب دارویی (Drug Combination) پرکاربردترین روش درمانی برای بیماری‌های کشنده‌ای مثل سرطان و ایدز (Aids) معرفی شده است. هدف اصلی این راهبرد دستیابی به اثر درمانی هم‌افزا، کاهش دوز مصرفی و سمیت و به حداقل رساندن یا تأخیر در ایجاد مقاومت دارویی است. مزایای کاهش سمیت و به حداقل رساندن مقاومت ممکن است نتیجه میان‌کنش هم‌افزا باشد [۲۸].

امروزه، استفاده از چند داروی ضدسرطان از گروه‌های مختلف به‌صورت وسیع، در درمان انواع سرطان‌ها کاربرد دارد. مطالعات قبلی نشان داده است که ترکیب تموزولومید با دیگر مواد ضدسرطان فعالیت این دارو را در بهبود بیماری GBM افزایش می‌دهد. برای مثال، مطالعات بالینی (Clinical Trials) نشان داده است که اضافه کردن کلروکوئین (Chloroquine) به درمان استاندارد GBM، دارای نتایج سودمندی است [۲۹]. همچنین، ترکیب تموزولومید با کارموستین (Carmustine) به‌عنوان درمان کمکی جدید (Neo-Adjuvant Therapy) در بیماران مبتلا به GBM، آثار رضایت‌بخش با سمیت قابل تحمل را نشان می‌دهد [۳۰]. بررسی‌های *In vitro* هم نشان داده است که اثر ضدسرطانی تموزولومید در ترکیب با بعضی از عوامل ضدسرطان طبیعی افزایش می‌یابد [۳۱-۳۹]. با این همه، مطالعات بالینی درباره کارایی این نوع درمان‌های ترکیبی تاکنون انجام نگرفته است. در مطالعه حاضر، اثر تیمار هم‌زمان تموزولومید و عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک در کشت دویعدی GBM بررسی شد.

تیمار ترکیبی هم‌زمان عصاره و دارو در دو غلظت بالاتر و دو غلظت کمتر از مقادیر IC50 (جدول ۱) نشان داد که عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک سمیت سلولی تموزولومید را با CI بین ۰/۴۵ و ۰/۹۶ تشدید کرد که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی در تمام غلظت‌های ترکیبی مورد استفاده در این مطالعه است. میانگین مقادیر CI به‌دست‌آمده حدود ۰/۶۸ بود که نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی کلی ترکیب عصاره و تموزولومید بر سلول‌های GBM است. این تیمار ترکیبی باعث کاهش

۱۵۵/۲ و ۳۴/۳۴ میکروگرم در میلی‌لیتر به‌ترتیب برای ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بود.

ماسلر و همکاران [۲۱]، میزان IC50 تموزولومید در دوره تیمار ۱۴۴ ساعت را ۲۰/۵ میکرومولار برای سلول‌های U87MG محاسبه کردند که با IC50 دوره‌های زمانی تیمار ما تفاوت داشت. کانزاوا و همکاران [۲۲]، اثر تموزولومید را بر شش رده سلولی گلیوم شامل U251MG، U373MG، GB1، U87MG، A172، T98G سنجیدند و نتایج آن‌ها مشخص کرد که تموزولومید بعد از ۷۲ ساعت تیمار، زنده‌مانی سلول‌ها را در رفتاری وابسته به دوز کاهش می‌دهد و IC50 محاسبه‌شده برای ۵ رده سلولی کمتر از ۲۰۰ میکرومولار بود. درحالی‌که رده سلولی T98G نسبت به تموزولومید مقاوم‌تر و دارای IC50 بزرگ‌تر از ۱۰۰۰ میکرومولار بود که بزرگ‌تر از IC50 محاسبه‌شده در مطالعه حاضر بود. باراسکو و همکاران [۲۳]، میزان IC50 تموزولومید در دوره تیمار ۴۸ و ۷۲ ساعت را معادل ۱۳۲۸/۰۶ و ۱۶۳/۵۶ میکرومولار برای رده سلولی T98G محاسبه کردند، این مقدار بالاتر از IC50های محاسبه‌شده ما است. پون و همکاران [۲۴]، IC50 تموزولومید را بر رده سلولی T98G معادل ۳۹۷/۲ میکرومولار پس از ۷۲ ساعت گزارش کردند که بالاتر از IC50 محاسبه‌شده ما است. نتایج ما در مورد کاهش زنده‌مانی سلول‌ها در تیمار با تموزولومید در توافق با مطالعات ذکر شده است و از جمله دلایل اختلاف در میزان IC50ها می‌توان به تفاوت در دوره‌های زمانی تیمار و تفاوت در شرایط آزمایش اشاره کرد.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که بعد از هر چهار دوره زمانی تیمار با عصاره، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با افزایش دوز، به‌تدریج کاهش می‌یابد. کاهش زنده‌مانی بعد از تیمار با تموزولومید به مدت ۲۴ ساعت در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از ۴۸ ساعت در غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بعد از ۷۲ ساعت در غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ بعد از ۹۶ ساعت در تمامی غلظت‌های مورد استفاده معنی‌دار بود. در مرحله بعد، IC50 برای عصاره هیدروالکلی ۳۲۴۴/۴۷، ۱۲۵۵/۳۵، ۳۹۵/۲، ۷۵/۰۱ و ۳۹۵/۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر به‌ترتیب پس از ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت به دست آمد.

در راستای تأیید اثرهای ضدسرطانی گیاه کهورک، مشخص شده است که آثار سمیت نانوذرات نقره سنتز شده با عصاره آبی کهورک بر سلول‌های سرطان ریه (A549) به‌صورت وابسته به غلظت و زمان و بر سلول‌های سرطان کولون (HT-29) به‌صورت وابسته به زمان است. نانوذرات ساخته‌شده (Ag-NP) به آپوپتوز بیش از ۵۰ درصد در رده‌های سلولی A549 و HT-29 منجر شدند و آپوپتوز ۱۰۰ درصد را در غلظت‌های بیش از ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در سلول‌های HT-29 القا کردند. به نظر می‌رسد که Ag-NPهای سنتز شده با استفاده از عصاره *P. farcta*، می‌توانند از طریق ایجاد یا کشف اشکال دارویی جدید، به‌عنوان عاملی ضدسرطان در درمان بسیاری از سرطان‌ها نقش

می‌افتد، اما تأیید این مکانیسم بسیار مشکل است و ثابت شده است که این دارو در محلول آزاد در غیاب DNA نیز به سهولت به MTIC تبدیل می‌شود [۴۲]. MTIC به کاتیون متیل دی‌آزونیوم (Methyl Diazonium) که انتقال‌دهنده گروه متیل به DNA است و ۴ آمینو-۵ ایمیدازول کربوکسامید (AIC) که از طریق کلیه دفع می‌شود، تبدیل می‌شود [۴۳]. کاتیون متیل دی‌آزونیوم همچنین، می‌تواند با RNA و پروتئین‌های سلولی محلول واکنش دهد [۴۴]. به نظر می‌رسد که متیلاسیون RNA یا متیلاسیون و کربامیلایسیون پروتئین نقشی در فعالیت ضدسرطانی تموزولومید نداشته باشند. تبدیل خودبه‌خودی تموزولومید به MTIC به pH وابسته است. مقایسه نیمه‌عمر تبدیل تموزولومید به فرم فعال در بافر فسفات ($t_{1/2} = 1/83h$ و $pH = 4/7$) با نیمه‌عمر مشاهده‌شده در پلاسما بیمار مبتلا به سرطان بعد از مصرف خوراکی دارو ($t_{1/2} = 1/81h$) نشان می‌دهد که این تبدیل نوعی واکنش کنترل‌شده شیمیایی غیرآنزیمی است [۴۱].

این دارو آلکیل‌کردن DNA را بر موقعیت‌های N7 گوانین، N3 آدنین و O6 گوانین انجام می‌دهد. اگرچه هر دو محصول N7 متیل گوانین و N3 متیل آدنین در فعالیت ضدسرطانی تموزولومید شرکت دارند، در بعضی از سلول‌ها، نقش آن‌ها بحث‌برانگیز است [۴۵]. محصول O6 متیل گوانین که تنها ۵ درصد از کل محصولات متیلاسیون تموزولومید را تشکیل می‌دهد، مهم‌ترین نقش را در فعالیت ضدسرطانی این دارو دارد. این نقش به‌وسیله ارتباط مستقیم میان حساسیت رده‌های سلولی سرطانی نسبت به تموزولومید و فعالیت پروتئین ترمیم DNA، O6 آلکیل گوانین آلکیل ترانسفراز (AGT) یا O6 متیل گوانین متیل ترانسفراز (MGMT) که به‌صورت اختصاصی گروه‌های آلکیل را از موقعیت O6 گوانین حذف می‌کند، تأیید شده است. آن رده‌های سلولی که سطح پایینی از بیان پروتئین AGT دارند، به سمیت تموزولومید حساس‌اند. در مقابل، آن رده‌های سلولی که سطح بالایی از این پروتئین ترمیمی را دارند، در برابر دارو مقاوم هستند [۴۶]. این ارتباط مستقیم همچنین، در مدل‌های زئوگرافت (Xenograft) انسانی نیز مشاهده شده است [۴۷].

طبق مطالعات انجام‌شده، تاکنون بررسی اثر سمیت هم‌زمان عصاره میوه گیاه کهورک با سایر داروهای شیمی‌درمانی در رده‌های سلولی سرطانی انجام نشده است و این مطالعه برای نخستین بار اثر هم‌افزایی این عصاره و یک داروی استاندارد شیمی‌درمانی را گزارش می‌کند. همچنین، در اینجا برای نخستین بار، اثر سمیت عصاره میوه گیاه کهورک بر سلول‌های GBM گزارش شد.

نتیجه‌گیری

داده‌های این مطالعه نشان داد که تیمار ترکیبی عصاره میوه گیاه کهورک و تموزولومید دارای پتانسیل ضدتوموری هم‌افزا در سلول‌های GBM است. این عصاره ممکن است مقاومت سلولی به تموزولومید را از طریق کاهش بیان MGMT کاهش دهد. جداسازی اجزای تشکیل‌دهنده عصاره هیدروالکلی میوه گیاه کهورک به‌منظور شناسایی و تخلیص جزء مؤثر در

دوز تموزولومید شد؛ بنابراین، مقادیر IC50 برای هر دو عامل کاهش یافت. کاهش دوز تموزولومید برای ایجاد اثری خاص از دیدگاه بالینی بسیار ارزشمند است؛ زیرا این کاهش دوز باعث کاهش عوارض جانبی عمومی شیمی‌درمانی می‌شود. در این مطالعه، اثر هم‌افزایی ترکیب عصاره هیدروالکلی میوه کهورک و تموزولومید بر زنده‌ماندن سلول‌های GBM برای اولین بار گزارش شد و بهترین دوز ترکیبی ۵۱۹۱/۵۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر تموزولومید + ۴۶۸۸/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر عصاره (گروه ۴) بود؛ زیرا این ترکیب کمترین CI (۰/۴۵) را نشان داد.

در این پروژه، نشان دادیم که تموزولومید و عصاره باعث کاهش معنادار میزان تولید نیتریک اکساید در سلول‌های T98G می‌شوند. علاوه بر این، تیمار هم‌زمان باعث کاهش بیشتری در تولید و ترشح نیتریک اکساید شد. فعالیت‌های بیولوژیکی اکسید نیتریک شامل اتساع عروق، مهار تجمع پلاکتی، انتقال عصبی، پلاستیسیته عصبی و تعدیل عملکردهای التهابی و ایمنی است. نیتریک اکسید سنتاز (Nitric oxide synthase)، آنزیمی که نیتریک اکساید تولید می‌کند، در نمونه‌های گلیوم انسانی و رده‌های سلولی گلیوم انسان و جوندگان شناسایی شده است. تولید نیتریک اکساید در گلیوم می‌تواند چندین فرایند مهم پاتوفیزیولوژیک مانند پاسخ ایمنی موضعی میزبان، آپوپتوز سلول تومور، مهاجم/متاستاز تومور، آسیب رادیکال آزاد به سلول‌های تومور و بافت‌های مغزی طبیعی مجاور، گشاد شدن عروق تومور، نفوذپذیری عروق و نئوواسکولاریزاسیون را تغییر دهد. اخیراً، برخی از راهبردهای درمانی برای گلیوم با استفاده از دست‌کاری نیتریک اکساید پیشنهاد شده‌اند و به‌صورت تجربی و غیرمستقیم، در آزمایش‌های بالینی اولیه ارزیابی شده‌اند. این موارد شامل دست‌کاری نیتریک اکساید برای اصلاح انکوژن سلول تومور، جریان خون تومور و قرار دادن داروهای ضدسرطان در بافت تومور است [۴۰].

در قسمت دیگری از مطالعه ما، نشان داده شد که عصاره هیدروالکلی گیاه کهورک می‌تواند بیان افزایش‌یافته ژن MGMT با تموزولومید را کاهش دهد. به نظر می‌رسد که متیلاسیون DNA مکانیسم اصلی مسئول سمیت ایجادشده توسط تموزولومید در سلول‌های سرطانی - باشد. تموزولومید به‌صورت پیش‌دارو (Prodrug) وارد بدن می‌شود و بعد از ورود به گردش خون سیستمیک و در pH فیزیولوژیک، متحمل تغییرات شیمیایی می‌شود و به فرم فعال خود (۵- (۳- متیل تریازن-۱- ایل) ایمیدازول-۴- کربوکسی ایمید) (MTIC) تبدیل می‌شود. مشخصه‌ای که این دارو را برای مصرف خوراکی مناسب می‌سازد، این است که این پیش‌دارو در pH‌های اسیدی، به‌طور کامل پایدار است (در داخل معده)، اما در pH‌های بالای ۷، به فرم فعال تبدیل می‌شود (خون و بافت). این تبدیل خودبه‌خودی با اثر آب بر کربن چهار به‌شدت الکتروپازیتیو حلقه آغاز می‌شود. در اثر این فعالیت حلقه باز، دی‌اکسید کربن آزاد و MTIC تولید می‌شود [۴۱]. فرضیه اصلی این است که این اثر آب در محیط نزدیک شیار اصلی (Major Groove) DNA اتفاق

REC.1401.257 است. از دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه که حامی مالی این پروژه بوده است، تشکر می‌شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی بین نویسندگان وجود ندارد.

اثر ضدسرطانی و کاهش‌دهنده مقاومت به تموزولومید برای مطالعات آینده پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

مقاله فوق حاصل طرح تحقیقاتی با کد اخلاق IR.KUMS.MED.

References

- Thakkar JP, Dolecek TA, Horbinski C, Ostrom QT, Lightner DD, Barnholtz-Sloan JS, et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014; 23: 1985–96. DOI: 10.1158/1055-9965 PMID: 25053711
- Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncol.* 2015; 17(Suppl. 4): iv1–iv62. DOI: 10.1093/neuonc/nov189 PMID: 26511214
- Ostrom QT, Bauchet L, Davis FG, Deltour I, Fischer JL, Langer CE, et al. The epidemiology of glioma in adults: A “state of the science” review. *Neuro Oncol.* 2014; 16: 896–913. DOI: 10.1093/neuonc/nou087 PMID: 24842956
- Molinario AM, Taylor JW, Wiencke JK, Wrensch MR. Genetic and molecular epidemiology of adult diffuse glioma. *Nat Rev Neurol.* 2019; 15(7): 405–17. DOI: 10.1038/s41582-019-0220-2 PMID: 31227792
- American Association of Neuroscience Nurses Care of the adult patient with a brain tumor. 2014 [Link]
- Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, Forrest WF, Soriano RH, Wu TD, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell.* 2006; 9: 157–73. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.02.019 PMID: 16530701
- National Comprehensive Cancer Network Clinical Practice Guidelines in Oncology: Central nervous system cancers. 2015. [Link]
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med.* 2005; 352: 987–96. DOI: 10.1056/NEJMoa043330 PMID: 15758009
- Stupp R, Hegi ME, Mason WP, van den Bent MJ, Taphoorn MJ, Janzer RC, et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTCNCIC trial. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 459–66. DOI: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7
- Rivera AL, Pelloski CE, Gilbert MR, Colman H, De La Cruz C, Sulman EP, et al. MGMT promoter methylation is predictive of response to radiotherapy and prognostic in the absence of adjuvant alkylating chemotherapy for glioblastoma. *Neuro Oncol.* 2010; 12(2): 116–21. DOI: 10.1093/neuonc/nop020 PMID: 20150378
- Johnson DR, Fogh SE, Giannini C, Kaufmann TJ, Raghunathan A, Theodosopoulos PV, et al. Case-based review: Newly diagnosed glioblastoma. *Neurooncol Pract.* 2015; 2: 106–121. DOI: 10.1093/nop/npv020 PMID: 31386093
- Arora A, Somasundaram K. Glioblastoma vs temozolomide: can the red queen race be won? *Cancer Biol Ther.* 2019; 20: 1083–90. DOI: 10.1080/15384047.2019.1599662 PMID: 31068075
- Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis.* 2016; 3: 198–210. DOI: 10.1016/j.gendis.2016.04.007 PMID: 30258889
- Wick W, Platten M. Understanding and targeting alkylator resistance in glioblastoma. *Cancer Discov.* 2014; 4: 1120–22. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0918 PMID: 25274683
- Xie Q, Mittal S, Berens ME. Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro Oncol.* 2014; 16: 1575–84. DOI: 10.1093/neuonc/nou147 PMID: 25082799
- Direkvand-Moghadam F, Ghasemi-Seyed V, Abdali-Mashhadi AR, Lotfi A, Direkvand-Moghadam A, Delpisheh A. Extraction and measurement of the Quercetin flavonoid of Prosopis farcta in Khuzestan climatic condition. *Adv Herb Med.* 2015; 1(1): 29–35.
- Almaraz-Abarca N, da Graça Campos M, Ávila-Reyes JA, Naranjo-Jiménez N, Herrera Corral J, González-Valdez LS. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (Prosopis juliflora, Leguminosae). *J Food Compos Analysis.* 2007; 20(2): 119–124. DOI: 10.1016/j.jfca.2006.08.001
- Quispe C, Petroll K, Theoduloz C, Schmeda-Hirschmann G. Antioxidant effect and characterization of South American Prosopis pods syrup. *Food Res Int.* 2014; 56: 174–181. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.12.033
- Alharbi KB, Mousa HM, Ibrahim ZH, El-Ashmawy IM. Hepatoprotective effect of methanolic extracts of Prosopis farcta and Lycium shawii against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *J Biol Sci.* 2017; 17: 35–41. DOI: 10.3923/jbs.2017.35.41
- Naseri R, Habibi Shams MJ, Gholami MR, Rashidi I, Jalili C. Anti-cancer and apoptosis induction effects of Allium jesdianum hydroalcoholic extract on thyroid cancer cell lines (B-CPAP and Thr.C1-PI 33). *WCRJ.* 2021; 8: e2104. DOI: 10.32113/wcrj_20219_2104
- Karpel-Massler G, Westhoff MA, Kast RE, Dwucet A, Nonnenmacher L, Wirtz CR, et al. Artesunate enhances the antiproliferative effect of temozolomide on U87MG and A172 glioblastoma cell lines. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014; 14(2): 313–18. DOI: 10.2174/18715206113136660340 PMID: 24506460
- Kanzawa T, Germano IM, Komata T, Ito H, Kondo Y, Kondo S. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ.* 2004; 11(4): 448–57. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401359 PMID: 14713959
- Brassesso MS, Roberto GM, Morales AG, Oliveira JC, Delsin LE, Pezuk JA, et al. Inhibition of NF-κB by dehydroxymethylperoxyquinomicin suppresses invasion and synergistically potentiates Temozolomide and γ-radiation cytotoxicity in glioblastoma cells. *Chemother Res Pract.* 2013; 2013: 593020. DOI: 10.1155/2013/593020 PMID: 23533755
- Poon MTC, Bruce M, Simpson JE, Hannan CJ, Brennan PM. Temozolomide sensitivity of malignant glioma cell lines - a systematic review assessing consistencies between in vitro studies. *BMC Cancer.* 2021; 21(1): 1240. DOI: 10.1186/s12885-021-08972-5 PMID: 34794398
- Miri A, Sarani M. Biological studies of synthesized silver nanoparticles using Prosopis farcta. *Mol Biol Rep.* 2018; 45(6): 1621–26. DOI: 10.1007/s11033-018-4299-0 PMID: 30293192
- Miri A, Khatami M, Ebrahimi O, Sarani M. Cytotoxic and antifungal studies of biosynthesized zinc oxide nanoparticles using extract of Prosopis farcta fruit. *Green Chem Lett Rev.* 2020; 13(1): 27–33. DOI: 10.1080/17518253.2020.1717005
- Khodaei F, Ahmadi K, Kiyani H, Hashemitabar M, Rezaei M. Mitochondrial effects of Teucrium polium and Prosopis farcta extracts in colorectal cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2018; 19(1): 103–109. DOI: 10.22034/APJCP.2018.19.1.103 PMID: 29373899
- Yalamarty SSK, Filipczak N, Li X, Subhan MA, Parveen F, Ataide JA, et al. Mechanisms of resistance and current treatment options for glioblastoma multiforme (GBM). *Cancers (Basel).* 2023;

- 15(7):2116. DOI: [10.3390/cancers15072116](https://doi.org/10.3390/cancers15072116) PMID: 37046777
29. Chang SM, Prados MD, Yung WK, Fine H, Junck L, Greenberg H, et al. Phase II study of neoadjuvant 1, 3-bis (2-chloroethyl)-1-nitrosourea and temozolomide for newly diagnosed anaplastic glioma: A North American Brain Tumor Consortium Trial. *Cancer*. 2004; 100(8): 1712-16. DOI: [10.1002/cncr.20157](https://doi.org/10.1002/cncr.20157) PMID: 15073861
 30. Barrié M, Couprie C, Dufour H, Figarella-Branger D, Muracciole X, Hoang-Xuan K, et al. Temozolomide in combination with BCNU before and after radiotherapy in patients with inoperable newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Ann Oncol*. 2005; 16(7): 1177-84. DOI: [10.1093/annonc/mdi225](https://doi.org/10.1093/annonc/mdi225) PMID: 15857844
 31. Chen M, Rose AE, Doudican N, Osman I, Orlow SJ. Celastrol synergistically enhances temozolomide cytotoxicity in melanoma cells. *Mol Cancer Res*. 2009; 7(12): 1946-53. DOI: [10.1158/1541-7786.MCR-09-0243](https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-09-0243)
 32. Osmond GW, Augustine CK, Zipfel PA, Padussis J, Tyler DS. Enhancing melanoma treatment with resveratrol. *J Surg Res*. 2012; 172(1): 109-115. DOI: [10.1016/j.jss.2010.07.033](https://doi.org/10.1016/j.jss.2010.07.033) PMID: 20855085
 33. Qi Q, Liu X, Li S, Joshi HC, Ye K. Synergistic suppression of nospapine and conventional chemotherapeutics on human glioblastoma cell growth. *Acta Pharmacol Sin*. 2013; 34(7): 930-938. DOI: [10.1038/aps.2013.40](https://doi.org/10.1038/aps.2013.40) PMID: 23708557
 34. Moskwa J, Borawska MH, Markiewicz-Zukowska R, Puscion-Jakubik A, Naliwajko SK, Socha K, et al. Polish natural bee honeys are anti-proliferative and anti-metastatic agents in human glioblastoma multiforme U87MG cell line. *PLoS One*. 2014; 9(3): e90533. DOI: [10.1371/journal.pone.0090533](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090533) PMID: 24594866
 35. Markiewicz-Zukowska R, Borawska MH, Fiedorowicz A, Naliwajko SK, Sawicka D, Car H. Propolis changes the anticancer activity of temozolomide in U87MG human glioblastoma cell line. *BMC Complement Altern Med*. 2013; 13: 50. DOI: [10.1186/1472-6882-13-50](https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-50) PMID: 23445763
 36. Jakubowicz-Gil J, Langner E, Bądziul D, Wertel I, Rzeski W. Apoptosis induction in human glioblastoma multiforme T98G cells upon temozolomide and quercetin treatment. *Tumour Biol*. 2013; 34(4): 2367-78. DOI: [10.1007/s13277-013-0785-0](https://doi.org/10.1007/s13277-013-0785-0) PMID: 23580181
 37. Lin CJ, Lee CC, Shih YL, Lin TY, Wang SH, Lin YF, et al. Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy. *Free Radic Biol Med*. 2012; 52(2): 377-91. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.487](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.487) PMID: 22094224
 38. Filippi-Chiela EC, Thomé MP, Bueno e Silva MM, Pelegrini AL, Ledur PF, Garicochea B, et al. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. *BMC Cancer*. 2013; 13: 147. DOI: [10.1186/1471-2407-13-147](https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-147) PMID: 23522185
 39. Borges KS, Brassesco MS, Scrideli CA, Soares AE, Tone LG. Antiproliferative effects of Tubi-bee propolis in glioblastoma cell lines. *Genet Mol Biol*. 2011; 34(2): 310-314. DOI: [10.1590/s1415-47572011000200024](https://doi.org/10.1590/s1415-47572011000200024) PMID: 21734835
 40. Fahey JM, Girotti AW. Nitric oxide antagonism to anti-Glioblastoma photodynamic therapy: mitigation by inhibitors of nitric oxide generation. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(2): 231. DOI: [10.3390/cancers11020231](https://doi.org/10.3390/cancers11020231) PMID: 30781428
 41. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin Cancer Res*. 2000; 6(7): 2585-97. PMID: 10914698
 42. Clark AS, Deans B, Stevens MF, Tisdale MJ, Wheelhouse RT, Denny BJ, et al. Antitumor imidazotetrazines. 32. Synthesis of novel imidazotetrazinones and related bicyclic heterocycles to probe the mode of action of the antitumor drug temozolomide. *J Med Chem*. 1995; 38(9): 1493-504. DOI: [10.1021/jm00009a010](https://doi.org/10.1021/jm00009a010) PMID: 7739008
 43. Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry*. 1994; 33(31): 9045-51. DOI: [10.1021/bi00197a003](https://doi.org/10.1021/bi00197a003)
 44. Bull VL, Tisdale MJ. Antitumour imidazotetrazines-XVI. Macromolecular alkylation by 3-substituted imidazotetrazinones. *Biochem Pharmacol*. 1987; 36(19): 3215-20. DOI: [10.1016/0006-2952\(87\)90636-8](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90636-8) PMID: 2444229
 45. Liu L, Nakatsuru Y, Gerson SL. Base excision repair as a therapeutic target in colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2002; 8(9): 2985-91. PMID: 12231545
 46. Wedge SR, Porteous JK, Newlands ES. 3-aminobenzamide and/or O6-benzylguanine evaluated as an adjuvant to temozolomide or BCNU treatment in cell lines of variable mismatch repair status and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity. *Br J Cancer*. 1996; 74(7): 1030-6. DOI: [10.1038/bjc.1996.485](https://doi.org/10.1038/bjc.1996.485) PMID: 8855970
 47. Friedman HS, Dolan ME, Pegg AE, Marcelli S, Keir S, Catino JJ, et al. Activity of temozolomide in the treatment of central nervous system tumor xenografts. *Cancer Res*. 1995; 55(13): 2853-7. PMID: 7796412