مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۵، شماره ۷، مهر ۱۳۹۷ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی مقایسه اثر آپوپتوزی دو گونه آرتمیزیای بومی ایرانی (Artemisia scoparia nd sieberi) با تاکسول بر رده سلولی SK-BR-3 سرطان سینه

مریم زارع منگابادی: گروه زیست شناسی، سلولی-تکوین، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج، ایران

***مونا فرهادی:** استادیار، گروه زیست شناسی، سلولی-تکوین، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج ،کرج، ایران. (*نویسنده مسئول) monafarhadi@yahoo.com

پروین تراب زاده خراسانی: استادیار، گروه زیست شناسی، سلولی-تکوین، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج،کرج، ایران

محمدحسین هدایتی: گروه کنترل کیفیت، موسسه پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در میان زنان است. برخی از انواع سرطان‌های سینه به داروهای شیمی درمانی مانند تاکسول مقاومت نشان می‌دهند. گیاه آرتمیزیا از خانواده کامپوزیته با داشتن ترکیبات فلاونوئیدی مانند آرتیمیزین به عنوان یکی از مهم‌ترین گیاهان دارویی دنیا با کاربرد دارویی محسوب می‌شود. لذا، در مطالعه حاضر به بررسی و مقایسه اثر سیتوتوکسیکی و آپوپتوزی عصاره اتانولی دو گونه آرتمیزیا سیبری و آرتمیزیا اسکوپاریا با داروی تاکسول پرداخته شد.

روش کار: ابتدا عصاره‌های اتانولی تهیه شدند و بعد از سه پاساژ سلولی، رده سلول‌های SK-BR-3 با غلظت‌های آرتمیزیا سیبری ۷/۵-۱۵-۳۰ و ۶۰ میلی گرم/میلی لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا ۰/۱۶-۰/۳۱-۰/۶۳ و ۱/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر و داروی پاکلیتاکسول با غلظت ۱۰۰ میکرومولار تیمار شدند و در زمان‌های ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت به وسیله سنجش MTT ارزیابی گردیدند. اثر آپوپتوزی و نوع مرگ القا شده با استفاده از کیت AnnexinV&PI سنجش شد.

یافته‌ها: سنجش MTT، اثر سیتوتوکسیک دو عصاره آرتمیزیا با داروی تاکسول را وابسته به دوز نشان داد و IC50 های به دست آمده پس از تیمار در زمان‌های ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت، به ترتیب در آرتمیزیا اسکوپاریا ۰/۳۱-۰/۳۵ و ۰/۵۵ میلی گرم/میلی لیتر و آرتمیزیا سیبری ۱۸-۲۸/۰۲ و ۳۴/۱۴ میلی گرم/میلی لیتر و پاکلیتاکسل ۲۱/۰۹-۳۶/۲۸ و ۵۶/۷۴ میکرومولار بود. سنجش Annexin V &PI نشان داد که هر دو عصاره آرتمیزیا سیبری با ۳.۵۳ درصد و آرتمیزیا اسکوپاریا با ۴.۷۱ درصد همانند تاکسول ۵.۱۳ درصد، دارای اثر آپوپتوزی و القای آپوپتوز اولیه و ثانویه معنی‌دار ($p<0/05$) در مقایسه با گروه کنترل بودند و عصاره آرتمیزیا سیبری دارای اختلاف معنی‌دار ($p<0/05$) با گروه تاکسول و عصاره آرتمیزیا اسکوپاریا بود.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی آرتمیزیا اسکوپاریا با بررسی های بیشتر دارای پتانسیل درمانی به عنوان داروی سرطان سینه می‌باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: گزارش نشده است.

کلیدواژه‌ها

آرتمیزیا سیبری،

آرتمیزیا اسکوپاریا،

پاکلیتاکسل، آپوپتوز،

رده سلول سرطانی SK-BR-3

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۲۵

شیوه استناد به این مقاله:

Zare Mongabadi M, Farhadi M, Torabzadeh Khorasani P, Hedayati MH. Comparison of the apoptotic effects of Iranian Artemisia (*Artemisia scoparia* and *sieberi*) with Taxol on SK _BR3 breast cancer cell line. Razi J Med Sci.2018;25(7):70-80.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 1.0 صورت گرفته است.

Razi Journal of Medical Sciences.2018;25(7):70-80. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Comparison of the apoptotic effects of Iranian Artemisia (*Artemisia scoparia* and *sieberi*) with Taxol on SK _BR3 breast cancer cell line

Maryam Zare Mongabadi, Department of Developmental Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
***Mona Farhadi**, Assistant Professor, Department of Developmental Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran (*Correspionding author) monafarhadi@yahoo.com
Parvin Torabzadeh Khorasani, Assistant Professor, Department of Developmental Biology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
Mohammad Hossein Hedayati, Department of Quality Control, Institute Pasteur of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: Breast cancer is one of the most common cancers among women. Chemotherapy drugs such as taxol often lead to toxicity. Artemisia from Asteraceae family, contain flavonoids such as Artemisin which is one of the most important medicinal plants in the world. Therefore, in the present study the cytotoxic and apoptotic effects of two ethanol extract (*Artemisia scoparia, Artemisia siberia*) of Artemisia species is studied and compared with Taxol on SK-BR-3 breast cancer cell line.

Methods: In this study, the ethanol extract was prepared. Concentrations of the mentioned ethanol extracts prepared: *Artemisia siberia*: 60, 30, 15, 7.5 mg/ml and *Artemisia scoparia*: 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 mg/ml. The concentration of Paclitaxel (100 µM) was determined in 24, 48 and 72 hours by MTT assay. The apoptotic effects and induced death were measured using Annexin V and PI.

Results: The MTT results indicated that cytotoxic effects of two Artemisia extracts and Taxol drug are dose-dependent. The obtained IC50 after treatment at 24, 48, 72 hours were (0.55, 0.35, 0.31 mg/ml) and 34.14, 28.02, 18), respectively for *Artemisia scoparia* and *Artemisia siberia*. Also, paclitaxel was 56.74, 36.28, and 21.09 (µM). Annexin and PI measurement showed that both extracts, *Artemisia Siberia* 3.53% and *Artemisia scoparia* 4.71%, compared to Taxol 5.13% had apoptosis effect and influence on induction of primary and secondary apoptosis, significantly ($p<0.05$).

Conclusion: Alcoholic extract of *Artemisia scoparia* with further investigation has the potential for use as a drug for breast cancer treatment.

Conflicts of interest: None
Funding: None.

Keywords
Artemisia siberi,
Artemisia scoparia,
Paclitaxel,
Apoptosis,
SK-BR-3 cell line

Received: 05/23/2018
Accepted: 09/16/2018

Cite this article as:
Zare Mongabadi M, Farhadi M, Torabzadeh Khorasani P, Hedayati MH. Comparison of the apoptotic effects of Iranian Artemisia (Artemisia scoparia and sieberi) with Taxol on SK _BR3 breast cancer cell line. Razi J Med Sci.2018;25(7):70-80.

*This work is published under CC BY-NC-SA 1.0 licence.

مقدمه

سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع در بین زنان، به خصوص کشورهای غربی می‌باشد (۱). در میان زنان ایران این بیماری با میانگین سنی ۱/۸-۴۷/۴۸ سال است و نسبت به کشورهای توسعه یافته یک دهه جوان‌تر شده است (۲). در حال حاضر روش‌های درمان سرطان سینه جراحی، پرتودرمانی، هورمون درمانی و شیمی‌درمانی و تراریخت‌های مغز استخوان (Autologous) می‌باشد (۳). همچنین یکی از مؤثرترین روش‌های درمان سرطان، شیمی‌درمانی با داروهایی مانند آلکالوئیدهای وینکا، وین کریستین، وین بلاستین، اتوپوزید و تنی پوزید و تاکسول می‌باشد (۴). داروی تاکسول دارای منشأ گیاهی است و از درخت سرخدار (*brevifolia Taxus*) بدست آمده است و در سال ۱۹۹۴ سازمان غذا و داروی آمریکا (FAD)، به عنوان داروی سرطان سینه مورد تأیید قرار گرفت و موجب سمیت سلولی است و مانع پلیمریزه شدن توبولین می‌گردد و با ایجاد دوک میتوزی غیرطبیعی مانع چرخه‌ی G2/M و تقسیم میتوز و پیشروی سلول سرطانی می‌شود (۵، ۶).

هرچند در ۱۰ سال گذشته پاکلیتاکسل به عنوان داروی اصلی در درمان سرطان مورد استفاده بوده است، اما میزان پاسخ به این دارو در بیماران متاستاسیک پیشرفته کم می‌باشد. یکی از عواملی که آن را ناموفق در درمان کامل نموده است نوع فعالیت کاسپازها در آپوپتوز سلولی، بر اثر مصرف طولانی مدت و مقاومت دارویی ذکر شده است (۷). این دارو دارای عوارض نوروپاتی محیطی (۷) و همچنین عامل آسیب رساندن به دیگر بافت‌ها از جمله مهار سلول‌های مغز استخوان در تولید گلبول قرمز خون و همچنین مسمومیت عصبی و موجب ریزش مو و عفونت می‌باشد (۸، ۹). با توجه به پیچیدگی مکانیسم و وجود عوامل متعدد در ایجاد سرطان و تنوع پروسه‌های پاتولوژیک و مکانیسم‌های مقاومت به درمان، انتخاب مناسب‌ترین و کارآمدترین نوع درمان برای هر یک از بیماران امری مشکل است، بنابراین انتخاب رژیم‌های شیمی‌درمانی مؤثرتر و نیز جلوگیری از سمیت بالقوه داروهای غیر مؤثر ضرورت پیدا می‌کند (۱۰). در حال حاضر محققین به دنبال ترکیباتی هستند که دارای عوارض جانبی کمتر و اثر القاء سمیت سلولی بیشتر در سلول‌های سرطانی باشند تا جایی که یکی از بهترین نوع درمان سرطان را مداخلات دارویی دانسته‌اند که بتواند سبب القای مرگ برنامه‌ریزی‌شده (آپوپتوز) در سلول‌های سرطانی شود (۱۱-۱۵)؛ بنابراین تحقیق بیشتر برای کشف و توسعه عوامل ضد سرطان با سمیت کمتر و اثر آپوپتوزی بیشتر و درمان مؤثرتر با استفاده از گیاهان و محصولات طبیعی آن‌ها مورد نیاز است یکی از پرکاربردترین گیاهان به عنوان گیاهان دارویی جنس آرتمیزیا از خانواده کاسنی‌ها می‌باشد که به دلیل ترکیبات شیمیایی و فتوشیمیایی در سراسر جهان مورد توجه بوده و به دلیل اجزا و ترکیبات منحصر به فرد از جمله آرتمیزین، ترکیبات آروماتیک و یا مشتقات فنل در داروسازی، طب سنتی و مواد آرایشی و صنعتی مورد استفاده می‌باشد (۱۱). در تحقیقات نشان داده شده است که عصاره برخی از گونه‌های آرتمیزیا دارای فعالیت سیتوتوکسیکی در شرایط آزمایشگاهی در برخی از رده‌های سلول سرطانی و مدل حیوانی سرطانی می‌باشد و نیز سمیت کم و حتی بی‌تأثیر در سلول‌های طبیعی را دارا می‌باشد و وجود ترکیباتی چون آرتمیزین در برخی از گونه‌های این گیاه عامل ضد رگزایی و فعالیت ضد سرطانی و دارای اثر آپوپتوزی است (۱۶-۱۸).

از آنجایی که تاکسول دارویی گران و دارای عوارض جانبی بسیاری می‌باشد (۸)، در تحقیق حاضر سعی بر آن شد که با استفاده از عصاره‌های الکلی آرتمیزیا سیبری و اسکوپاریا مقایسه‌ای بر مقدار سمیت در سلول و مهار رشد سلولی و نوع مرگ ناشی از آن‌ها با داروی تاکسول در رده سلولی SK-BR-3 که دارای بیان زیاد HER2 است صورت گیرد (۱۹).

روش کار

تهیه عصاره گیاهی: پودر دو گیاه مورد نظر از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و زیستی ایران با نامهای آرتمیزیا سیبری با کد ۱۷۶ (IBRC P 1000274) و آرتمیزیا اسکوپاریا با کد ۳۱۹ (IBRC P 1000525) خریداری شد. عصاره این دو گونه گیاه توسط روش ماسیراسیون به مدت ۴۸ ساعت در اتانول ۸۰ درصد و سپس تغلیظ محلول الکلی به دست آمده، تقطیر در خلأ به کمک دستگاه روتاری در دمای ۳۵ سانتی‌گراد انجام شد. عصاره تام الکلی پس از خشک کردن وزن شد و در دی متیل سولفوکساید ۱۰ درصد حل گردید و توسط فیلتر سرسرنگی ۰,۲ میکرون فیلتر شد و تا زمان مصرف در ظرف مناسب دور از نور و جریان هوا در یخچال ۴ سانتی‌گراد نگهداری گردید.

تهیه و کشت رده سلولی: رده سلولی SK-BR-3 از انستیتو پاستور تهران خریداری گردید و در فلاسک‌های حاوی محیط کشت RPMI- 1640 حاوی سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum-FBS) ۱۰٪ و پنی‌سیلین و استرپتومایسین (Pen/Strep میکروگرم بر میلی‌لیتر) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ و CO_2 ۵٪ کشت و رشد داده شدند. سلول‌ها پس از سه پاساژ برای انجام آزمون‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند.

تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و داروی تاکسول: در این مطالعه ابتدا گروه‌های مورد آزمایش مشخص گردید. گروه کنترل: سلول‌های بدون تیمار، گروه شم: سلول‌هایی که در حلال (DMSO) دو عصاره تام الکلی و داروی تاکسول کشت شدند و گروه تجربی: شامل سلول‌های تیمار شده با عصاره تام آرتمیزیا اسکوپاریا ۳۱/۱۶-۶۳/۰-۰/۰ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره تام آرتمیزیا سیبری ۳۰/۵-۱۵-۷ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و داروی پاکلیتاکسل میکرومولار ۱۰۰ (Sigma-T4702) بود که هر کدام در زمان‌های ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت ارزیابی شدند.

تعین سمیت سلولی با استفاده از سنجش MTT: جهت بررسی سمیت سلولی و IC_{50} ها، مقدار ۶×۱۰^{۴} سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استریل درب دار ریخته شد و هر کدام از پلیت ها جداگانه برای زمان‌های ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت و چسبیدن کامل سلول‌ها به کف پلیت ها، سلول‌ها توسط غلظت‌های آرتمیزیا سیبری ۳۰/۷-۱۵/۵ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا ۰/۱۶-۶۳/۳۱ و ۰/۰ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و داروی تاکسول ۱۰۰ میکرو مولار تیمار شدند و برای هر گروه سه تکرار در نظر گرفته شد و پس از اضافه شدن رنگ MTT جذب نوری (OD) آن توسط دستگاه الایزا ریدر (Austria GmbH TECAN Sunrise) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و توسط نرم افزار Graphpad prism (۶/۰) مقدار IC_{50} هر کدام جداگانه با استفاده از فرمول $y= ax + b$ محاسبه گردید. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۱۹ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) ارزیابی گردید. برای تمامی گروه‌ها داده‌ها به صورت mean±S.E.M گزارش شد و سطح معنی‌داری $p<۰/۰۵$ در نظر گرفته شد.

سنجش آپوپتوز با استفاده از کیت PI Anexin V &: بررسی و مقایسه نوع مرگ القاء شده (آپوپتوز-نکروز) رده سلولی مذکور با استفاده از کیت Annexin-PI (Detection Kit/FITC Phosphatidyl Serine) کمپانی IQ به شماره کاتالوگ (IQP-116F) توسط دستگاه فلوسیتومتری (Partec CYFLOW,Germany) ارزیابی گردید. در هر چاهک پلیت به مقدار $۱۰^{۶}$ سلول کشت شد و در انکوباتور در شرایط ایده ال قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت تیمار با آرتمیزیا سیبری با غلظت ۳۴/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پاکلیتاکسل با غلظت ۰/۰۴۸۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد، پس از اضافه شدن AneexinV & PI رنگ‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد.

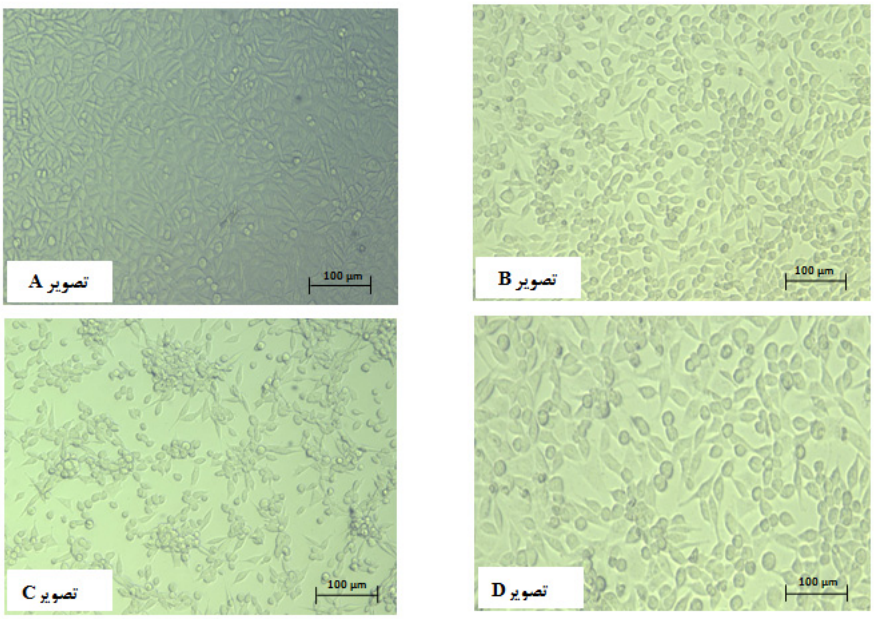
یافته‌ها

نتایج بررسی مورفولوژی: شکل ۱ نتایج مورفولوژی ردهٔ سلولی SK-BR-3 را نشان می‌دهد. عصاره تام آرتمیزیا سیبری و اسکوپاریا همانند پاکلیتاکسل، تغییراتی مانند از دست دادن وابستگی به سطح خود به صورت گرد در آمدن را نشان دادند. با افزایش غلظت عصاره‌ها از رشد سلولی کاسته شد و حالت گرانولیتی سلول‌ها افزایش یافت (شکل ۱).

نتایج سنجش مرگ سلولی: مرگ سلولی و توان

حیاتی در رده سلولی مذکور با غلظت‌های مختلف از دو عصاره گیاهی در مقایسه با داروی پاکلیتاکسل در زمان‌های ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که در این رده سلولی IC_{50} به دست آمده پس از ۲۴ ساعت، به ترتیب برای داروی پاکلیتاکسل ۳۶/۲۸-۲۱/۰۹ و ۵۶/۷۴ میکرو مولار، آرتمیزیا سیبری ۲۸/۰۲-۱۸ و ۳۴/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا ۰/۳۵-۰/۳۱ و ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. از آنجا که عصاره‌ها در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی‌داری در میزان مرگ سلول نشان ندادند بنابراین زمان ۲۴ ساعت زمان مناسب برای سنجش بعدی در نظر گرفته شد. غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آرتیمیزیا سیبری و غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آرتمیزیا اسکوپاریا در مقایسه با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار (۰/۰۸۵۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) پاکلیتاکسل باعث مهار معنی‌دار تکثیر و رشد در این رده سلولی گردیدند ($p< ۰/۰۰۱$)، ($p=۰/۰۰۱$) (جدول ۱).

همچنین نتایج نشان داد که هر دو عصاره موجب مهار رشد و تکثیر در این رده سلولی بودند و با افزایش



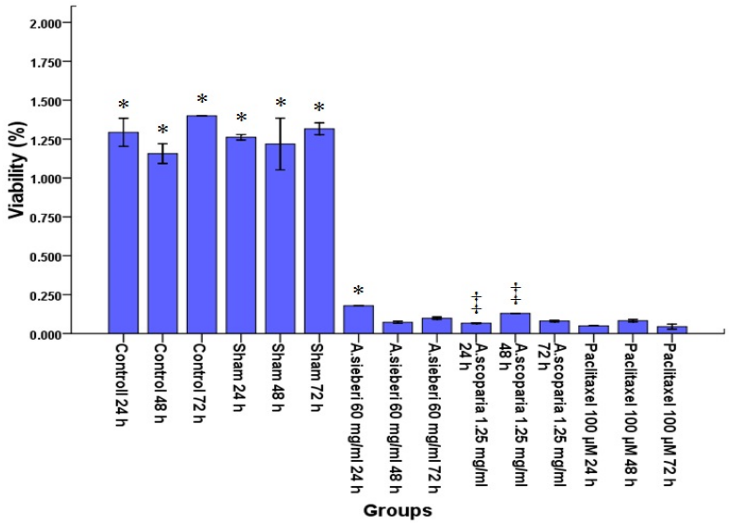
شکل ۱- سلول‌های SK-BR-3 کنترل و تحت تیمار در مدت زمان ۲۴ ساعت با میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی 10X

تصویر A: سلول زنده SK-BR-3 پس از ۲۴ ساعت کشت سلولی (کنترل). تصویر B: سلول SK-BR-3 تحت تیمار آرتمیزیا سیبری با غلظت 30 میلی گرم بر میلی لیتر. تصویرC: سلول SK-BR-3 تحت تیمار آرتمیزیا اسکوپاریا با غلظت 0.16 میلی گرم بر میلی لیتر. تصویر D: سلول SK-BR-3 تحت تیمار داروی پاکلیتاکسل با غلظت 0.021 میلی گرم بر میلی لیتر

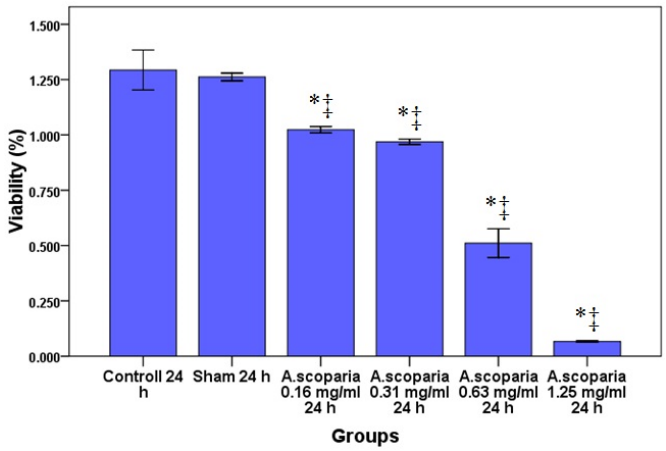
جدول ۱- میانگین سلول‌های زنده در غلظت‌ها و گروه‌های مختلف نسبت به پاکلیتاکسل

گروه‌ها متغیر	توان حیاتی (درصد) در ۲۴ ساعت	توان حیاتی (درصد) در ۴۸ ساعت	توان حیاتی (درصد) در ۷۲ ساعت
کنترل	*۱/۰±۲۹۳/۰۹۰	*۱/۰±۱۵۶/۰۶۳	*۱/۰±۴۰۰/۰۰۰
شم	*۱/۰±۲۶۲/۰۱۷	*۱/۰±۲۱۸/۱۶۶	*۱/۰±۳۱۶/۰۳۸
A.sieberi 7.5 میلی گرم بر میلی لیتر	*۱/۰±۱۶۶/۰۰۱	*۰/۰±۹۹۰/۰۰۶	*۱/۰±۰۸۲/۰۰۹
A.sieberi 15 میلیگرم بر میلی لیتر	*۱/۰±۱۰۹/۰۰۵	*۰/۰±۸۴۸/۰۱۴	*۰/۰±۹۷۲/۰۱۰
A.sieberi 30 میلی گرم بر میلی لیتر	*۰/۰±۹۳۳/۰۲۵	*۰/۰±۵۶۹/۰۵۲	*۰/۰±۱۳۶/۰۷۳
A.sieberi 60 میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۰±۱۷۹/۰۰۲	۰/۰±۰۷۲/۰۰۷	۰/۰±۰۹۸/۰۰۷
A.scoparia 0.16 میلی گرم بر میلی لیتر	*۱/۰±۰۲۳/۰۱۴	*۱/۰±۰۹۵/۰۰۳	*۱/۰±۱۹۴/۰۱۶
A.scoparia 0.31 میلی گرم بر میلی لیتر	*۰/۰±۹۶۹/۰۱۲	*۱/۰±۰۴۳/۰۰۱	*۱/۰±۱۰۱/۰۰۷
A.scoparia 0.63 میلی گرم بر میلی لیتر	*۰/۰±۵۱۱/۰۶۵	*۰/۰±۷۹۶/۰۱۳	*۰/۰±۶۹۵/۰۱۹
A.scoparia 1.25 میلی گرم بر میلی لیتر	۰/۰±۰۶۶/۰۰۳	۰/۰±۱۲۹/۰۰۱	۰/۰±۰۸۰/۰۰۶
Paclitaxel 100 میکرو مولار	۰/۰±۰۴۹/۰۰۰	۰/۰±۰۸۲/۰۰۸	۰/۰±۰۴۴/۰۱۶

*اختلاف معنا دار غلظت‌های مختلف *A.sieberi* و *A.scoparia* با گروه پاکلیتاکسل (Paclitaxel 100 µM)



نمودار ۱- درصد سلول های زنده در تست MTT در زمان ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت.* اختلاف معنادار با گروه Paclitaxel در زمان مشابه؛ ‡ اختلاف معنادار با گروه *A.sieberi* در زمان مشابه.

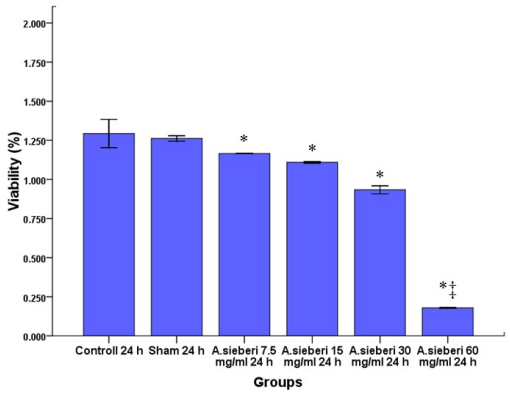


نمودار ۲- نمودار مقایسه غلظت های اسکوپاریا باهم

درصد سلول‌های زنده با تیمارغلظت های متفاوت آرتمیزیا اسکوپاریا در تست MTT پس از ۲۴ ساعت. * اختلاف معنادار با گروه Sham با دوز مشابه؛ ‡ اختلاف معنادار با گروه کنترل در زمان مشابه.

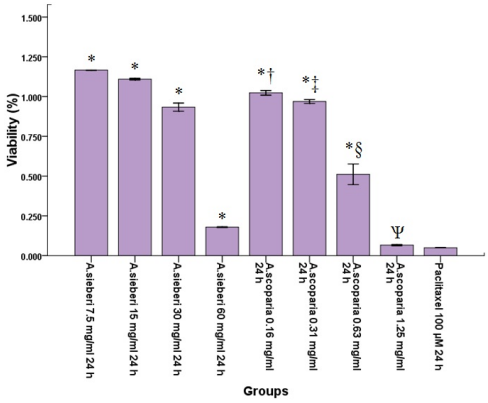
غلظت عصاره‌ها سمیت و مهار رشد افزایش معنی‌دار نشان داد (p< ۰/۰۰۱)، (p=۰/۰۰۱) (نمودار ۲ و ۳). همچنین عصاره ارنمیزیا اسکوپاریا با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۹۰ تا ۹۵٪ سمیت داشت و عصاره آرتمیزیا سیبری با غلظت ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۸۵٪ سمیت ایجاد کرد (نمودار ۴-۱)؛ و اختلاف بین دو عصاره نیز پس از ۲۴ ساعت اختلاف معنی‌دار (p< ۰/۰۰۱) بود (نمودار ۴) و غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره آرتمیزیا اسکوپاریا مشابه غلظت ۱۰۰ میکرو مولار پاکلیناکسل توانست موجب سمیت و مرگ سلول‌های سرطانی به طور معنی‌دار (p=۰/۰۰۱) گردد (نمودار ۴). نتایج نشان داد که مرگ سلولی وابسته به غلظت بود و عدم وابستگی به زمان داشتند. به‌طوریکه فقط پس از ۲۴ ساعت با افزایش غلظت توان حیاتی به طور معنی‌داری (p< ۰/۰۰۱) کاهش یافت (نمودار ۱ و جدول ۱).

نتایج سنجش Aneexin V & PI: این نتایج نشان داد که عصاره‌ها و پاکلیتاکسل عامل القای اپوپتوز سلولی بوده‌اند (شکل ۲) و درصد آپوپتوز با Paclitaxel ۵٪/۱۳ و بدون نکروز بود و عصاره الکلی *A.scoparia* با آپوپتوز ۴٪/۷۱ و نکروز کمتر از ۰/۰۱٪ مشاهده گردید، همچنین عصاره الکلی *A.sieberi* عامل القای آپوپتوزیس ۳/۵۳٪ و نکروز کمتر از ۰/۱۵٪ در رده سلولی SK-BR-3 بودند (نمودار ۵) (شکل ۳).



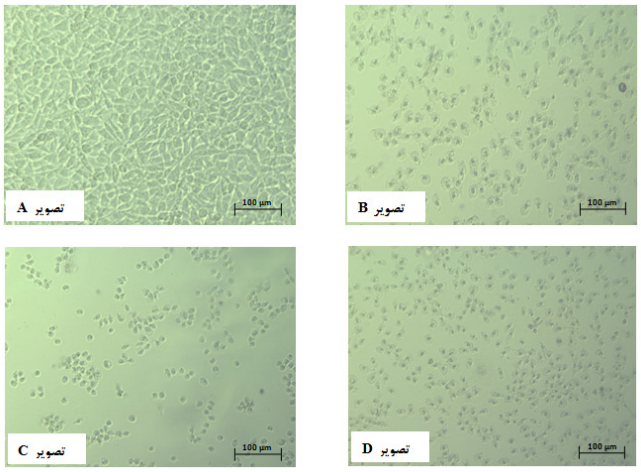
نمودار ۳- نمودار مقایسه غظت های سیبری باهمدیگر

درصد حیات سلول‌ها درتیمارغلظت های متفاوت آرتمیزیا سیبری درتست MTT مدت زمان ۲۴ ساعت.* اختلاف معنادار با گروه Sham با دوز مشابه؛ ‡ اختلاف معنادار با گروه کنترل در زمان مشابه



نمودار ۴- نمودار مقایسه گروه های مختلف در تست MTT

درصد سلول های زنده در گروه‌های *Paclitaxel*، *A.sieberi* و *A.scoparia* با غلظت مختلف در زمان ۲۴ ساعت. * اختلاف معنادار با گروه Paclitaxel در زمان مشابه؛ † اختلاف معنادار با گروه *A.sieberi* غلظت 7.5 در زمان مشابه؛ ‡ اختلاف معنادار با گروه *A.*sieberi غلظت 15 در زمان مشابه؛ § اختلاف معنادار با گروه *A.sieberi* غلظت 30 در زمان مشابه؛ Ψ اختلاف معنادار با گروه *A.sieberi* غلظت 60 در زمان مشابه.

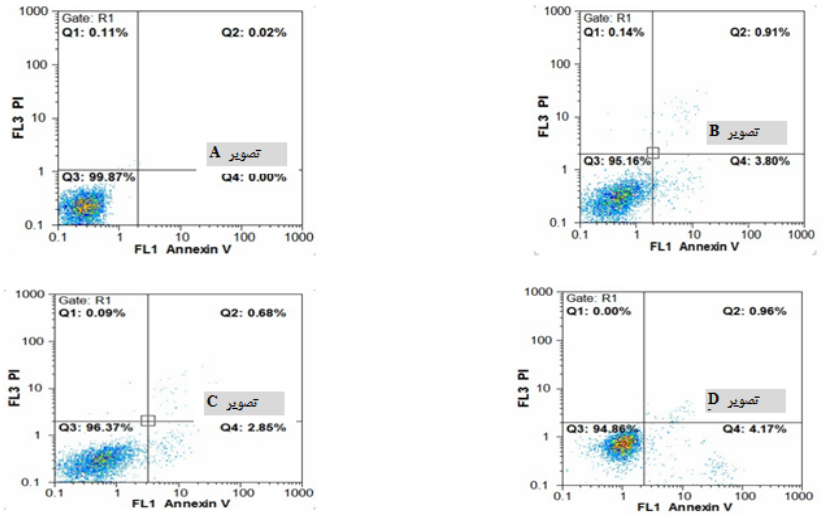


شکل ۲- سلول‌های SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت‌های به دست آمده از تست MTT در گروه تجربی و کنترل.

تصویر A: شکل سلول های SK-BR-3 گروه کنترل (بدون تیمار) پس از ۲۴ ساعت. تصویر B: شکل سلول های SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت 0.55 میلی گرم بر میلی لیتر آرتمیزیا اسکوپاریا پس از ۲۴ ساعت. تصویر C: شکل سلول های SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت 34.14 میلی گرم بر میلی لیتر آرتمیزیا سیبری پس از ۲۴ ساعت. تصویر D: شکل سلول های SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت 0.0484 میلی گرم بر میلی لیتر پاکلیتاکسل پس از ۲۴ ساعت

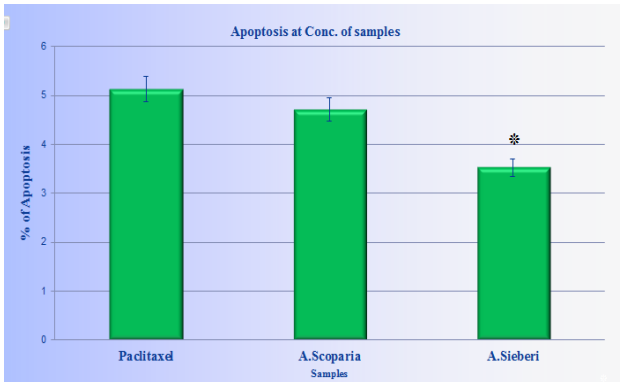
بحث و نتیجه‌گیری

سرطان سینه یکی از سرطان‌های شایع در بین زنان، به خصوص کشورهای غربی می‌باشد (۱). در میان زنان ایران این بیماری با میانگین سنی ۱/۸-۴۷/۴۸ سال است و نسبت به کشورهای توسعه یافته یک دهه جوان‌تر شده است (۲). درمان‌های کنونی در بسیاری



شکل ۳- نتایج آزمون Aneexin V و رنگ PI:

تصویرA: گروه کنترل پس از ۲۴ ساعت بدون تیمار در آزمایش Aneexin V – رنگ PI و شمارش سلول های سرطانی در هر فازتوسط دستگاه فلوسایتومتری. تصویرB: گروه تیمار آرتمیزیا اسکوپاریا با غلظت 0. 55 پس از ۲۴ ساعت در آزمایش Aneexin V – رنگ PI و شمارش سلول های سرطانی در هر فازتوسط دستگاه فلوسایتومتری. تصویرC: گروه تیمار آرتمیزیا سیبری با غلظت 34.14 میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت در آزمایش Aneexin V – رنگ PI و شمارش سلول های سرطانی در هر فازتوسط دستگاه فلوسایتومتری . تصویرD: گروه تیمار پاکلیتاکسل با غلظت 0.0484 میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت در آزمایش Aneexin V – رنگ PI و شمارش سلول های سرطانی در هر فازتوسط دستگاه فلوسایتومتری.



نمودار ۵- نمودار آزمون Aneexin V &PI

نتایج درصد مرگ سلولی (آپوپتوز–نکروز) پس از ۲۴ ساعت تیمار توسط آرتمیزیا سیبری و آرتمیزیا اسکوپاریا و داروی پاکلیتاکسل بر روی رده سلولی SK-BR- 3 * اختلاف معنادار با گروه Paclitaxel– *A.scoparia*

موارد موفق نبوده‌اند و استفاده از عصاره‌های گیاهی بومی ایران می‌تواند جایگزین مناسبی برای درمان سرطان سینه باشد.

مطالعات انجام شده نشان داده است که ترکیبات و عصاره‌های گونه و زیرگونه‌های آرتمیزیا دارای اثرات ضد سرطانی در مدل حیوانی هستند (۱۷، ۲۰). محققان در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی شش گونه آرتمیزیای ترکیه‌ای (*vulgaris- santonicum- absinthium -campestris-scoparia–arborescens*) به بررسی اثر سمیت روی چند رده سلولی شامل رده طبیعی از نوع جنینی T293-A7R5 و رده سلول سرطانی ریه A549، سرطان سینه MCF7 و سرطان رحم HeLa پرداختند و به این نتیجه رسیدند که همه‌ی آن‌ها به غیر از *A.compestris* با دوزهای متفاوت دارای اثر کشندگی بر رده‌های سلولی هستند و دو گونه از آن‌ها شامل: *A scoparia* (اسکوپاریا) بیشترین کشندگی را به ترتیب، روی رده‌های سلولی سرطان سینه (MCF-7) با IC_{50} ۳۴ میکروگرم/میلی‌لیتر و سرطان رحم (HaLa) با IC_{50} ۹۰ میکروگرم/میلی‌لیتر داشته است همچنین *absinthium*

A. (افسنطین) بیشترین تأثیر را با IC_{50} 270 میکروگرم/میلی‌لیتر بر رده سلولی سرطان سینه نشان داد؛ بنابراین در این تحقیق کمترین اثر در رده سلول‌های طبیعی جنینی دیده شد و بهترین گزینه استفاده در درمان سرطان سینه و رحم گیاه آرتمیزیا اسکوپاریا و در درمان سرطان سینه گیاه آرتمیزیا افسنطین گزارش شد (۲۱).

در این مقایسه نشان داده شد که آرتمیزیا اسکوپاریا با غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نسبت به آرتمیزیا سیبری با غلظت ۶۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر سمیت بیشتری دارد. از آنجا که نشان داده شده اسکوپاریا ترکیب اسکوالن و بتا آمیزین و آرتمیزینین بیشتری نسبت به سیبری دارد به نظر می‌رسد اختلاف سمیت به دلیل وجود این ترکیبات باشد (۲۲، ۲۳). همچنین می‌تواند این اختلاف مقدار IC_{50} آرتمیزیا اسکوپاریای ترکیه‌ای با ایرانی در نوع عصاره گیری و نیز استفاده از رده‌های سلولی متفاوت سرطان سینه و همچنین اختلاف جغرافیایی و آب و هوایی در خواستگاه و رویش این گیاه باشد.

طی تحقیقاتی که در سال ۲۰۱۶ توسط گردانیان و همکارانش انجام گردید، نشان داده شد که تمام قسمت‌های گیاه سیبری که در دو منطقه جغرافیایی اصفهان و خراسان رویش یافته دارای اثر القای مرگ سلولی در رده سلولی MCF7 است و بیشترین سمیت در برگ و گل منطقه خراسان به ترتیب با IC_{50} ۲۰۵ و ۲۱۳ میکروگرم/میلی‌لیتر در مدت زمان ۴۸ ساعت بود، ساقه بی‌تأثیر و ریشه آن حتی باعث رشد سلول‌های سرطانی شد (۲۳). در تحقیق حاضر در تیمار ۴۸ ساعت آرتمیزیا سیبری با IC_{50} ۲۸/۰۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا با IC_{50} 0.35 میلی‌گرم/میلی‌لیتر عامل مهار رشد ۵۰ درصدی شدند و نشان داده شد که هر چه غلظت عصاره‌ها افزایش یافته، درصد و توان حیاتی کاهش می‌یابد به‌طوری‌که عصاره آرتمیزیا سیبری در غلظت ۶۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بیش از ۸۵ درصد عامل مرگ سلولی و مهار رشد و تکثیر سلولی شدند. به نظر می‌رسد درصد سمیت یک‌گونه از گیاه بر رده‌های سلولی با توجه به رویش گیاه در مناطق مختلف و موقعیت جغرافیایی گیاه به دلیل تفاوت در متابولیت‌های ثانویه گیاه و در نتیجه داشتن ترکیبات متفاوت می‌تواند سمیت سلولی متفاوتی ایجاد کند (۲۳، ۲۴).

در تحقیقات سال ۲۰۰۷ و ۲۰۰۹، امامی و همکارانش و سوک چانگ و همکارانش نشان دادند که تیمار با عصاره و غلظت‌های مختلف الکلی و آبی به دست آمده از گونه‌های مختلف چینی و ایرانی، گیاهان مذکور میزان رشد انواع رده‌های سلولی سرطان کبد، کولون، مری و معده را تا ۷۰ الی ۱۰۰ درصد کاهش داده است و عصاره اتانولی بهترین گزینه در میان تمام ترکیبات مختلف به دست آمده از این گیاهان در سیتوتوکسیکی و القای آپوپتوز می‌باشد (۱۶، ۱۷). در یافته‌های تحقیق حاضر نیز نشان داده شد که عصاره‌های اتانولی به دست آمده از آرتمیزیا اسکوپاریا در محدوده غلظت‌های ۱/۲۵ الی ۰/۱۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و آرتمیزیا سیبری در محدوده غلظت‌های ۶۰ الی ۷/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، به ترتیب با افزایش غلظت عصاره اتانولی، افزایش سیمت سلولی را نشان دادند و هر دو عصاره عامل القای آپوپتوز نیز هستند. با توجه به تفاوت غلظت عصاره اتانولی اسکوپاریا نسبت به عصاره اتانولی سیبری به نظر می‌رسد که آرتمیزیا اسکوپاریا در مرگ سلولی مؤثرتر است.

همچنین نشان داده شده است که این گیاهان دارای مواد مؤثره از قبیل لیمونن، اوژنول، آلفا و بتا پینن، توژون، بورنئول، پیپریتون و گاما تیریپنین و آلفا و بتا تیجونی و کاپیلن و کاپیلین، ۱ و ۸ سینئول و کامفور و مقادیر زیادی آرتمیزین است (۲۲، ۲۵). همچنین در تحقیقات گذشته نشان داده شده که ترکیبات به دست آمده از این گیاهان عاملی بر القای آپوپتوزی، مهار رگزایی و متاستاز و مهار رشد تومور در شرایط برون تنی و درون تنی و توقف چرخه سلولی در فاز G2/ M می‌باشد (۱۸، ۲۶). نتایج تحقیق حاضر نشان داد که آرتمیزیا اسکوپاریا همانند پاکلیتاکسل دارای نکروز بسیار کم و موجب توقف چرخه سلولی در فاز G2/M است. بررسی الگوی مرگ سلول‌های سرطانی در این مطالعه نشان داد که عصاره‌های مذکور، همانند پاکلیتاکسل عامل القای آپوپتوز اولیه و ثانویه هستند و بین دو عصاره گیاهی، عصاره اسکوپاریا همانند تاکسول عامل القای آپوپتوز می‌باشد. همچنین در مقایسه تأثیر

مهاری

غلظت‌ها و زمان‌ها در سمیت سلولی این دو عصاره اتانولی با داروی تاکسول نشان داده شد که پاکلیتاکسل عامل مرگ سلولی و القای آپوپتوز می‌باشد و در مقایسه با این دو عصاره تام قوی‌تر عمل نموده است، اما دارای عوارض جانبی است و برخی از سرطان‌ها بالأخص سرطان سینه نوع متاستاتیک نسبت به آن مقاومت نشان می‌دهد و بعد از مدتی مصرف این دارو منجر به عدم پاسخ بهبودی می‌گردد (۷، ۲۷، ۲۸). حال در این تحقیق نشان داده شد که بعد از داروی تاکسول بیشترین مهار رشد و سمیت و القای آپوپتوز توسط عصاره اتانولی آرتمیزیا اسکوپاریا می‌باشد. اگرچه عصاره اتانولی اسکوپاریا و سیبری از نظر مهار رشد سلولی نسبت به تاکسول در غلظت بالاتر منشأ اثر بودند، لیکن به نظر می‌رسد خالص‌سازی این عصاره‌ها بتواند اثری همانند تاکسول داشته باشند. این تحقیق نشان داد که عصاره اتانولی این دو گیاه به صورت وابسته به دوز، موجب اثرات ضد تکثیری و مهار رشد سلول و عامل ایجاد القای آپوپتوز، همانند پاکلیتاکسل گردید.

با توجه به نتایج به دست آمده برای استفاده دارویی از گیاه آرتمیزیا به خصوص اسکوپاریا جداسازی ترکیبات مؤثره و بررسی دقیق مولکولی تأثیر آپوپتوتیک و تعیین مکانیسم اثر ترکیبات جدا شده و خالص این عصاره در شرایط برون تنی و درون تنی و همچنین مقایسه آن با دیگر داروهای سرطانی پیشنهاد می‌گردد و با توجه به تفاوت غلظت‌های مؤثر در دو رده سلولی MCF7 و SKBR3 بررسی بیان ژن Her2 در این رده سلولی سرطان سینه نیز پیشنهاد شود.

این تحقیق نشان داد از لحاظ القای آپوپتوز به خصوص از نوع اولیه در این رده سلولی عصاره اسکوپاریا می‌تواند گزینه مناسبی برای تحقیقات بیشتر باشد و می‌توان با جداسازی ترکیبات خالص آن مانند آرتمیزین و اسکوپارن به عنوان جایگزین پاکلیتاکسل مورد ارزیابی و مقایسه قرار داد.

References

1. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review.YUMSJ; 2007. 13(4):383-91.
2. Kolahdoozan S, Sadjadi A, Radmard AR, Khademi H. Five common cancers in Iran. Arch Iran Med; 2010. 13(2):143-6.
3. Maughan KL, Lutterbie MA, Ham PS. Treatment of breast cancer. Chemotherapy; 2010. 51:53.
4. Cragg GM, Schepartz SA, Suffness M, Grever MR. The taxol supply crisis. New NCI policies for handling the large-scale production of novel natural product anticancer and anti-HIV agents. J Nat Prod; 1993. 56(10):1657-68.
5. Priyadarshini K, Keerthi AU. Paclitaxel against cancer: a short review. Med Chem; 2012. 2(7):139-41.
6. Weaver BA. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. Mol Biol Cell; 2014. 25(18):2677-81.
7. Crown J, O'Leary M, Ooi W-S. Docetaxel and paclitaxel in the treatment of breast cancer: a review of clinical experience. Oncologist; 2004. 9(Supplement 2):24-32.
8. Aronson JK. Meyler's side effects of drugs: the international encyclopedia of adverse drug reactions and interactions: Elsevier; 2015.
9. Groopman JE, Itri LM. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. Nat Cancer Inst; 1999. 91(19):1616-34.
10. Tian B, Wang Z, Zhao Y, Wang D, Li Y, Ma L, et al. Effects of curcumin on bladder cancer cells and development of urothelial tumors in a rat bladder carcinogenesis model. Cancer Lett; 2008. 264(2):299-308.
11. Abad MJ, Bedoya LM, Apaza L, Bermejo P. The Artemisia L. genus: a review of bioactive essential oils. Molecules; 2012. 17(3):2542-66.
12. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol; 2007. 35(4):495-516.
13. Gordaliza M. Natural products as leads to anticancer drugs. Clin& Transl Onco; 2007. 9(12):767-76.
14. Kamesaki H. Mechanisms involved in chemotherapy-induced apoptosis and their implications in cancer chemotherapy. Int J Hematol; 1998. 68(1):29-43.
15. Srivastava V, Negi AS, Kumar J, Gupta M, Khanuja SP. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. Bioorg Med Chem; 2005. 13(21):5892-908.
16. Chung KS, Choi HE, Shin JS, Cho EJ, Cho YW, Choi JH, et al. Chemopreventive effects of standardized ethanol extract from the aerial parts of Artemisia princeps Pampanini cv. Sajabal via NF-κB inactivation on colitis-associated colon tumorigenesis in mice. Food Chem Toxicol; 2015. 75:14-23.
17. Emami A ZTRSM, Ahi A, Mahmoudi M. The inhibitory effect of Artemisia annua extracts on gastric cancer cells via apoptosis induction. J ShareKord Med Univ; 2009. 11(4):1-10.
18. Krusche B, Arend J, Efferth T. Synergistic inhibition of angiogenesis by artesunate and captopril in vitro and in vivo. Evid Based Complementary

Alternat Med; 2013. 2013.
19. Blancafort A, Giró-Perafita A, Oliveras G, Palomeras S, Turrado C, Campuzano Ò, et al. Dual fatty acid synthase and HER2 signaling blockade shows marked antitumor activity against breast cancer models resistant to anti-HER2 drugs. PLoS One; 2015. 10(6):e0131241.
20. Kim JK, Kim JY, Kim HJ, Park KG, Harris RA, Cho WJ, et al. Scoparone exerts anti-tumor activity against DU145 prostate cancer cells via inhibition of STAT3 activity. PloS One; 2013. 8(11):e80391.
21. Erel ŞB, Şenol SG, Köse FA, Ballar P. In vitro cytotoxic properties of six Artemisia L. species. Turk J Pharm Sci; 2011. 8(3):247-52
22. Ranjbar M, Naghavi M, Alizadeh H, Soltanloo H, Zali A, Taghizad FR. Relative expression analysis of four terpene synthase in Artemisia species. Genetic New; 2013. (Persian).
23. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J, Fazilati M. Evaluation of Cytotoxicity of Sagebrush Plain Extract on Human Breast Cancer MCF7 Cells. Armaghane Danesh; 2013. 18(3):241-51.
24. Choi E, Park H, Lee J, Kim G. Anticancer, antiobesity, and anti-inflammatory activity of Artemisia species in vitro. J Traditl Chin Med; 2013. 33(1):92-7. 28.
25. Pirasteh boroujeni F, Abbasi A, Soltanloo H, Ranjbar M, Raeisi S. Expression Pattern of three terpene synthase in seven artemisia species native of Iran.Crop Biotech; 2013. 5:23-31. (Persian).
26. Marx C, Kayser GB, Schunemann DP, Regner A, da Rocha AB, Grivicich I. Cytotoxic effect and oxidative damage of organic extract from Artemisia verlotorum in human cancer cell lines. Sci World J; 2010. 29(7):1061-6.
27. Jiang W, Huang Y, Wang JP, Yu XY, Zhang LY. The synergistic anticancer effect of artesunate combined with allicin in osteosarcoma cell line in vitro and in vivo. Cancer Prev; 2013. 14(8):4615-9.
28. Moreno-Aspitia A, Perez EA, editors. Treatment options for breast cancer resistant to anthracycline and taxane. Mayo Clinic; 2009: Elsevier.