Journal of Zabol Medical School

Vol 6; No. 3; Autumn 2023: 97-106

Original Article

10.18502/jzms.v6i3.14794

Crossref

Investigating the Effect of *Lippia Citriodora* Leaf Hydro-Ethanolic Extract on Two Prostate Cancer Cell Lines PC-3 and LNCaP Alone and in Combination with Docetaxel

Mehdi Fazeli[1]

Received: 11.07.2023
Accepted: 01.09.2023
Published: 07.10.2023

Abstract

Background: Prostate cancer is the most common cancer in men. Docetaxel is the most important drug for prostate cancer, but drug resistance reduces its effectiveness. One of the important strategies to increase the drug efficacy is the use of combination therapy. This study investigated toxic effect of *Lippia citriodora* leaf extract on two prostate cancer cell lines and its effect on docetaxel cytotoxicity.

Methods: Cytotoxicity of *Lippia citriodora* leaf extract was evaluated individually or in combination with docetaxel. Cells were cultured in 96-well plates. After treating cells with different concentrations of extracts and drugs, their survival was measured by MTT assay.

Results: *Lippia citriodora* leaf extract showed a highly toxic effect on prostate cancer cells. The extract at the highest concentration, decreased the percentage of viable cells to 18.01 ± 1.37 in PC-3 cells and to 20.80 ± 1.06 in LNCaP cells. The IC50 value of the extract was 78.14 mg/ml for PC-3 cells and 88.76 mg/ml for LNCaP cells. In addition, the extract increased the cytotoxicity of docetaxel. In the maximum increasing effect, the percentage of survival in PC-3 and LNCaP cells decreased from 50.87 ± 2.46 to 26.48 ± 1.12 and from 54.13 ± 1.83 to 28.84 ± 1.69, respectively.

Conclusion: *Lippia citriodora* leaf extract had a remarkable toxic effect on prostate cancer cells in vitro and increased docetaxel cytotoxicity. The antitumor effects of the extract can be further evaluated in vivo and clinical trials.

Keywords: Prostate cancer; Cytotoxicity; Docetaxel; Hydro-ethanolic extract; *Lippia citriodora* leaf

Citation: Fazeli M. **Investigating the Effect of *Lippia Citriodora* Leaf Hydro-Ethanolic Extract on Two Prostate Cancer Cell Lines PC-3 and LNCaP Alone and in Combination with Docetaxel?.** J Zabol Med Sch 2023; 6(3): 97-106.

1- Professor, Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Mehdi Fazeli, **Email:** mfazeli@shirazu.ac.ir

مجله دانشکده پزشکی زابل
دوره ٦، شماره ٣؛ پاییز ١٤٠٢: ١٠٦-٩٧

مقاله پژوهشی

10.18502/jzms.v6i3.14794

بررسی اثر عصاره‌ی آبی–اتانولی برگ به لیمو بر دو رده‌ی سلولی سرطان پروستات PC-3 و LNCaP به تنهایی و در ترکیب با دوستاکسل

مهدی فاضلی[1]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۰
تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۷/۱۵

چکیده

مقدمه: سرطان پروستات، شایع‌ترین سرطان در مردان می‌باشد. دوستاکسل مهم‌ترین دارو برای درمان این بدخیمی است که مقاومت دارویی اثربخشی آن را کاهش می‌دهد. یکی از راهکارهای مهم افزایش اثر دارو، استفاده از درمان ترکیبی است. این مطالعه به بررسی اثر سمی عصاره‌ی برگ به لیمو بر دو رده‌ی سلولی سرطان پروستات و تأثیر آن بر سمیت سلولی دوستاکسل پرداخته است.

شیوه‌ی مطالعه: سمیت سلولی عصاره‌ی برگ به لیمو به صورت جداگانه و یا در ترکیب با دوستاکسل مورد ارزیابی قرار گرفت. سلول‌ها در پلت‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره و دارو، زنده‌مانی آن‌ها با آزمون MTT اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: عصاره‌ی برگ به لیمو، اثر سمی بالایی بر سلول‌های سرطان پروستات نشان داد. عصاره در بالاترین غلظت، سبب کاهش درصد سلول‌های زنده به ۱/۳۷ ± ۱۸/۰۱ در سلول‌های PC-3 و به ۱/۰۶ ± ۲۰/۸۰ در سلول‌های LNCaP، گردید. مقدار IC50 عصاره ۷۸/۱۴ میلی گرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های PC-3 و ۸۸/۷۶ میلی گرم بر میلی‌لیتر برای سلول‌های LNCaP به دست آمد. به علاوه، عصاره‌ی سمیت سلولی دوستاکسل را افزایش داد. در حداکثر اثر افزایشی، درصد زنده‌مانی در سلول‌های PC-3 و LNCaP به ترتیب از ۲/۴۶ ± ۵۰/۸۷ به ۱/۱۲ ± ۲۶/۴۸ و از ۱/۸۳ ± ۵۴/۱۳ به ۱/۶۹ ± ۲۸/۸۴ کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: عصاره‌ی برگ به لیمو، اثر سمی مشخصی بر سلول‌های سرطان پروستات در شرایط برون‌تنی داشت و سمیت سلولی دوستاکسل را افزایش داد. اثرات ضد توموری عصاره می‌تواند مورد ارزیابی بیش‌تر در شرایط درون‌تنی و بالینی قرار گیرد.

کلمات کلیدی: سرطان پروستات؛ سمیت سلولی؛ دوستاکسل؛ عصاره‌ی آبی–اتانولی؛ برگ به لیمو

ارجاع: فاضلی مهدی. **بررسی اثر عصاره‌ی آبی–اتانولی برگ به لیمو بر دو رده‌ی سلولی سرطان پروستات PC-3 و LNCaP به تنهایی و در ترکیب با دوستاکسل.** مجله دانشکده پزشکی زابل ۱۴۰۲؛ ۶(۳): ۱۰۶-۹۷.

مقدمه

سرطان پروستات، به عنوان معمول‌ترین سرطان و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در مردان در سراسر دنیا شناخته می‌شود (۱). فاکتورهای مختلفی از جمله ژنتیک، عوامل محیطی، سن، نژاد، تاریخچه‌ی فامیلی و شیوه‌ی زندگی در بروز، افزایش شیوع و پیشرفت سرطان پروستات نقش دارند. از بین پارامترهای مهم، ارتباط شیوه‌ی زندگی، ورزش، تغذیه و چاقی، با توسعه و پیشرفت سرطان پروستات به خوبی شناخته شده است (۲، ۳).

حذف آندروژن‌ها (Androgen deprivation therapy) ADT و استفاده از داروهای شیمی‌درمانی، دو روش درمانی استاندارد برای سرطان پروستات هستند (۴). شیمی‌درمانی به منظور از بین بردن و یا مهار رشد سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. برای شیمی‌درمانی سرطان پروستات از داروهای دوستاکسل، پکلیتاکسل، کاباکسیتاکسل و میتوزانترون استفاده می‌شود که دوستاکسل و پکلیتاکسل از داروهای شناخته شده هستند (۵، ۶). داروی دوستاکسل به عنوان خط اول درمان، با اتصال به بتا توبولین‌ها، دپلیمریزه شدن میکروتوبول‌ها را مهار می‌کند که نتیجه‌ی آن توقف تقسیم سلولی و شروع آپوپتوز است. مقاومت دارویی از مهم‌ترین عوامل کاهش اثر داروهای شیمی‌درمانی است. مقاومت نسبت به داروی

۱- استاد، گروه علوم پایه، دانشکده‌ی دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
نویسنده مسؤول: مهدی فاضلی
Email: mfazeli@shirazu.ac.ir

دوستاکسل با افزایش بیان ژن مقاومت چندگانه ۱ (MDR1) که پی گلیکوپروتئین را کد می‌کند، همراه است. ترکیب درمانی به عنوان یک راهکار مؤثر برای مقابله با انواع مختلف سرطان پروستات شناخته شده است (۲).

گیاه به لیمو با نام علمی *Lippia citriodora* از خانواده شاه‌پسند (Verbenaceae) است که بیش از ۲۰۰ گونه دارد. از ترکیب‌های مهم گونه‌های مختلف این گیاه می‌توان از اسیدهای فنولیک شامل مشتقات کافئیک اسید مثل ورباسکوزید (Verbascoside) نام برد. عمده فلوونوئیدهای شناخته شده این گیاه، فلاون‌ها هستند که از بین آن‌ها، تری‌سولفیت فلاوون‌ها از گونه‌ی *L. citriodora* جداسازی شده‌اند. آلکالوئیدها از دیگر ترکیب‌های شناسایی شده در این گیاه می‌باشند (۷). برگ‌های گیاه به لیمو دارای مقادیر بالایی از ترکیب‌های قطبی شامل فنیل پروپانوئیدها، فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و گلیکوزیدهای ایریدئید می‌باشد (۸). از جمله ترکیب‌های شناسایی شده از این گیاه می‌توان به اسپاتولنول (Spathulenol) و کاریوفیلن (Caryophyllene) (۹، ۱۰)، فلاوئید لوتئولین (۱۱)، تری ترپنوئیدهای لیپیاسین (Lipiacin) و و هالریدون (Haloridone) (۱۲) اشاره کرد.

گیاه به لیمو در طب سنتی به عنوان درمان برای ناراحتی‌های گوارشی و تنفسی استفاده می‌شود (۷). این گیاه اثرات ضد درد، ضد التهاب و ضد تب (۷)، ضد اضطرابی و خواب‌آوری در موش (۱۳)، ضد افسردگی و آرام‌کنندگی اعصاب (۱۴) و ضد تشنج (۱۵) دارد. اثرات ضدالتهابی، ضد میکروبی و ضد توموری ترکیب‌های این گیاه عمدتاً مربوط به اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌هاست (۸، ۱۶). تحقیقات متعدد نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو طولانی‌مدت می‌تواند در ایجاد التهاب مزمن و در نتیجه بروز بیماری‌های مختلف از قبیل سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی، عصبی، تنفسی و عفونی نقش داشته باشد. استرس اکسیداتیو با فعال کردن فاکتورهای رونویسی متعدد سبب بیان ژن‌های مختلف از جمله ژن‌های دخیل در پروسه‌های التهابی می‌شود (۱۷). از آن‌جا که سرطان پروستات و تغییر در گونه‌های فعال اکسیژن (Reactive oxygen species) ROS در سنین بالا رایج‌تر است، استرس اکسیداتیو می‌تواند نقش مهمی در بروز و پیشرفت این بدخیمی داشته باشد. استرس اکسیداتیو به دلیل تولید بالای گونه‌های فعال اکسیژن و یا کاهش مکانیسم‌های دفاعی آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شود (۱۸). پلی‌فنل‌ها با داشتن پتانسیل ضد التهابی یه خاطر فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌شان، ترکیب‌های مفیدی برای درمان ترکیبی هستند. پلی‌فنل‌ها با مهار آنزیم‌های درگیر در تولید گونه‌های فعال اکسیژن، باعث جذب رادیکال‌های آزاد و افزایش توان آنتی‌اکسیدانی می‌شوند (۱۹). شواهد پیش‌کلینیکی و کلینیکی با قوت پیشنهاد می‌کنند که مواد غذایی سرشار از پلی‌فنل‌ها نقش محافظتی در برابر ایجاد و پیشرفت انواع بیماری‌های مرمن ایفا می‌کنند (۲۰). ورباسکوزید یک ترکیب گلیکوزید فنیل پروپانوئید جدا شده از برگ به لیمو و تعداد دیگری از گیاهان است که دارای اثرات مفید متعددی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضددرد، ضد التهاب، ضد باکتریایی و نقش محافظتی برای دستگاه گوارش، قلب و سیستم عصبی می‌باشد (۱۳). پلی‌فنل‌های به لیمو اختلالات ناشی از چاقی را کاهش می‌دهند (۲۱) که این اثر مفید به دلیل تعدیل در ترکیب فلور طبیعی دستگاه گوارش می‌باشد (۲۲).

سرطان پروستات معمولاً در مراحل انتهایی تشخیص داده می‌شود. بنابراین، پاسخ درمانی به شیمی‌درمانی کم است. دوستاکسل یکی از بهترین درمان‌ها برای بهبود سرطان پروستات متاستاتیک مقاوم به اخته بوده است اما مقاومت به دارو اثر درمانی را کاهش می‌دهد. استفاده از ترکیب دوستاکسل و پردنیزولون اثربخشی درمان و کیفیت زندگی را در این بیماران بهبود می‌بخشد (۵). ترکیب‌های طبیعی شامل عصاره‌ها و مواد خالص به دست آمده از منابع مختلف، به دلیل دارا بودن ساختمان بسیار متنوع و مواد شیمیایی پیچیده و همچنین تأثیر بر مسیرهای سیگنالینگ در داخل سلول، پتانسیل مقابله با سلول‌های سرطانی را دارند. در بین این مواد، ترکیب‌های فنلی به دلیل نقش‌شان در پیش‌گیری و یا درمان بسیاری از بیماری‌ها، توجه بیش‌تری را به خود جلب کرده‌اند (۲۳). عمده مطالعات برای شناسایی ترکیب‌ها و اثرات گیاهان خانواده‌ی شاه‌پسند بر روغن‌های فرار آن‌ها انجام شده است. اما از آن‌جا که این گیاه عمدتاً به صورت دم کرده مورد استفاده قرار می‌گیرد، لازم است ترکیبات و اثرات عصاره‌ی آن مورد بررسی و توجه بیش‌تر قرار گیرد (۱۱). اثر سینرژیست ترکیب‌های طبیعی همراه با مواد شیمی‌درمانی رایج، به عنوان یک راهکار مناسب برای درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است (۲۴). مطالعات زیادی در مورد اثرات ضد سرطانی برگ به لیمو وجود

ندارد. اثرات سمیت سلولی و آپوپتوزی برگ این گیاه بر رده‌ی سرطانی کلون HT29 (۹) و رده‌ی سلولی سرطان تخمدان A2780 (۲۵) ورد بررسی شده است. مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر سمی عصاره‌ی آبی-اتانولی برگ گیاه به لیمو و نقش احتمالی آن در تقویت سمیت سلولی دوستاکسل در دو رده‌ی سلولی سرطان پروستات PC-3 و LNCaP پرداخته است.

مواد و روش‌ها

عصاره‌گیری: برگ به لیمو خشک با آسیاب برقی (گوسکونیک، ایران) به صورت پودر در آمد. برای تهیه‌ی عصاره، ۱۰ گرم از پودر گیاه به ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد (مرک، آلمان) افزوده شد و پس از مخلوط شدن، به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق بر روی همزن برقی قرار گرفت. محلول به دست آمده با استفاده از کاغذ واتمن (میلیپور، آمریکا) شماره ۱ فیلتر شد و اتانول آن به وسیله‌ی دستگاه تبخیرکننده‌ی چرخشی (هایدولف، آلمان)، تبخیر گردید. عصاره‌ی باقی‌مانده توسط دستگاه خشک‌کن انجمادی (کریست، آلمان) خشک و پودر گردید و در دمای ۲۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شد. عصاره در زمان استفاده در نرمال‌سالین حل گردید.

کشت سلول: سلول‌های PC-3 و LNCaP در محیط کشت RPMI 1640 (بیوایده، ایران) دارای ۱۰ درصد سرم جنین گاو (گیبکو، آمریکا) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین (گیبکو، آمریکا) در انکوباتور (ممرت، آلمان) در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد با هوای مرطوب و ۵ درصد CO2 کشت داده شدند. برای سلول‌های MCF-10A، از محیط کشت DMEM/F12 (بیوایده، ایران) حاوی ۵ درصد سرم اسب (جمینی بایو، آمریکا)، ۲۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر فاکتور رشد اپیدرمی (سیگما، آمریکا)، ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر انسولین (سیگما، آمریکا)، ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر هیدروکورتیزون (سیگما، آمریکا)، ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر سم وبا (سیگما، آمریکا) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین (گیبکو، آمریکا) استفاده گردید.

تیمار سلول‌ها: به منظور بررسی اثر سمی عصاره‌ی برگ به لیمو بر دو رده سلولی سرطان پروستات PC-3 و LNCaP و رده‌ی سلولی اپیتلیال طبیعی MCF-10A، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ی تیمار شدند. قبل از افزودن عصاره به سلول‌ها، عصاره با فیلتر سرنگی استریل می‌گردید. سلول‌ها در کف چاهک‌های پلت ۹۶ خانه (SPL، کره) با تراکم ۱۰۴ سلول در هر چاهک در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مناسب کشت داده شدند و در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 انکوبه شدند تا رشد کرده و به کف چاهک بچسبند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت که سلول‌ها به اندازه کافی رشد کردند و از نظر تعداد و شکل به حد مطلوب (تراکم ۸۰-۷۰ در صد) رسیدند، محیط کشت به طور کامل و به آرامی برداشته و دور ریخته شد. محیط کشت با محیط تازه جایگزین شد و عصاره برگ به لیمو با غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در تکرارهای سه‌تایی به چاهک‌ها اضافه شد (حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر) و سلول‌ها ۴۸ ساعت انکوبه شدند. گروه کنترل، ترکیبی دریافت نکرد. برای ارزیابی تأثیر عصاره بر سمیت سلولی دوستاکسل، دو غلظت ۲۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره همراه با غلظت‌های مختلف دارو ۱، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار به سلول‌ها افزوده شدند. این دو غلظت اثر سمی برای سلول‌های طبیعی نداشتند. پس از تیمار، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند.

بررسی سمیت سلولی: برای اندازه‌گیری اثر سمی عصاره‌ی برگ به لیمو و داروی دوستاکسل از روش رنگ‌سنجی [۳-(۴،۵)-دی متیل تیازول-۲-ایل)-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم بروماید] (MTT) استفاده شد. ماده‌ی MTT نمک تترازلیوم محلول در آب است که پس از آماده‌سازی در بافر فسفات سالین (PBS) یا محیط کشت فاقد فنل رد به رنگ زرد در می‌آید. این ترکیب در سلول‌های زنده توسط آنزیم سوکسینات دهیدروژناز که یکی از آنزیم‌های چرخه‌ی تنفسی میتوکندری است احیا شده و به فرمازان نامحلول بنفش رنگ تبدیل می‌شود. با استفاده از محلول‌هایی مانند SDS، DMSO و آیزوپروپانول اسیدی، کریستال‌های فورمازان شکسته شده و محلول بنفش رنگ تولید می‌کند (۲۶).

تبدیل تترازولیم آبی به فرمازان بنفش توسط سلول‌هایی که از نظر متابولیکی فعال هستند میزان زنده‌مانی را نشان می‌دهد. سلول‌ها به نحوی که در قسمت قبل شرح داده شد، کشت داده شده و تیمار شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، محیط کشت تخلیه و سلول‌ها با PBS شستشو داده شدند. این کار به منظور شستن بقایای احتمالی عصاره و محیط کشت برای جلوگیری از تداخل با جذب نوری رنگ فرمازان، انجام شد. در ادامه، محلول

۱۲ میلی مولار MTT (بیوایده، ایران) به میزان ۱۰ میکرولیتر همراه با ۹۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI1640 بدون فنل رد به چاهک‌ها اضافه گردید و سلول‌ها برای مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2 انکوبه شدند. سپس ۵ میکرولیتر محلول DMSO به چاهک‌ها افزوده شد و ۱۰ دقیقه در انکوباتور قرار داده شد. میزان جذب نوری محلول به دست آمده، در طول موج ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader (بیوتک، آمریکا)، اندازه‌گیری شد. آزمایش ها سه بار تکرار شد و در هر مرحله برای هر غلظت سه چاهک در نظر گرفته شد (۲۷).

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و تست تعقیبی Tukey در نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۲۲ (version 22, IBM Corporation, Armonk, NY) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. سطح معنی‌داری p value < ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

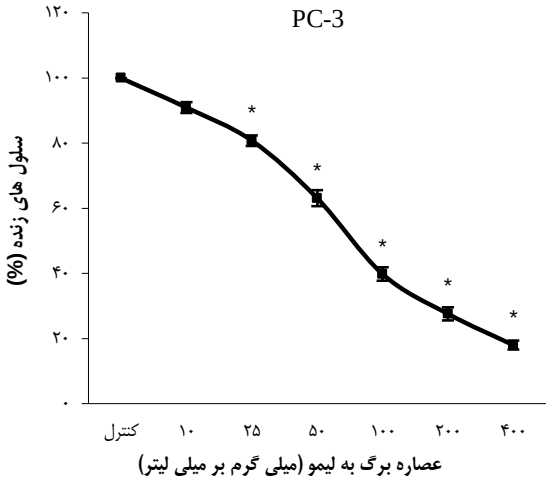
این مطالعه با حمایت گرنت پژوهشی دانشگاه شیراز با کد اخلاق 1GRC1M1286 انجام شد.

یافته‌ها

اثر سمی عصاره‌ی برگ به لیمو بر رده‌های سلولی سرطان پروستات PC-3 و LNCaP و تأثیر آن بر سمیت سلولی دوستاکسل با استفاده از روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.

میزان زنده‌مانی رده‌ی سلولی سرطان پروستات PC-3 در مواجهه با غلظت‌های مختلف عصاره برگ به لیمو غلظت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها افروده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT مورد سنجش قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار درصد زنده‌مانی سلول‌ها گزارش گردید. عصاره‌ی برگ به لیمو درصد سلول‌های زنده را کاهش داد (شکل ۱) که این کاهش وابسته به غلظت بود. در بالاترین غلظت تست شده‌ی عصاره پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، درصد زنده‌مانی سلول‌ها به ۱/۳۷ ± ۱۸/۰۱ درصد رسید. کم‌ترین غلظت عصاره برای کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های زنده، ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. میزان IC50 عصاره ۷۸/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد.

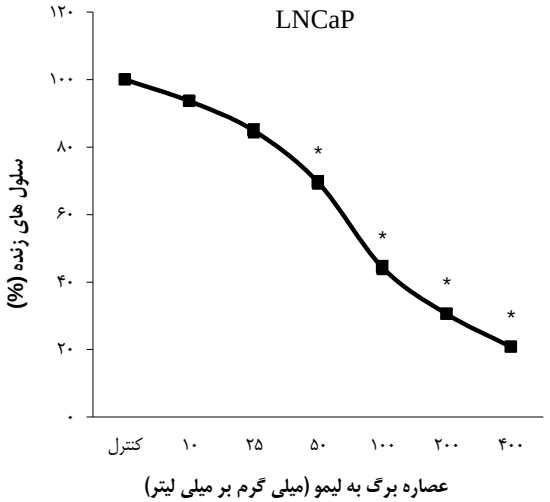
اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ به لیمو بر میزان زنده‌مانی رده سلولی سرطان پروستات LNCaP پس از تیمار سلول‌ها با عصاره و ۴۸ ساعت انکوباسیون، درصد سلول‌های زنده به روش MTT اندازه‌گیری شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار درصد زنده‌مانی سلول‌ها می‌باشد.



شکل ۱: اثر عصاره‌ی برگ به لیمو بر زنده‌مانی سلول‌های PC-3

*: p value < ۰/۰۵ در مقایسه با کنترل

عصاره‌ی برگ به لیمو به صورت وابسته به غلظت درصد سلول‌های زنده را کاهش داد (شکل ۲) به شکلی که درصد سلول‌های زنده پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون به ۱/۰۶ ± ۲۰/۸۰ درصد در بالاترین غلظت تست شده، کاهش یافت. پایین‌ترین غلظت عصاره که توانست سبب کاهش معنی‌دار درصد سلول‌های زنده شود، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. میزان IC50 عصاره ۸۸/۷۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید.

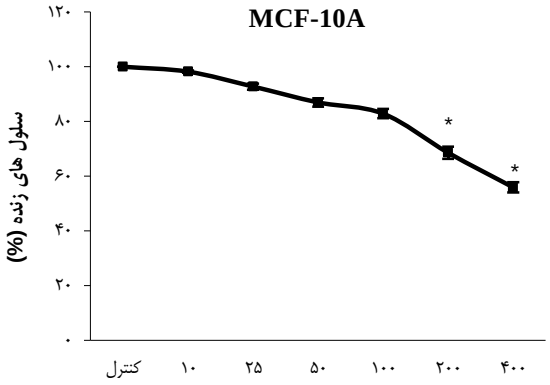


شکل ۲: تأثیر عصاره برگ به لیمو بر سلول‌های LNCaP

*: p value < ۰/۰۵ در مقایسه با کنترل

اثر غلظت‌های مختلف عصاره برگ به لیمو بر میزان زنده‌مانی رده‌ی سلولی اپیتلیال طبیعی MCF-10A پس از اضافه کردن غلظت‌های مختلف عصاره به سلول‌ها و

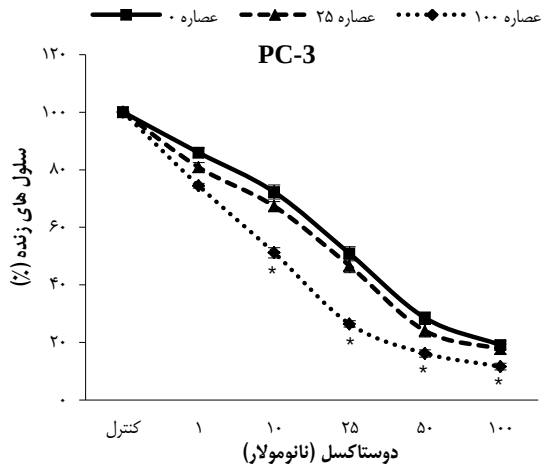
انکوباسیون برای ۴۸ ساعت، زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار درصد زنده مانی سلول ها نشان داده شد. عصاره‌ی برگ به لیمو در غلظت‌های پایین اثری بر سلول‌های طبیعی نداشت. عصاره در مقادیر بالا به شکل وابسته به غلظت درصد سلول‌های زنده را کاهش داد اما حتی در غلظت‌های بالا اثرش کم‌تر از اثر آن بر سلول‌های سرطانی بود (شکل ۳). پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون، درصد سلول‌های زنده در بالاترین غلظت تست شده ۱/۹۱ ± ۵۵/۹۱ درصد به دست آمد. کم‌ترین غلظت عصاره برای کاهش معنی‌دار سلول‌های زنده ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در بیش‌ترین غلظت استفاده شده، کم‌تر از ۵۰ درصد سلول‌ها از بین رفتند.



شکل ۳: اثر عصاره‌ی برگ به لیمو بر سلول‌های اپیتلیال طبیعی MCF-10A

*: p value < ۰/۰۵ در مقایسه با کنترل

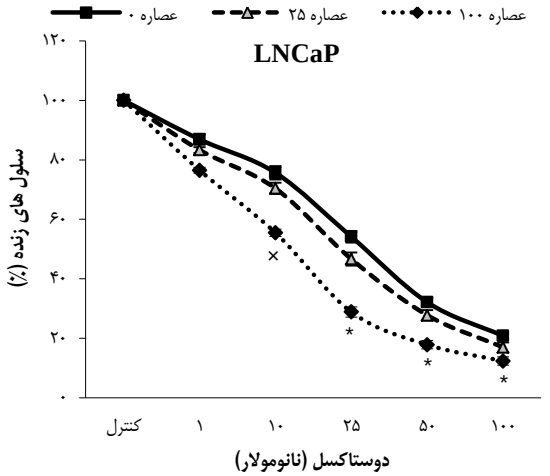
تأثیر عصاره‌ی برگ به لیمو بر سمیت سلولی دوستاکسل در رده‌ی سلولی سرطان پروستات PC-3 دو غلظت غیرسمی عصاره همراه با غلظت‌های مختلف دارو به سلول‌ها افزوده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون، زنده‌مانی سلول‌ها با روش MTT اندازه‌گیری گردید. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار درصد زنده‌مانی سلول‌ها گزارش شد. برای بررسی نقش عصاره‌ی برگ به لیمو بر اثر سمی دوستاکسل، عصاره‌ی همزمان با دارو به سلول‌ها افزوده شد. به دنبال انکوباسیون به مدت ۴۸ ساعت، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره اثر سمی غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار دوستاکسل را به شکل معنی‌دار افزایش داد. غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره تأثیر معنی‌داری بر فعالیت سمی دوستاکسل نداشت (شکل ۴).



شکل ۴: تأثیر عصاره‌ی برگ به لیمو بر سمیت سلولی دوستاکسل در سلول‌های PC-3

*: p value < ۰/۰۵ در مقایسه با دوستاکسل به تنهایی

نقش عصاره‌ی برگ به لیمو بر اثر سمی دوستاکسل در رده سلولی سرطان پروستات LNCaP سلول‌ها با دو غلظت غیرسمی عصاره و غلظت‌های مختلف دارو تیمار شدند و زنده‌مانی آن‌ها بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، به روش MTT سنجیده شد. داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار درصد زنده‌مانی سلول‌ها گزارش گردید. تأثیر عصاره‌ی برگ به لیمو بر فعالیت سمی داروی دوستاکسل با اضافه کردن همزمان عصاره و دارو به سلول‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره سبب افزایش معنی‌دار سمیت سلولی غلظت‌های ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ نانومولار دوستاکسل شد. غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره، اثر معنی‌داری بر فعالیت سمی دوستاکسل نشان نداد (شکل ۵).



شکل ۵: تأثیر عصاره برگ به لیمو بر اثر سمی دوستاکسل بر سلول‌های LNCaP

*: p value < ۰/۰۵ در مقایسه با دوستاکسل به تنهایی

بحث و نتیجه‌گیری

بیش‌تر اثرات ترکیب‌های گیاه به لیمو مربوط به اثرات آنتی‌اکسیدانی آن‌هاست. رادیکال‌های آزاد مانند گونه‌های اکسیژن فعال در پروسه‌های پاتولوژیک از جمله بیماری‌های التهابی، آترواسکلروز و سرطان نقش دارند. ترکیب‌های فنلی با اثر مستقیم بر گونه‌های اکسیژن فعال و یا تحریک سیستم‌های محافظتی درونی در بدن، به محدود شدن ضایعات اکسیداتیو کمک می‌کنند (۸). ارتباط مستقیمی بین میزان جذب رادیکال‌های آزاد و سمیت سلولی ترکیب‌های جدا شده از گیاهان وجود دارد (۲۸).

اطلاعات چندانی در مورد اثر عصاره‌ی برگ به لیمو بر سلول‌های سرطانی و به ویژه رده‌های مختلف سلول‌های سرطان پروستات وجود ندارد. عمده‌ی گزارشات مربوط به اثرات روغن‌های فرار به لیمو می‌باشد. این تحقیق اثر سمی عصاره‌ی برگ به لیمو بر سلول‌های PC-3 و LNCaP را نشان داد. عصاره در بیشترین غلظت تست شده، درصد سلول‌های زنده را در سلول‌های PC-3 به ۱/۳۷± ۱۸/۰۱ و در سلول‌های LNCaP به ۱/۰۶ ± ۲۰/۸۰ درصد کاهش داد. احتمال می‌رود که اثر سمی برگ به لیمو بر سلول‌های سرطان پروستات عمدتاً مربوط به ترکیب‌های فنلی آن به ویژه ورباسکوزاید و ایزو ورباسکوزاید و اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهاب و القای آپوپتوز آن‌ها باشد (۸).

اکتئوزید یا ورباسکوزید، یک گلیکوزید فنیل اتانوئید جدا شده از برخی گیاهان است که اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد التهابی و همچنین توانایی تنظیم آپوپتوز را دارد (۲۳). در مطالعه‌ی میرزایی و همکاران، گیاه به لیمو اثر کشندگی بر سلول‌های کلون HT29 نشان داد و سبب افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن ضد آپوپتوز Bcl-2 و افزایش نسبت Bax:Bcl-2 شد که نشان‌دهنده‌ی ایجاد آپوپتوز در این سلول‌ها می‌باشد (۹).

عصاره‌ی برگ به لیمو از طریق افزایش فعالیت کاسپاز ۳ و القای آپوپتوز سبب مرگ سلول‌های تخمدان A2780 می‌شود (۲۵). عصاره‌ی برگ به لیمو، سلول‌های خونی را در برابر ضایعات اکسیداتیو محافظت می‌کند و اثرات ضد التهابی و ضد اسکلروز نشان می‌دهد. بیشترین ترکیب یافت شده در پلاسما ورباسکوزید و آیزوورباسکوزید و متابولیت‌های حاصل از آن‌ها شامل، هیدروکسی تایرازول، اسید کافئیک، اسید فرولیک و اسید هوموپروتوکاتکوییک به همراه ۸ ترکیب فنلی دیگر می‌باشد. بنابراین، فنیل پروپانوئیدهای ورباسکوزید و آیزوورباسکوزید و همچنین متابولیت‌های آن‌ها مسئول این اثرات هستند (۸). اثرات ضد توموری و سمیت سلولی گونه‌های دیگر خانواده‌ی شاه‌پسند نشان داده شده است. عصاره‌ی گیاه *Aloysia citrodora* سبب کاهش اندازه‌ی تومور در موش می‌شود (۲۹). گیاه *Lippia nodiflora* با القای آپوپتوز رشد سلول‌های سرطان ریه NCI-H460 را مهار می‌کند (۳۰).

دوستاکسل به عنوان خط اول درمان سرطان پروستات، علاوه برعوارض جانبی، مقاومت دارویی ایجاد می‌کند که می‌تواند موفقیت درمان را کاهش دهد. بنابراین، به عنوان یک راهکار مفید، درمان ترکیبی نسبت به استفاده از یک دارو برتری دارد و امروزه به کارگیری ترکیب‌های طبیعی با اثرات ضد توموری برای درمان ترکیبی توجه محققین را به خود جلب کرده است (۳۱).

در بسیاری از سرطان‌ها درمان‌های ترکیبی با استفاده از ترکیب‌های مختلف از جمله گیاهان و ترکیب‌های فعال آن‌ها همراه با مواد شیمی‌درمانی، اثربخشی درمان را افزایش و عوارض جانبی را کاهش می‌دهد و این امکان را فراهم می‌کند تا داروهای شیمی‌درمانی در مقادیر پایین‌تر و با عوارض کم‌تر مورد استفاده قرار گیرند (۳۲).

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی برگ به لیمو، سمیت سلولی دوستاکسل را به طور مشخصی افزایش می‌دهد. بیش‌ترین اثر را غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بر غلظت ۲۵ نانومولار دوستاکسل نشان داد که سبب کاهش درصد زنده‌مانی به ترتیب در سلول‌های PC-3 و LNCaP از ۲/۴۶ ± ۵۰/۸۷ به ۱/۱۲ ± ۲۶/۴۸ و از ۱/۸۳ ± ۵۴/۱۳ به ۱/۶۹ ± ۲۸/۸۴ گردید. این افزایش سمیت سلولی می تواند به دلیل اثر متفاوت هر یک از این ترکیب‌ها بر محل‌های مختلف در داخل سلول باشد. اثر سینرژیست ترکیب های طبیعی با داروهای شیمی‌درمانی در سرطان پروستات نشان داده شده است (۳۳). اثرات سینرژیست ترکیب‌های مختلف حداقل با چهار مکانیسم می‌تواند ایجاد شود که از بین آن‌ها حداقل دو مکانیسم می‌توانند در بروز اثرات سینرژیست داروها و یا ترکیب‌های طبیعی با داروهای شیمی‌درمانی رایج نقش داشته باشند. یکی اثرات سینرژیستی که به واسطه‌ی تأثیر بر چند محل اثر و دیگری آن که از طریق مقابله با مقاومت دارویی ایجاد می‌شود (۳۴). ترکیب‌های فعال گیاهان نشان داده‌اند که اثر سینرژیست با مواد شیمی‌درمانی دارند. این ترکیب‌ها

سمیت سلولی دارو و تجمع آن در داخل سلول را با مهار انتقال دهنده‌ها افزایش می‌دهند (۳۵).

اسید روبوریک، یک ترکیب تری‌ترپنوئید جدا شده از گیاه جمتیانا با دوستاکسل اثر سینرژیست بر مهار رشد سلول‌های سرطان پروستات دارد. این ترکیب سبب القای آپوپتوز و کاهش تهاجم و مهاجرت سلول‌ها می‌شود (۳۶). در ترکیب با دوستاکسل، سایکوساپونین A به دست آمده از گیاه Bupleurum می‌تواند از طریق افزایش اتوفاژی در سلول‌های سرطان پروستات، اثربخشی دارو را افزایش داده و برگشت تومور را کاهش دهد (۳۷).

در یک مطالعه نشان داده شد که استر اسید کافئیک که یک ترکیب از پرپولیس است، می‌تواند با کاهش میزان سایکلین D1 و c-Myc، کاهش نسبت پروتئین ضد آپوپتوز Bcl-2 به پروتئین پروآپوپتوتیک Bax و افزایش میزان و فعالیت کاسپاز ۳، سمیت سلولی دوستاکسل و پاکسیتاکسل را در سلول‌های سرطان پروستات افزایش دهد (۳۸). سولامارجین یک آلکالوئید طبیعی جدا شده از سولانوم، اثر سمی برای سلول‌های سرطان پروستات مقاوم به اخته دارد و تأثیر داروی دوستاکسل را افزایش می‌دهد. این اثرات با مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt صورت می‌پذیرد (۳۹).

مقاومت دارویی از مهم‌ترین پیامدهای نامطلوب درمان تک دارویی است و یکی از مکانیسم‌های اثرات سینرژیستی ترکیب‌های مختلف، مقابله با مقاومت دارویی می‌باشد. پلی‌فنل‌ها از مهم‌ترین ترکیب‌های گیاهان هستند که با تعدیل استرس‌های اکسیداتیو می‌توانند با مقاومت دارویی مقابله کنند و امیداری را برای بهبود درمان ایجاد نمایند (۳۴). نقش مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt به عنوان یک آنکوژن، در پیشرفت سرطان پروستات به خوبی شناخته شده است. تحریک مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt زنده‌مانی سلول‌های سرطان پروستات را افزایش می‌دهد و از آپوپتوز جلوگیری می‌کند (۴۰). مصرف همزمان کوئرستین و دوستاکسل در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی، مقاومت دارویی در سلول‌های سرطان پروستات را از طریق تأثیر بر مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt و بیان پی گلیکوپروتئین کاهش می‌دهد (۴۱). مهار مسیر سیگنالینگ PI3K/Akt با ترکیب‌های طبیعی به عنوان درمان کمکی با داروهای شیمی‌درمانی در سرطان تخمدان، ممکن است از طریق آپوپتوز، اثر درمانی را افزایش و عوارض جانبی را کاهش دهد (۴۲). بیان بالای پی گلیکوپروتئین به عنوان یک انتقال‌دهنده‌ی در سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سرطان پروستات، نشان‌دهنده‌ی نقش آن در بروز مقاومت دارویی است. مصرف همزمان ترکیب پاکسیتاکسل با سایکلوپامین میزان بیان پی گلیکو پروتئین و در نتیجه مقاومت دارویی را در سرطان پروستات کاهش می‌دهد (۶). دی‌ترپن‌های جدا شده از اسفنج دریایی فعالیت انتخابی بالایی علیه سلول‌های سرطان پروستات مقاوم به دوستاکسل و هورمون درمانی دارند. این ترکیب‌ها خروج دارو که به واسطه پی گلیکوپروتئین انجام می‌شود را مهار می‌کنند و به این صورت با بازگرداندن حساسیت سلول‌ها، اثر سینرژیست با دوستاکسل نشان می‌دهند (۴۳).

عصاره‌ی برگ به لیمو در شرایط برون‌تنی اثر سمی بر رده‌های سلولی سرطان پروستات دارد. به علاوه، عصاره می‌تواند سمیت سلولی دوستاکسل را افزایش دهد. بنابراین، شناسایی ترکیب‌های مؤثره این گیاه با بیش‌ترین سمیت سلولی و اثر سینرژیستی برای از بین بردن سلول‌های سرطانی و همچنین انجام آزمایش‌های تکمیلی درون‌تنی و بالینی، امکان استفاده از آن به عنوان یک راهکار مناسب برای درمان ترکیبی در شیمی‌درمانی را فراهم می‌سازد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری کارکنان بخش فارماکوژی که در انجام این مطالعه همکاری نمودند قدردانی می‌نماییم.

References

1. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2021; 71(1): 7-33.
2. Sekhoacha M, Riet K, Motloung P, Gumenku L, Adegoke A, Mashele S. Prostate Cancer review: Genetics, diagnosis, treatment options, and alternative approaches. Molecules 2022; 27(17): 5730.
3. Matsushita M, Fujita K, Nonomura N. Influence of diet and nutrition on prostate cancer. Int J Mol Sci 2020; 21(4): 1447.
4. Marchetti A, Tassinari E, Rosellini M, Rizo A, Massari F, Molica V. Prostate cancer and novel pharmacological treatment options-what's new for 2022? Expert Rev Clin Pharmacol 2023; 16(3): 231-44.
5. Belkahla S, Nahvi I, Biswas S, Nahvi I, Ben Amor N. Advances and development of prostate cancer, treatment, and strategies: A systemic review. Front Cell Dev Biol 2022; 10: 991330.

6. Hashemi M, Zandieh MA, Talebi Y, Rahmanian P, Shafiee SS, Maghsodlou Nejad S, et al. Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: Molecular mechanisms and possible therapeutic strategies. Biomed Pharmacother 2023; 160: 114392.
7. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Sánchez Mata D, Villar A. Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. J Ethnopharmacol 2001; 76(3): 201-14.
8. Quirantes-Piné R, Herranz-López M, Funes L, Borrás-Linares I, Micol V, Segura-Carretero A, et al. Phenylpropanoids and their metabolites are the major compounds responsible for blood-cell protection against oxidative stress after administration of *Lippia citriodora* in rats. Phytomedicine 2013; 20(12): 1112-8.
9. Mirzaie A, Sadat Shandiz SA, Noorbazargan H, Ali Asgary E. Evaluation of chemical composition, antioxidant, antibacterial, cytotoxic and apoptotic effects of *Aloysia citrodora* extract on colon cancer cell line [in Persian]. Tehran Univ Med J 2016; 74(3): 168-76.
10. Skaltsa H, Shammas G. Flavonoids from *Lippia citriodora*. Planta Med 1988; 54(5): 465.
11. Stashenko EE, Martínez JR, Cala MP, Durán DC, Caballero D. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from Lippia (Verbenaceae) aromatic plants. J Sep Sci 2013; 36(1): 192-202.
12. Ombito JO, Salano EN, Yegon PK, Ngetich WK, Mwangi EM. A review on the chemistry of some species of genus Lippia (Verbenaceae family). J Sci Innov Res 2014; 3(4): 460-6.
13. Razavi BM, Zargarani N, Hosseinzadeh H. Anti-anxiety and hypnotic effects of ethanolic and aqueous extracts of *Lippia citriodora* leaves and verbascoside in mice. Avicenna J Phytomed 2017; 7(4): 353-65.
14. Sabti M, Sasaki K, Gadhi C, Isoda H. Elucidation of the molecular mechanism underlying *Lippia citriodora* (Lim.)-induced relaxation and anti-depression. Int J Mol Sci 2019; 20(14): 3556.
15. Rashidian A, Farhang F, Vahedi H, Dehpour AR, Ejtemai Mehr S, Mehrzadi S, et al. Anticonvulsant effects of lippia citriodora (Verbenaceae) leaves ethanolic extract in mice: Role of GABAergic system. Int J Prev Med 2016; 7: 97.
16. Kumar NK, Kandula SK, Raman BV, Reddy IB, Ramarao M, Rajagopal SV. Antibacterial activity of *Lippia citriodora* a folklore plant. J Pure Appl Microbiol 2008; 2(1): 249-52.
17. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? Free Radic Biol Med 2010; 49(11): 1603-16.
18. Khandrika L, Kumar B, Koul S, Maroni P, Koul HK. Oxidative stress in prostate cancer. Cancer Lett 2009; 282(2): 125-36.
19. Hussain T, Tan B, Yin Y, Blachier F, Tossou MCB, Rahu N. Oxidative stress and inflammation: What polyphenols can do for us? Oxid Med Cell Longev 2016; 2016: 7432797.
20. Rudrapal M, Khairnar SJ, Khan J, Dukhyil AB, Ansari MA, Alomary MN, et al. Dietary polyphenols and their role in oxidative stress induced human diseases: Insights into protective effects, antioxidant potentials and mechanism(s) of action. Front Pharmacol 2022; 13: 806470.
21. Herranz-López M, Barrajón-Catalán E, Segura-Carretero A, Menéndez JA, Joven J, Micol V. Lemon verbena (*Lippia citriodora*) polyphenols alleviate obesity-related disturbances in hypertrophic adipocytes through AMPK-dependent mechanisms. Phytomedicine 2015; 22(6): 605-14.
22. Silva M, Cueva C, Alba C, Rodriguez JM, de Pascual-Teresa S, Jones J, et al. Gut microbiome-modulating properties of a polyphenol-enriched dietary supplement comprised of hibiscus and lemon verbena extracts. Monitoring of phenolic metabolites. J Funct Foods 2022; 91: 105016.
23. Cheimonidia C, Samarab P, Polychronopoulosc P, Tsakiria EN, Nikouc T, Myrianthopoulosd V, et al. Selective cytotoxicity of the herbal substance acteoside against tumor cells and its mechanistic insights. Redox Biol 2018; 16: 169-78.
24. Castañeda AM, Meléndez CM, Uribe D, Pedroza-Diaz J. Synergistic effects of natural compounds and conventional chemotherapeutic agents: recent insights for the development of cancer treatment strategies. Heliyon 2022; 8(6): e09519.
25. Amini E, Nabiuni M, Baharara J, Behzad SB, Seyfi D, Salek F. Investigating the anticancer effect of *Lippia citriodora* leaf alcoholic extract: in suppression of A2780 ovarian cancer cell metastasis via restoration of E-cadherin expression [in Persian]. Cell & Tissue J 2019; 10(1): 24-33.
26. Mohsenzadeh S, Farokhmanesh M, Masoudi R. Cytotoxicity of echium amoenum fisch. et Mey. petals aqueous extract on human glioblastoma cells [in Persian]. IJMAPR 1399; 36(3): 438-47.
27. Ebadi P, Fazeli M. Anti-photoaging potential of propolis extract in UVB-irradiated human dermal fibroblasts through increasing the expression of FOXO3A and NGF genes. Biomed Pharmacother 2017; 95: 47-54.
28. Sammar M, Abu-Farich B, Rayan I, Falah M, Rayan A. Correlation between cytotoxicity in cancer cells and free radical-scavenging activity: In vitro evaluation of 57 medicinal and edible plant extracts. Oncol Lett 2019; 18(6): 6563-71.
29. Rashid HM, Mahmod AI, Afifi FU, Talib WH. Antioxidant and antiproliferation activities of Lemon verbena (*Aloysia citrodora*): An in vitro and in vivo study. Plants (Basel) 2022; 11(6): 785.
30. Vanajothi R, Sudha A, Manikandan R, Rameshthangam P, Srinivasan P. *Luffa acutangula* and *Lippia nodiflora* leaf extract

induces growth inhibitory effect through induction of apoptosis on human lung cancer cell line. Biomed Prev Nutr 2012; 2(4): 287-93.
31. Sharma C, Tyagi AK, Singh RP, Chan DCF, Agarwal R. Synergistic anti-cancer effects of grape seed extract and conventional cytotoxic agent doxorubicin against human breast carcinoma cells. Breast Cancer Res Treat 2004; 85(1): 1-12.
32. Lee ST, Wonga PF, Hooperb JD, Mustafa MR. Alpha-tomatine synergises with paclitaxel to enhance apoptosis of androgen-independent human prostate cancer PC-3 cells in vitro and in vivo. Phytomedicine 2013; 20(14): 1297-305.
33. Cheon C, Ko SG. Synergistic effects of natural products in combination with anticancer agents in prostate cancer: A scoping review. Front Pharmacol 2022; 13: 963317.
34. Pezzani R, Salehi B, Vitalini S, Iriti M, Zuñiga FA, Sharifi-Rad J, et al. Synergistic effects of plant derivatives and conventional chemotherapeutic agents: An update on the cancer perspective. Medicina (Kaunas) 2019; 55(4): 110.
35. Hemaiswarya S, Prabhakar PK, Doble M. Herb-drug combinations: A new complementary therapeutic strategy. Gateway East, Singapore: Springer Singapore; 2022. p. 145-73.
36. Wang X, Xuetao X, Wu M, Wu P, Sheng Z, Liu W, et al. Inhibitory effect of roburic acid in combination with docetaxel on human prostate cancer cells. J Enzyme Inhib Med 2022; 37(1): 542-53.
37. Feng J, Xi Z, Jiang X, Li Y, Nik Nabil WN, Liu M, et al. Saikosaponin A enhances Docetaxel efficacy by selectively inducing death of dormant prostate cancer cells through excessive autophagy. Cancer Lett 2023; 554: 216011.
38. Tolba MF, Esmat A, Al-Abd AM, Azab SS, Khalifa AE, Mosli HA, et al. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances docetaxel and paclitaxel cytotoxicity in prostate cancer cells. IUBMB Life 2013; 65(8): 716-29.
39. Ge J, Wang P, Ma H, Zhang J. Solamargine inhibits prostate cancer cell growth and enhances the therapeutic efficacy of docetaxel via akt signaling. J Oncol 2022; 10: 9055954.
40. Hashemi M, Taheriazam A, Daneii P, Hassanpour A, Kakavand A, Rezaei S, et al. Targeting PI3K/Akt signaling in prostate cancer therapy. J Cell Commun Signal 2023; 17(3): 423-43.
41. Lu X, Yang F, Chen D, Zhao O, Chen D, Ping H, et al. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/Akt signaling pathways. Int J Biol Sci 2020; 16(7): 1121-34.
42. Ali AY, Farrand L, Kim Y, Byun S, Suh JY, Lee HJ, et al. Molecular determinants of ovarian cancer chemoresistance: new insights into an old conundrum. Ann NY Acad Sci 2012; 1271(1): 58-67.
43. Dyshlovoy SA, Shubina LK, Makarieva TN, Hauschild J, Strewinsky N, Guzii AG, et al. New diterpenes from the marine sponge Spongionella sp. Overcome drug resistance in prostate cancer by inhibition of P-glycoprotein. Sci Rep 2022; 12(1): 13570.