



بررسی القای آپوپتوز توسط عصاره هیدروالکلی گیاه آرتیمیزیا سیری (درمنه دشتی) و آرتیمیزیا ولگاریس بر روی سلول‌های ملانومای موشی B16

مریم پنجه شاهین: گروه فارماکولوژی و توكسيكولوژی، دانشكده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

امین رضا اکبریزاده: گروه فارماکولوژی و توكسيكولوژی، دانشكده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

محمد مهدی زرشناس: گروه داروسازی سنتی، دانشكده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران (* نویسنده مسئول)

mmzarshenas@gmail.com

افشین محمدی بردبری: گروه فارماکولوژی و توكسيكولوژی، دانشكده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران (* نویسنده مسئول)

toxicology@sums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: امروزه استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌های مختلف رشد چشمگیری داشته است که یکی از این بیماری‌های مهم سرطان می‌باشد. هدف از انجام این مطالعه بررسی القای آپوپتوز توسط گیاه آرتیمیزیا سیری و آرتیمیزیا ولگاریس بر روی رده سلولی B16 (ملانوما) می‌باشد.

روش کار: ابتدا عصاره هیدروالکلی این دو گیاه توسط پرکولا سیون تهیه و سلول‌های کشت داده شده B16 برای انجام تست‌های مورد نظر مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به IC_{50} به دست آمده از تست MTT تست‌های اندازه گیری میزان سیتوکروم سی و کاسپاز ۳ توسط کیت استاندارد انجام شد. همچنین برای شناسایی جزء فعال از کوئرستین به عنوان شاخص فلاونوئیدی استفاده شد.

یافته‌ها: بر اساس تست در صد بقاء میزان IC_{50} گیاه آرتیمیزیا سیری ۴۸۰ میکروگرم/میلی لیتر و گیاه آرتیمیزیا ولگاریس ۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر محاسبه شد. همچنین IC_{50} فلاونوئید کوئرستین نزدیک به ۵۰۰ میکروگرم/میلی لیتر بود. نتایج حاصل از تست نشان دهنده تفاوت معنی دار فعالیت کاسپاز ۳ در گروه‌های مورد مطالعه نسبت به کنترل منفی (DMSO) و کنترل مثبت (۲۵ میکروگرم/میلی لیتر Doxorubicin) در گیاه آرتیمیزیا ولگاریس می‌باشد و در حالی که افزایش فعالیت کاسپاز ۳ در گیاه آرتیمیزیا سیری نسبت به کنترل منفی (DMSO) وجود دارد. نتایج حاصل از تست نشان دهنده افزایش معنادار سیتوکروم سی آزاد شده در گروه‌های مورد مطالعه و در هر دو گیاه نسبت به گروه کنترل (DMSO) می‌باشد.

نتیجه گیری: با توجه به نتایج این مطالعه می‌توان نتیجه گرفت که هر دو گیاه باعث القای آپوپتوز از مسیر درون سلولی و میتوکندریایی می‌شوند؛ هرچند جداسازی اجزاء فعال گیاه برای مطالعات درون سلولی و برون سلولی بعدی ضروری است.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: دانشگاه علوم پزشکی شیراز

شیوه استناد به این مقاله:

Pangejshahin M, Rezaakbarzadeh A, Zarshenas M. Evaluation the effect of hydroalcoholic extract of Artemisia siberi and Artemisia vulgaris L on the induction of apoptosis in B16 cell lines. Razi J Med Sci. 2023(10 Dec);30.141.

*انتشار این مقاله به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 4.0 صورت گرفته است.

Evaluation the Effect of Hydroalcoholic Extract of *Artemisia siberi* and *Artemisia vulgaris* L on the Induction of Apoptosis in B16 Cell Lines

Maryam Panje shahin: Pharm.D, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Aminreza Akbarizadeh: MSc, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Mohammad Mehdi Zarshenas: PhD, School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
(*Corresponding Author) mmzarshenas@gmail.com

Afshin Mohammadi Bardbori: PhD School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran
(*Corresponding Author) toxicology@sums.ac.ir

Abstract

Background & Aims: Cancer is the second leading cause of death worldwide after cardiovascular disease in spite of a fact that a decrease in cancer mortality rate has been reported (1). Although, cancer is the third cause of death in IRAN after cardiovascular diseases and road accidents and it's mortality rate are more than developed contries. Cancer chemotherapy of cytotoxic drugs and radiotherapy are accompanied by highly deleterious and often life-threatening side effects. In recent years, the use of medicinal plants in the treatment of diseases such as cancer has developed significantly (2). Among them, *Artemisia* is a large genus of plant, around 200 and 400 species which is grow in temperate climates of dry or semiarid habitats. The most well known species include *A. vulgaris*, *A. tridentata*, *A. annua* and *A. absinthium*. Most species have aromas and bitter tastes from terpenoids and sesquiterpene lactones and bioactive phytochemicals that have been reported to exhibit sveral human health effects including antimalarial, antioxidant, neuroprotective, anti-inflammatory, and antimicrobial activities (3). Recently, artemisinin derivative (artemisinin-combination therapies) are accepted as a gold standard treatment worldwide for malaria caused by *Plasmodium falciparum*. In the case of cancer treatment, the plant species and its bioactive compounds target multiple pathways. Also, due to the promising features of herbal plant its anti-cancer activity has been investigated for use in modern medicine. In this case, artemisinins have shown potent anticancer activity in multiple cancers in vitro and in vivo via different mode of action including autophagy, cell cycle arrest, and apoptosis.

A well-known type of programmed cell death which described in 1842 is apoptosis. The cells initiates intracellular apoptotic signaling in response to many factors including stress, heat, radiation, viral infection as well as hypoxia. Several proteins and mediators are involved, but two main methods of regulation have been identified: the intrinsic pathway is also known as the mitochondrial pathway and extrinsic pathway is identified by TNF and Fas pathways.

Apoptosis is one of the of programmed cell death that occurs in multicellular organisms such as mamals and can be activated by either intrinsic or extrinsic factors. There are at least two kind of signaling pathways that lead to apoptosis, the intrinsic pathway of apoptosis and the extrinsic pathway of apoptosis. The extrinsic pathway of apoptosis is triggered by the extracellular environment and death signals. The intrinsic pathway of apoptosis pathway is linked to mitochondria and DNA damage. In both the intrinsic and extrinsic pathway of apoptosis, signaling results in the activation of a family of Cys (Cysteine) proteases, named caspases. In the mitochondrial-dependent phatway Cyto C release lead to formation of a catalytic multiprotein protein so called apoptosome that can activates Caspase-9. Activated Caspase-9 then is able to cleave Caspase-3and apoptosis cascade. In the other hand, during apoptosis which is initiated by mitochondria,

Keywords

Artemisia siberi,
Artemisia vulgaris L,
Cytotoxicity,
Caspases,
Apoptosis,
Cancer,
B16 cells

Received: 03/07/2023

Published: 06/12/2023

cytochrome c is released through the activation of Bax and Bak proteins. Upon cytochrome c is released it binds with Apoptotic protease activating factor – 1 also called Apaf-1. The Apaf-1 then binds to pro-caspase-9 to create a protein complex known as an apoptosome. Active form of initiator caspase of 9 is cleaved by apoptosome and starts to cleave and activates effector pro-caspase into the effector caspase-3 (4).

In several studies have shown that different types of *Artemisia* Sp. might have anticancer effect but the mode of action of its anticancer activity is not well known. In this regard, the aim of this study was to evaluate the effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia siberi* Besser. and *Artemisia vulgaris* L. on the induction of apoptosis in B16 cell lines.

Methods: For this purpose, the hydroalcoholic extracts of these two plants were prepared by percolation method. Then the B16 melanoma cell lines were grown on Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) cell culture and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) method was utilized to obtain the appropriate concentrations of *Artemisia siberi* Besser. and *Artemisia vulgaris* L. for determination of The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of each extract. After calculation of IC₅₀, the amount of released cytochrome C and activity of caspase 3 were measured by using standard kits. In these experiments, doxorubicine was used as positive control. For possible identification of active ingredient of extracts, Quercetin was used as flavonoid marker.

Results: The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀ value) of the *Artemisia siberi* Besser. and *Artemisia vulgaris* L. was determined by constructing dose-response curves. According to the IC₅₀ values, their potencies can be ranked as follows:

Artemisia siberi Besser > Quercetin > *Artemisia vulgaris* L. According to the MTT test, IC₅₀ values were 480 µg/ml, 500 µg/ml and 5000 µg/ml for *Artemisia siberi* Besser, Quercetin and *Artemisia vulgaris* L, respectively.

The amount of cytochrome C release for *Artemisia siberi* Besser. and *Artemisia vulgaris* L. was significantly increased 1.53 and 1.93 time more than control group respectively. There was a significant difference between the increases of activities of caspase 3 by *Artemisia siberi* Besser. and *Artemisia vulgaris* L compared to the negative and positive controls (1.63 and 4.7 times more than negative control respectively). There was also significant difference between the increases activities of caspase 3 by *Artemisia vulgaris* L compared to positive control.

Conclusion: According to the outcomes, it is concluded that the hydroalcoholic extracts of *A. vulgaris* and *A. siberi* can induce apoptosis via mitochondrial-dependent pathway as a considerable underlying mechanism. The IC₅₀ value of *Artemisia siberi* Besser is comparable with Quercetin. Also, the caspase 3 activity induced by *Artemisia vulgaris* L is notable. However, in order to show that this phytochemical have anticancer activity, fractionation and separation of active ingredients as well as more in vitro and in vivo studies seems to be necessary.

Conflicts of interest: None

Funding: Shiraz University of Medical Sciences

Cite this article as:

Pangejshahin M, Rezaakbarzadeh A, Zarshenas M. Evaluation the effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia siberi* and *Artemisia vulgaris* L on the induction of apoptosis in B16 cell lines. *Razi J Med Sci.* 2023(10 Dec);30:141.

*This work is published under CC BY-NC-SA 4.0 licence.

مقدمه

سرطان یکی از عوامل مهم مرگ و میر در سراسر جهان می باشد (۱). به دلیل عوارض جانبی داروهای شیمیایی استفاده از گیاهان دارویی برای درمان بیماریها در حال افزایش است (۲). یکی از گیاهان مهم در این ارتباط خانواده درمنه می باشد که دارای خواص زیادی است (۳، ۴). گیاهان دارویی منجمده این خانواده به دلایل مهم پزشکی در سراسر جهان مورد استفاده قرار می گیرند (۵، ۶). طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی ۸۰ درصد مردم کاربرد پزشکی سنتی را به پزشکی عمومی ترجیح می دهند (۷). باید توجه داشت که بیشتر داروهای شیمی درمانی مورد استفاده در سرطانها سلول های طبیعی را هم تحت تاثیر قرار می دهند. حال آنکه استفاده از ترکیبات طبیعی با اثرات خفیف تر ممکن است سمیت کمتری را بر سلول های سالم برجای گذارد. بنابراین استفاده از گیاهان سنتی برای کنترل سرطان ها به طور وسیعی افزایش یافته است (۸).

آپوپتوز یک رخداد طبیعی سلولی است که به کمک آن میزان رشد و تکثیر سلول های بدن تنظیم و از ایجاد سرطان جلوگیری می شود. مرگ سلولی به دلیل آپوپتوز بامشخصات مرفولوژیکی قابل تمایز و در آخرین مرحله مرگ سلولی با تولید اجسام آپوپتوزی مشخص می گردد (۹). چرخش فسفاتیدیل سرین به سمت بیرون غشای پلاسمایی مانع بروز پاسخ التهابی می شود که مشخصه مرگ سلولی نکروز است (۱۰). فرایند آپوپتوز هم مانند تمام مسیرهای سلولی از مسیرهای مشخص و توسط محرک های خاص القا می شود. دو مسیر آپوپتوز که بیشترین مطالعه را در سلول های پستانداران داشته اند، یکی مسیر به واسطه گیرنده مرگ (مسیر خارجی) است که باعث فعال کردن این گیرنده بر سطح غشا می شود و دیگری مسیر داخلی است که به واسطه سیگنال هایی از میتوکندری رخ می دهد (۱۱).

مکانیسم های احتمالی در مسیر داخلی القاء آپوپتوز عبارتند از: باز شدن منفذ انتقال نفوذپذیری میتوکندریایی، آزاد شدن سیتوکروم C و تشکیل کمپلکس آپوپتوزوم و فعال شدن کاسپاز ۹ که سبب فعال شدن کاسپازهای اجرایی می گردد و در نتیجه کاسپازهای اجرایی روی سوبستراهای خود عمل

می نمایند و فرایند آپوپتوز صورت می گیرد. در این میان نقش کاسپاز ۳ که در پایین دست کاسپازهای بالا دستی شروع کننده و در هر دومسیر داخلی و خارجی دیده می شود حائز اهمیت است. کاسپاز ۳ از زیموژن ۳۲ کیلو دالتونی ساخته شده که نهایتاً به اجزاء ۱۷ و ۱۲ کیلودالتونی شکسته و بازآرایی می شود تا شکل فعال کاسپاز ۳ به دست آید (۱۱).

جنس درمنه ۱ (Artemisia) متعلق به خانواده آستراسه (Asteraceae) و بزرگ ترین جنس آنتیمیده (Anthemideae) می باشد که دارای حدود ۵۰۰ گونه است که تمرکز اصلی این گیاه در آسیای مرکزی می باشد (۱۲). جنس درمنه دارای گونه ها و رویشگاه های مختلف در نقاط مختلف دنیا است. گونه های این جنس از مناطق آلپی تا استپی گسترده می باشند. گیاه درمنه نیز در ایران همانند سایر نقاط دنیا دارای پراکنش وسیعی است به طوری که در کلیه مناطق رویشی کشور از هیرکانی گرفته تا صحاری - سندی و نواحی ایرانی و تورانی می توان گونه هایی از آن را مشاهده نمود (۱۳).

دارای طیف وسیعی از فعالیت های بیولوژیک از جمله سیتوتوکسیک، آنتی-هیپاتوتوکسیک، ضد میکروب، ضد باکتری، ضد انگل، ضد مالاریا، ضد قارچ، ضد سمومیت و فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد (۱۴). (۱۵). از ترکیبات اصلی اسانس درمنه کامفور است که جزو کتون های مونوترپنوئید بوده، بسیار فرار است، به آسانی جذب پوست می شود و جهت مصارف دارویی و صنعتی کاربرد دارد (۱۶).

نتایج مطالعات گذشته نشان داده است که عصاره متاتولی قسمت های مختلف درمنه دشتی دارای خاصیت سایتوتوکسیک بر سلول سرطان پستان MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) می باشد (۱۷). در مطالعات پیشین وجود آلفا پینین، بتا پینین، جرماکرین D، لیمونن و میرسن موجود در درمنه عامل احتمالی مهار رشد سلول های سرطان سینه انسانی، کبد و ملانوما گزارش شده اند (۱۸). همچنین یوپاتلین موجود در آرتمیزیا آسیاتیکا (Artemisia) Asiatica از عوامل القا کننده آپوپتوز در سلول های پرومیلوسیتیک (HL-60) و سرطان معده شناخته شده است (۱۹). در اسانس درمنه دشتی ۳۱ ترکیب مشخص شده است که

می‌شود (گرت شماره: ۹۴-۰۱-۰۷-۰۴۷۴).

روش کار

تهیه گیاهان و عصاره هیدروالکلی به روش پرکولاسیون: یک نمونه از گیاه آرتیمیزیا سیبری (*Artemisia sieberi* Besser) از یکی از عطاری‌های سطح شهر خریداری شده و برای شناسایی به دانشکده داروسازی، گروه داروسازی سنتی انتقال یافت. برای مقایسه نمونه ای از گیاه آرتیمیزیا ولگاریس (*Artemisia vulgaris* L) که در باغچه گیاهان دارویی دانشکده کاشته شده نیز برداشت شده و به کارشناس ارشد گیاهان دارویی در گروه مربوطه جهت تایید جنس و گونه تحویل داده شد. برای هر دو گونه ذکر شده جداگانه بعد از شناسایی شماره اختصاص داده شد که به ترتیب PM-921 و 991 می باشند.

نمونه های مورد نظر بعد از خرد شدن با آسیاب مورد عصاره گیری قرار گرفتند. روش اتخاذ شده برای عصاره گیری از نمونه ها، روش پرکولاسیون و دستگاه پرکولاتور می باشد. با این روش عمل عصاره گیری به طور کامل انجام می شود. در انتهای ظرف دستگاه پرکولاتور شیر مناسبی تعبیه شده که به وسیله آن می توان به خوبی سرعت عصاره تهیه شده را تنظیم کرد. در ابتدا در انتهای ظرف مقدار مناسبی پنبه قرار داده و سپس ۲/۵ کیلوگرم گیاه پودر شده توسط آسیاب برقی را با ترازو وزن و به پرکولاتور انتقال داده شده است و سپس یک کاغذ صافی مرطوب شده با حلال متانول روی سطح گیاه قرار داده شد و چند گلوله شیشه ای روی آن قرار داده تا از جا به جا شدن ذرات گیاه جلوگیری به عمل آید. آرام آرام متانول به میزان ۳/۵ لیتر به آن اضافه کرده تا حلال به طور یکنواخت در کل توده گیاهی نفوذ کند. روی سطح پرکولاتور را پوشانده و سپس درب ظرف بسته شد. عمل عصاره گیری به مدت ۳ روز ادامه داشت و شیر پرکولاتور را باز کرده و عصاره به صورت قطره قطره با سرعت تقریبی ۱۰ تا ۱۵ قطره در دقیقه استخراج گردید. عصاره هایی که در ابتدا از پرکولاتور خارج می شوند غلیظ تر اما به تدریج رقیق تر و شفاف تر می شوند. عصاره های به دست آمده جمع

مونوترپن ها (۸۷/۲ درصد)، بتا توجون (۱۹/۸ درصد)، کامفر (۱۹/۵ درصد)، آلفا توجون (۶/۴ درصد) و سینئول (۵/۷ درصد) به ترتیب بیشترین درصد اسانس گیاه را تشکیل می دهند (۲۰). با توجه به مطالعات صورت گرفته ترپنوئیدها و فلاونوئیدهای موجود در آرتیمیزیا آنا (*Artemisia annu*) دارای سمیت بر چندین رده سلول سرطانی از سان ه ستند (۲۱، ۲۲). آرتیمیزینین یکی از سسکوئی ترپن هایی است که در گونه های مختلف این گیاه وجود دارد و فعالیت ضد سرطانی آن در محیط برون تنی و درون تنی ثابت شده است (۲۲). اثر آرتیمیزین موجود در این گیاه بر روی رده سلول های سرطانی مانند MSV-HL13 مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین در مطالعه وو و همکاران اثرات آپتوزی آرتیمیزیا آنا علیه سلول اندوتلیال ورید اومبلیکال گزارش شد (۲۳). پاسخ پلئوتروپیک آن در سلول های سرطانی شامل مهباز رشد سلول، آپتوزیس، ممانعت از آنژیوژنیز، تخریب مهاجرت سلولی و کاهش پاسخ گیرنده های هسته ای می باشد (۲۴، ۲۵). اثر ضد سرطانی این گیاه بر روی سلول های سرطانی HpG گزارش شده است (۲۶). مشخص شده است که آرتیمیزینین و مشتقات فعال آن قادر هستند فعالیت آنژیوژن و متاستاز را در بعضی سلول های سرطانی مهار کنند. هووان چن و همکاران اثرات ضد سرطانی و ضد آنژیوژنیک آرتیمیزینین و هیدروکسی آرتیمیزینین را در رده سلول های سرطانی Hela سرطان رحم، JAR سرطان کوریون رحم، RD سرطان ترانسورسال جنینی و HO-8910 سرطان تخمدان سنجیدند. مشخص شد هر دو نوع ماده اثرات ضد سرطانی علیه همه رده های سلولی دارند، اما هیدروکسی آرتیمیزینین قوی تر بود (۲۱).

هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات القای آپتوز توسط عصاره هیدروالکلی گیاه آرتیمیزیا سیبری (*Artemisia sieberi*) و آرتیمیزیا ولگاریس (*Artemisia sieberi*) بر روی سلول های سرطانی ملانوما موشی B16 می باشد.

تقدیر و تشکر بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خاطر حمایت مالی از این طرح قدردانی

چاهک‌ها کاملاً خشک شوند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر DMSO به هر چاهک اضافه شده و جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد (۲۷).

اندازه‌گیری آزادسازی سیتوکروم C: میزان آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول توسط کیت الایزای انسانی سیتوکروم سی از شرکت Abcam و طبق پروتکل ذیل انجام شد. این کیت برای ارزیابی کمی سیتوکروم C انسانی براساس تکنولوژی بیوتین آنتی بادی دوگانه ساندویچ استفاده می‌شود و با روش دو مرحله‌ای انجام می‌شود که در آن محلول‌ها به کمترین میزان رقیق‌سازی احتیاج دارند. از این کیت می‌توان برای اندازه‌گیری سیتوکروم C نمونه‌های انسانی سرم، پلاسما، عصاره سلولی، قسمت‌های شناور کشت سلولی و دیگر سیالات بیولوژیکی استفاده کرد.

در این کیت از متد ساندویچ الیزا استفاده می‌شود. پلیت میکروالیزا موجود در این کیت با آنتی‌بادی مخصوص سیتوکروم C پوشانده شده است. نمونه‌ها یا استانداردها به چاهک‌های مناسب از پلیت میکروالیزا اضافه و با آنتی‌بادی به خصوص ترکیب می‌شوند. سپس یک آنتی‌بادی شناساگر بیوتینیل‌ه مخصوص برای سیتوکروم C و Avidine-HRP conjugate به صورت پی در پی به هر چاهک میکروپلیت اضافه و انکوبه می‌شود. اجزای آزاد شسته و دور ریخته می‌شوند. محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه می‌شود. فقط چاهک‌هایی که حاوی سیتوکروم C، آنتی بادی شناساگر بیوتینیل‌ه و Avidine-HRP conjugate هستند به رنگ آبی در می‌آیند. واکنش آنزیم-سوبسترا با افزودن یک محلول سولفوریک اسید خاتمه می‌یابد و به رنگ زرد تبدیل می‌شود. جذب نوری (OD) به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج 450 ± 2 نانومتر اندازه‌گیری می‌شود. مقدار OD با غلظت سیتوکروم C متناسب است. می‌توان غلظت سیتوکروم C موجود در نمونه را با مقایسه OD نمونه و استاندارد محاسبه نمود.

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز-۳: کیت مورد استفاده در این تست کیت کاسپاس ۳ از شرکت Abcam به روش نور سنجی، فعالیت کاسپاز وابسته به

آوری و حجم آن‌ها یادداشت شد و تحت شرایط خلا توسط روتاری تغلیظ شد و عصاره‌های تغلیظ شده در دمای یخچال تا زمان استفاده نگهداری شدند. راندمان عصاره‌های آرتمیزیا سیبری و آرتمیزیا ولگاریس به ترتیب ۵/۵ و ۴/۵ درصد وزنی-وزنی می‌باشد.

کشت سلول‌های ملانومای موشی B16: در این مطالعه از رده سلول‌های ملانومای موشی با نام B16 استفاده گردید. سلول‌های Murine B16-F10 از بانک سلولی ایران (NCBI) خریداری شد. در این مطالعه از محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ FBS، ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی سیلین-استرپتومایسین (PEST) استفاده شد. انکوباتور مورد استفاده برای رشد سلول‌ها دارای ۵٪ دی‌اکسیدکربن، دمای ۳۷ سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵٪ است.

تست MTT: در این تست کریستال‌های تترازولیوم زرد رنگ MTT از شرکت سیگمادر میتوکندری سلول‌های زنده احیا شده و به فورمازانارغوانی رنگ تبدیل می‌شود. هرچه سلول‌ها فعال‌تر و تعدادشان بیشتر باشد میزان رنگ ایجاد شده بیشتر است. جذب نوری رنگ ارغوانی ظاهر شده در طول موج ۴۹۰-۵۴۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری می‌شود.

برای انجام آزمایش سلول‌ها در پلیت ۹۶ تایی سید شده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه (۰/۰۳ تا ۰/۰۱ میلی‌گرم/میکرولیتر) و DMSO به عنوان گروه کنترل تیمار شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شدند.

پس از اتمام زمان تیمار، تست MTT به این شرح بر روی سلول‌ها انجام گرفت. MTT با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تهیه شد. محیط کشت رویی چاهک‌ها به آرامی به وسیله سمپلر تخلیه شده، سپس ۱۵۰ میکرولیتر از محلول آماده شده MTT به چاهک‌ها اضافه شده و پلیت به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محیط کشت به وسیله سمپلر خارج و سلول‌ها را به مدت ۱ ساعت در محیط تاریک و دمای اتاق (۲۵ سانتی‌گراد) انکوبه کرده تا

داده‌ها با استفاده از برنامه کامپیوتری گراف پد پریم ، آزمون آماری آنوای یک طرفه و آزمون تست تی همراه تست توکی برای مقایسه گروه‌های مورد آزمایش استفاده گردید. اختلاف بین گروه‌ها در هر نقطه با $p < 0.05$ معنی‌دار تلقی می‌شود.

یافته‌ها

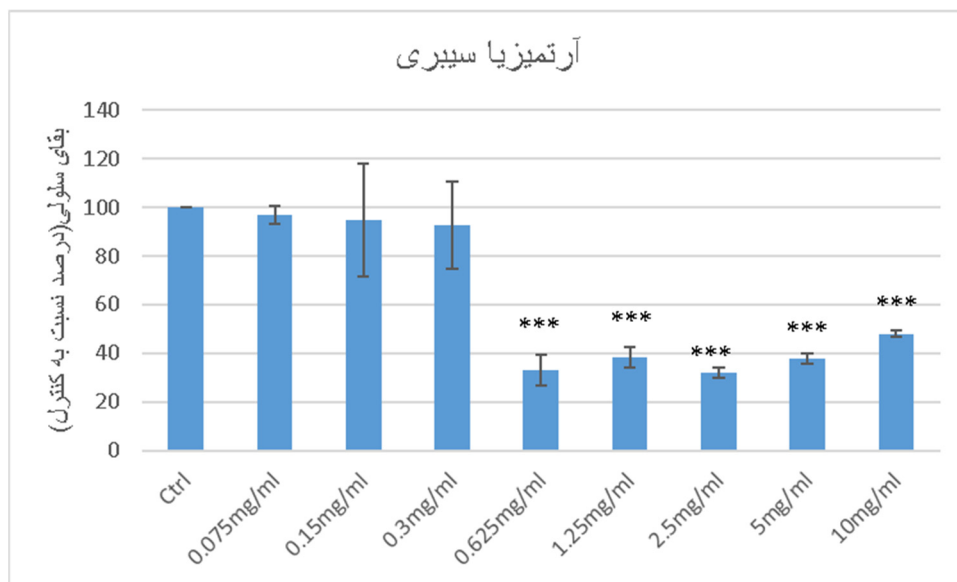
اثرات وابسته به دوز عصاره هیدروالکلی آرتمیزیا سبیری /ولگاریس و فلانوئید کوئرستین بر روی درصد بقای سلولی (تست MTT): برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف گیاهان آرتمیزیا سبیری، آرتمیزیا ولگاریس و فلانوئید کوئرستین بر روی افزایش یا کاهش تقسیم سلولی، سلول‌های کشت شده طبق پروتکل ذکر شده تیمار شد و افزایش یا کاهش پرولیفراسیون سلولی پس از ۲۴ ساعت به وسیله تست MTT در طول موج ۵۴۰ نانومتر بررسی شد (شکل ۱).

با توجه به نتایج حاصله میزان IC_{50} آرتمیزیا سبیری ۴۸۰ میکرو گرم/میلی لیتر محاسبه شد.

DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) سوبسترای کاسپاز) را شناسایی می‌کند. وقتی که DEVD از سوبسترای نشاندار DEVD-pNA به وسیله کاسپاز ۳ یا کاسپازهای مرتبط جدا می‌شود، نشر نور pNA آزاد می‌تواند توسط یک اسپکتروفتومتر در طول موج ۴۰۵ یا ۴۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شود. با مقایسه جذب pNA آزاد با یک نمونه آپوپتوزی و کنترل می‌توان افزایش فعالیت کاسپاز ۳ را اندازه‌گیری کرد.

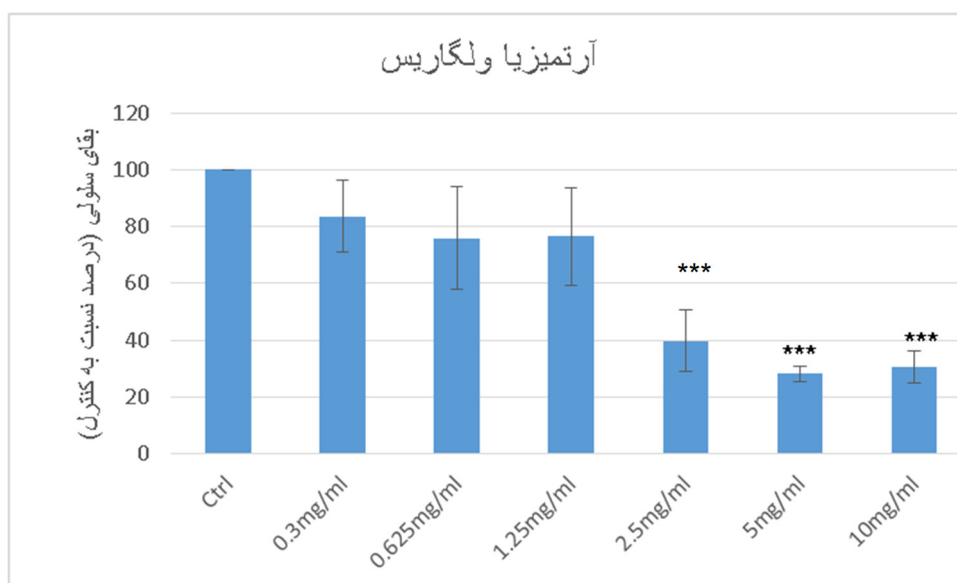
اندازه‌گیری غلظت پروتئین و نرمالیز کردن داده‌ها: غلظت پروتئین هر نمونه به روش بیوراد اندازه‌گیری می‌شود و برای هر کدام از فاکتورهای که مورد اندازه‌گیری قرار گرفت میزان آن فعالیت با غلظت پروتئین نرمالیز می‌گردد. ارزیابی پروتئین Bio-rad، براساس روش برادفورد روشی ساده و دقیق براساس رنگ‌سنجی برای اندازه‌گیری غلظت پروتئین محلول است. این آزمون شامل افزودن رنگی اسیدی به محلول پروتئینی و سپس خواندن جذب به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر می‌باشد. مقایسه جذب خوانده شده با منحنی استاندارد، اندازه نسبی غلظت پروتئین را به دست می‌دهد (۲۸).

جمع‌آوری داده‌ها و آنالیز آماری: بعد از جمع‌آوری



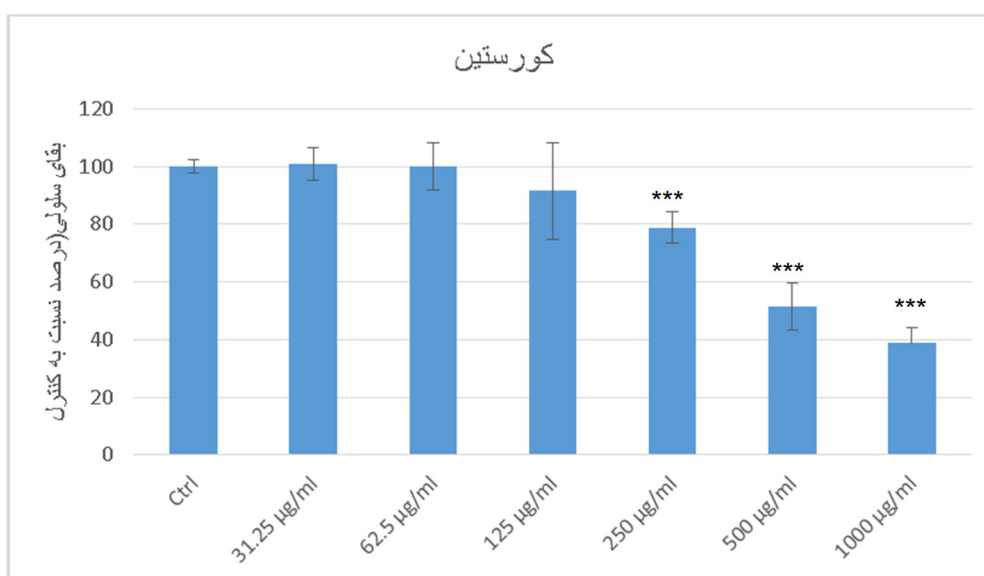
شکل ۱- درصد مرگ سلولی در غلظت‌های مختلف گیاه آرتمیزیا سبیری

***تفاوت معنی‌داری با گروه کنترل $p < 0.001$



شکل ۲- درصد مرگ سلولی در غلظت‌های مختلف گیاه آرتمیزیا ولگاریس

***تفاوت معنی داری با گروه کنترل $p < 0.001$



شکل ۳- درصد مرگ سلولی در غلظت‌های مختلف فلاونوئید کورستین

*تفاوت معنی داری با گروه کنترل $p < 0.05$

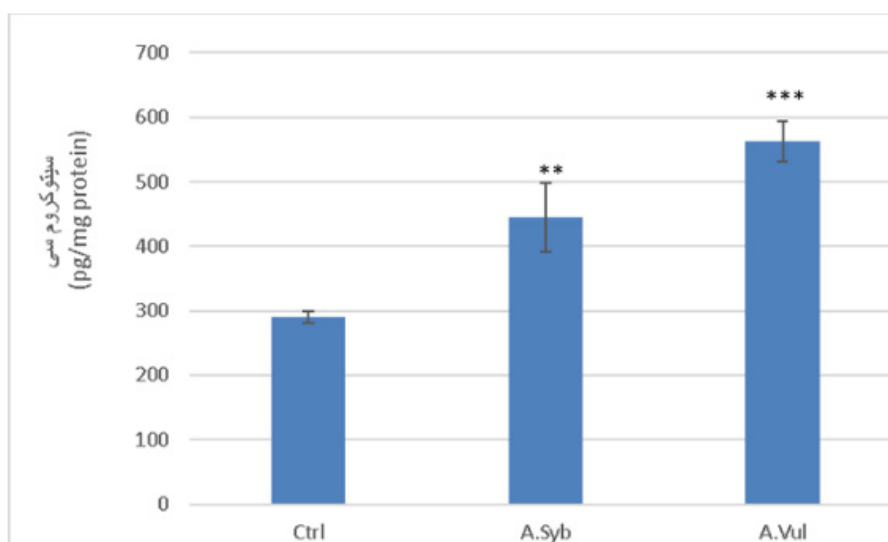
**تفاوت معنی داری با گروه کنترل $p < 0.01$

میزان آزادسازی سیتوکروم C از میتوکندری به سیتوزول توسط Human Cytochrome C ELISA kit و طبق پروتکل شرح داده شده پس از ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های کشت داده شده و تیمار شده انجام گرفت و میزان جذب نوری توسط دستگاه الیزا ریدر در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

با توجه به نتایج به دست آمده IC_{50} آرتمیزیا ولگاریس ۵ میلی گرم/میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۲). با توجه به نتایج به دست آمده IC_{50} فلاونوئید ۵۰۰ میکرو گرم/میلی لیتر محاسبه شد (شکل ۳). اثرات وابسته به دوز عصاره هیدروالکلی آرتمیزیا سیبری /ولگاریس بر روی آزادسازی سیتوکروم C:

اثربیشتری در آزادسازی سیتوکروم c داشت ($p < 0.01$).
اثرات وابسته به دوز عصاره هیدروالکلی آرتمیزیا
سبیری/ولگاریس بر روی فعالیت آنزیم کاسپاز ۳
سیتوزولی: به منظور اندازه‌گیری فعالیت آنزیم کاسپاز ۳
سیتوزولی از کیت caspase-3 assay kit استفاده و
مراحل آزمایش پس از ۲۴ ساعت بر روی سلول‌های

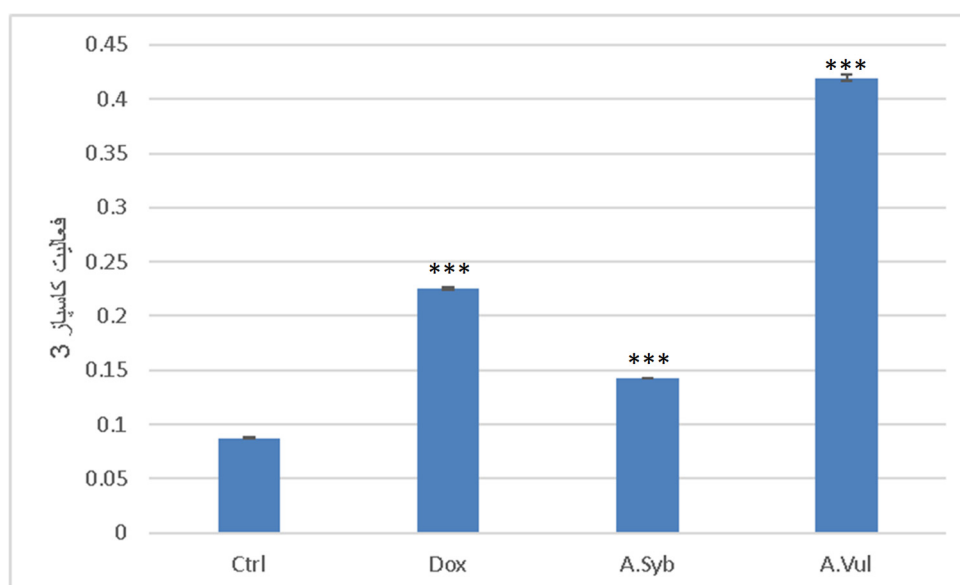
همان طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود هر دو
گروه نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی داری
داشتند. آرتمیزیا ولگاریس با غلظت ۵ میلی گرم/میلی
لیتر دارای اثر تقریباً دو برابری در آزادسازی سیتوکروم c
داشت ($p < 0.001$). آرتمیزیا سبیری نیز با غلظت ۰/۴۸
میلی گرم/میلی لیتر نیز نسبت به گروه کنترل منفی



شکل ۴- اثرات گیاهان آرتمیزیا سبیری و ولگاریس بر روی آزادسازی سیتوکروم C

*تفاوت معنی داری با گروه کنترل $p < 0.01$

**تفاوت معنی داری با گروه کنترل $p < 0.001$



شکل ۵- اثرات گیاهان آرتمیزیا سبیری و ولگاریس بر روی میزان فعالیت آنزیم کاسپاز ۳

***تفاوت معنی داری با گروه کنترل $p < 0.001$

ای دیگر اثر ضد سرطانی آرتیمیزینین بر روی دو رده سلولی ملانوما (A375P and A375M) بررسی و مشخص شد با مکانیسم مهار بیان $\alpha v \beta 3$ و integrin و کاهش تولید متالوپروتیناز ۲ خاصیت ضد توموری دارد (۲۹).

در مطالعه حاضر به منظور بررسی اثر عصاره دو گیاه ذکر شده بر رده سلولی سرطانی B16 آزمایش‌های مختلفی شامل تست MTT به منظور بررسی القا مرگ سلولی توسط عصاره گونه سیبری بر رده سلول‌های B16 و همچنین اندازه گیری میزان آزادسازی سیتوکروم C و کاسپاز ۳ صورت گرفت (شکل‌های ۱-۵).

نتایج تست MTT نشان داد که عصاره هیدروالکلی آرتیمیزیا سیبری با غلظت یک دهم گیاه آرتیمیزیا ولگاریس اثربخشی مشابهی بر روی در صد زنده ماندن سلولی داشته است. لذا، می توان چنین نتیجه گرفت که گیاه آرتیمیزیا سیبری به ظاهر ۱۰ برابر قدرت اثربخشی بیشتری نسبت به آرتیمیزیا ولگاریس دارد.

در این تست فلاونوئید کوئرستین به عنوان کنترل استفاده شد با توجه به اینکه کوئرستین در غلظت محاسبه شده توانایی اثربخشی نداشته و از طرفی نتایج MTT کوئرستین و آرتیمیزیا سیبری به هم نزدیک بودند، محتمل هست که محتوای فلاونوئیدی به تنهایی عامل ایجاد اثر سایتوتوکسیک نباشد. از سوی دیگر می دانیم آرتیمیزینین به عنوان یک سزکوئی ترپن لاکتون در آرتیمیزیا سیبری غلظت خیلی کمی دارد که نمی تواند اثربخشی داشته باشد. در کل می توان نتیجه گرفت مجموع ترکیبات دیگری با روند مکانیستیک متغیر دیگری بتواند اثر کند ولی کوئرستین به طور قطع به دلیل نتایج حاصل از تست MTT نمی تواند اثرگذار باشد.

در نتایج تست غلظت سیتوزولی سیتوکروم C، که می تواند به عنوان نمادی از میزان فعال شدن مسیر داخلی آپوپتوز در نظر گرفته شود، مجدداً گیاه آرتیمیزیا سیبری با غلظتی معادل 1/10 گیاه آرتیمیزیا ولگاریس اثربخشی مشابهی نشان داد. گرچه میزان آزادسازی سیتوکروم سی توسط گیاه ولگاریس نسبت به گیاه

کشت داده و تیمار شده با غلظت‌های مشخص آرتیمیزیا سیبری (با غلظت ۰/۴۸ میلی گرم/میلی لیتر) و ولگاریس (۵ میلی گرم/میلی لیتر) و DMSO به عنوان کنترل منفی، داروی ۲۵ میکرو گرم/میلی لیتر Doxorubicin به عنوان کنترل مثبت طبق پروتکل مربوطه صورت گرفت. سپس جذب در طول موج ۶۹۰ نانومتر خوانده شد که نتایج پس از آنالیزهای آماری طبق شکل زیر می باشد.

همان طور که در شکل ۵ مشاهده می شود، افزایش معناداری در فعالیت کاسپاز ۳ در غلظت ۰/۴۸ میلی گرم/میلی لیتر مربوط به آرتیمیزیا سیبری و ۵ میلی گرم/میلی لیتر مربوط به آرتیمیزیا ولگاریس وجود داشت ($p < 0.0001$).

بحث

استفاده از گیاهان در درمان سرطان‌ها دارای تاریخچه طولانی است که بیش از ۳۰۰۰ گونه گیاهی که در درمان سرطان استفاده می شوند، گزارش شده اند. از جمله این گیاهان می توان به خانواده های لیلیاسه با ماده موثره ی آلین-آلیسین و آلون-آلوئه امودین و زنجبیل با ماده موثره ی کورکومین-ترمرون اشاره نمود.

در این مطالعه اثرات القای آپتوز توسط عصاره هیدروالکلی گیاه آرتیمیزیا سیبری و ولگاریس بر روی سلول‌های سرطانی ملانوما موشی B16 بررسی شد. نتایج مطالعات گذشته نشان داده است که مواد موثره درمنه دارای خاصیت سایتوتوکسیک بر روی سلول‌های سرطانی من جمله MCF-7 (۱۷) سلول‌های سرطان پستان انسانی، کبد، سلول‌های پرومیلوسیتیک (HL-60)، سلول‌های سرطانی معده و چندین رده سلول سرطانی انسانی می باشند (۲۱، ۲۲). آرتیمیزینین یکی از سسکوئی ترپن‌هایی است که در گونه های مختلف این گیاه وجود دارد و فعالیت ضد سرطانی آن در

محیط‌های برون و درون تنی ثابت شده است (۲۲-۲۶). مشخص شده است که آرتیمیزینین و مشتقات فعال آن قادر هستند فعالیت آنژیوژنز و متاستاز را در بعضی سلول‌های سرطانی مهار کنند (۲۱). در مطالعه

Bertuccio P, Malvezzi M, et al. The global decrease in cancer mortality: trends and disparities. *Ann Oncol*. 2016;27(5):926-33.

2. Desai AG, Qazi GN, Ganju RK, El-Tamer M, Singh J, Saxena AK, et al. Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Curr Drug Metab*. 2008;9(7):581-91.

3. Taleghani A, Emami SA, Tayarani-Najaran Z. *Artemisia*: a promising plant for the treatment of cancer. *Bioorg Med Chem*. 2020;28(1):115180.

4. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.

5. Smith-Warner SA, Elmer PJ, Tharp TM, Fosdick L, Randall B, Gross M, et al. Increasing vegetable and fruit intake: randomized intervention and monitoring in an at-risk population. *Cancer Epidemiol Prev Biomarkers*. 2000;9(3):307-17.

6. Calderone V, Martinotti E, Baragatti B, Cristina Breschi M, Morelli I. Vascular effects of aqueous crude extracts of *Artemisia verlotorum* Lamotte (Compositae): in vivo and in vitro pharmacological studies in rats. *Phytother Res*. 1999;13(8):645-8.

7. Kumar S, Suresh P, Vijayababu M, Arunkumar A, Arunakaran J. Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3). *J Ethnopharmacol*. 2006;105(1):246-50.

8. El-Massry KF, El-Ghorab AH, Farouk A. Antioxidant activity and volatile components of Egyptian *Artemisia judaica* L. *Food Chem*. 2002;79(3):331-6.

9. Elsharkawy A, Oakley F, Mann D. The role and regulation of hepatic stellate cell apoptosis in reversal of liver fibrosis. *Apoptosis*. 2005;10(5):927-39.

10. Henson PM, Bratton DL, Fadok VA. Apoptotic cell removal. *Curr Biol*. 2001;11(19):R795-R805.

11. Tamm C. Apoptotic cell death in neural stem cells exposed to toxic stimuli: Institutet för miljömedicin (IMM)/Institute of Environmental Medicine; 2007.

12. Borchers AT, Hackman RM, Keen CL, Stern JS, Gershwin ME. Complementary medicine: a review of immunomodulatory effects of Chinese herbal medicines. *The American journal of clinical nutrition*. 1997;66(6):1303-12.

13. Ghahreman A. *Flore de l'Iran*. Teheran: University of Teheran d, rec'd. 1993.

14. Asgary S, Dinani NJ, Madani H, Mahzouni P. Ethanolic extract of *Artemisia aucheri* induces regression of aorta wall fatty streaks in hypercholesterolemic rabbits. *Die Pharmazie-An Int J Pharma Sci*. 2008;63(5):394-7.

15. Mohammadpoor SK, Yari M, Rustaiyan A, Masoudi S. Chemical Constituents of the Essential Oil of *Artemisia aucheri* Boiss.—a Species Endemic to

سیبری بیشتر بود، اما هر دو گیاه تفاوت معناداری نسبت به کنترل منفی از خود نشان دادند (شکل‌های ۱-۳). با توجه به اینکه فعال سازی سیتوکروم سی بیانگر شروع آبشار داخلی آپوپتوز می باشد، می توان این نتایج را برداشت کرد که مسیر القاء آپوپتوزیس توسط این دو گیاه از مسیر داخل سلولی می باشد.

در ادامه مطالعه تاثیر گیاهان ولگاریس و سیبری بر میزان فعالیت کاسپاز ۳ مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تست نیز مانند تست سیتوکروم سی هر دو گیاه تفاوت معناداری نسبت به کنترل منفی داشته، اما میزان تفاوت در گیاه ولگاریس نسبت به گیاه سیبری بیشتر بوده است. همچنین در مقایسه با کنترل مثبت (داروی دوک سورویه سین) گیاه ولگاریس تفاوت معنادار بیشتری داشته است در صورتی که در مقایسه ی گیاه سیبری و کنترل مثبت، سیبری به نسبت کنترل مثبت اثربخشی کمتری در میزان فعالیت کاسپاز ۳ داشته است.

نتیجه گیری

نتایج حاصله از تست های اندازه گیری فعالیت کاسپاز ۳ و میزان غلظت سیتوکروم سی، این استنتاج را ایجاد می کند که گیاه ولگاریس نسبت به سیبری در هر دو تست تفاوت معنادار بیشتری در مقایسه با کنترل منفی و در تست کاسپاز ۳ در مقایسه با کنترل مثبت داشته است و از این رو محتمل است که توانایی بیشتری در القاء مسیر داخلی آپوپتوز در مقایسه با گیاه سیبری داشته باشد. با توجه به نتایج حاصله می توان نتیجه گرفت که مسیر القاء مرگ توسط این دو گیاه درون سلولی و میتوکندریایی می باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از دانشگاه علوم پزشکی شیراز به خاطر حمایت مالی از این طرح قدردانی می شود (گرنه شماره: ۹۴-۰۱-۰۷-۰۴۷۴).

References

1. Hashim D, Boffetta P, La Vecchia C, Rota M,

Iran. J Essen Oil Res. 2002;14(2):122-3.

16. Bora KS, Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharma Biol.* 2011;49(1):101-9.

17. 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.

18. Akrouit A, Gonzalez LA, El Jani H, Madrid PC. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. *Food Chem Toxicol* 2011;49(2):342-7.

19. Kim MJ, Kim DH, Na HK, Oh TY, Shin CY, Surh YJ. Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human gastric cancer (AGS) cells. *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology.* 2005;24(4).

20. Ghorbani-Ghouzhdhi H, Sahraroo A. Composition of Essential Oil of *Artemisia sieberi* and *Artemisia khorasanica* from Iran. *World Appl Sci J.* 2008;5(3):363-66.

21. Chen HH, Zhou HJ, Fang X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives in vitro. *Pharmacol Res.* 2003;48(3):231-6.

22. Amat N, Upur H, Blažeković B. In vivo hepatoprotective activity of the aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. *J Ethnopharmacol.* 2010;131(2):478-84.

23. Wu G-D, Zhou H-J, Wu X-H. Apoptosis of human umbilical vein endothelial cells induced by artesunate. *Vasc Pharmacol.* 2004;41(6):205-12.

24. Asghar MN, Khan IU, Bano N. In vitro antioxidant and radical-scavenging capacities of *Citrullus colocynthes* (L) and *Artemisia absinthium* extracts using promethazine hydrochloride radical cation and contemporary assays. *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos.* 2011;17(5):481-94.

25. Rombauts K, Heyerick A, Consortium C-C. *Artemisia annua*. CAM-Cancer; 2011.

26. Emami SA, Vahdati-Mashhadian N, Vosough R, Oghazian MB. The anticancer activity of five species of *Artemisia* on Hep2 and HepG2 cell lines. *Pharmacologyonline.* 2009;3:327-39.

27. Gavanji S, Bakhtari A, Famurewa AC, Othman EM. Cytotoxic Activity of Herbal Medicines as Assessed in Vitro: A Review. *Chem Biodivers.* 2023;20(2):e202201098.

28. Honeywell R, Yazadah K, Giovannetti E, Losekoot N, Smit E, Walraven M, et al. Simple and selective method for the determination of various tyrosine kinase inhibitors used in the clinical setting by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatography B.* 2010;878(15):1059-68.

29. Buommino E, Baroni A, Canozo N, Petrazzuolo M, Nicoletti R, Voza A, et al. Artemisinin reduces human melanoma cell migration by down-regulating alpha V beta 3 integrin and reducing metalloproteinase 2 production. *Invest New Drugs.* 2009;27(5):412-8.