



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

مریم زارع منگابادی: گروه زیست شناسی، سلولی-تکون، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
*مونا فرهادی: استادیار، گروه زیست شناسی، سلولی-تکون، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران. (مؤنوسنده مسئول) monafarhadi@yahoo.com
پروین تراب زاده خراسانی: استادیار، گروه زیست شناسی، سلولی-تکون، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، کرج، ایران
محمدحسین هدایتی: گروه کنترل کیفیت، موسسه پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

کلیدواژه‌ها

آرتیمیزیا سبیری،
آرتیمیزیا اسکوپاریا،
پاکلیتاکسل، آپوپتوز،
رده سلول سرطانی SK-BR-3

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲

تاریخ پذیرش: ۹۷/۶/۲۵

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 آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا سبیری و آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا سبیری ۷/۵-۱۵-۳۰ و ۶۰ میلی گرم/میلی لیتر و آرتیمیزیا اسکوپاریا ۱۶-۳۱-۰/۶۳-۰/۲۵ و ۱/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر و داروی پاکلیتاکسل 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 آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا اسکوپاریا ۰/۳۵-۰/۳۱ و ۰/۵۵ میلی گرم/میلی لیتر و آرتیمیزیا سبیری 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 آرتیمیزیا سبیری با ۳/۵۳ درصد و آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا سبیری دارای اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) با گروه تاکسول و عصاره آرتیمیزیا اسکوپاریا بود.

نتیجه‌گیری: عصاره الکلی آرتیمیزیا اسکوپاریا با بررسی‌های بیشتر دارای پتانسیل درمانی به عنوان داروی سرطان سینه می‌باشد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: گزارش نشده است.

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.

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 (*Corresponding 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 μ M) 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 (μ M). 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 ۴۷/۴۸-۱/۸ 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 شیمی درمانی و تراریخت‌های مغز استخوان (Autologous) می‌باشد (۳). همچنین یکی از مؤثرترین روش‌های درمان سرطان، شیمی درمانی 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 شیمی درمانی 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 برنامه‌ریزی شده (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 آرتیمیزیاز 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 آرتیمیزین، 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 آرتیمیزیاز 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 آرتیمیزین 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 آرتیمیزیاز سبیری 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 آرتمیزیای سیبری با کد ۱۷۶ (IBRC P 1000274) و آرتمیزیای اسکوپاریا با کد ۳۱۹ (1000525 IBRC P) 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 سرسنگی 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 CO₂ 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 آرتمیزیای اسکوپاریا ۳۱/۱۶-۶۳/۰-۰/۰ و ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره تام آرتمیزیای 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.

تعیین سمیت سلولی با استفاده از سنجش MTT: جهت بررسی سمیت سلولی و IC₅₀ ها، مقدار ۱۰^۴ × ۶ سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه استریل درب دار ریخته شد و هر کدام از پلیت‌ها جداگانه برای زمان‌های ۷۲-۴۸-۲۴ ساعت کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت و چسبیدن کامل سلول‌ها به کف پلیت‌ها،

سلول‌ها توسط غلظت‌های آرتمیزیای سیبری ۳۰/۷-۱۵/۵ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آرتمیزیای اسکوپاریا ۰-۱۶/۰-۶۳/۳۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و داروی تاکسول ۱۰۰ میکرومولار 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 الیزا ریدر (Austria GmbH TECAN Sunrise) با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و توسط نرم افزار Graphpad prism (۶/۰) مقدار IC₅₀ 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 $\text{mean} \pm \text{S.E.M}$ گزارش شد و سطح معنی‌داری $p < 0.05$ در نظر گرفته شد.

سنجش آپوپتوز با استفاده از کیت PI Annexin 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 ایده‌آل قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت تیمار با آرتمیزیای سیبری با غلظت ۳۴/۱۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و آرتمیزیای اسکوپاریا با غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و پاکلیتاکسل با غلظت ۰/۴۸۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر انجام شد، پس از اضافه شدن AneexinV & PI رنگ‌ها توسط دستگاه فلوسیتومتری خوانده شد.

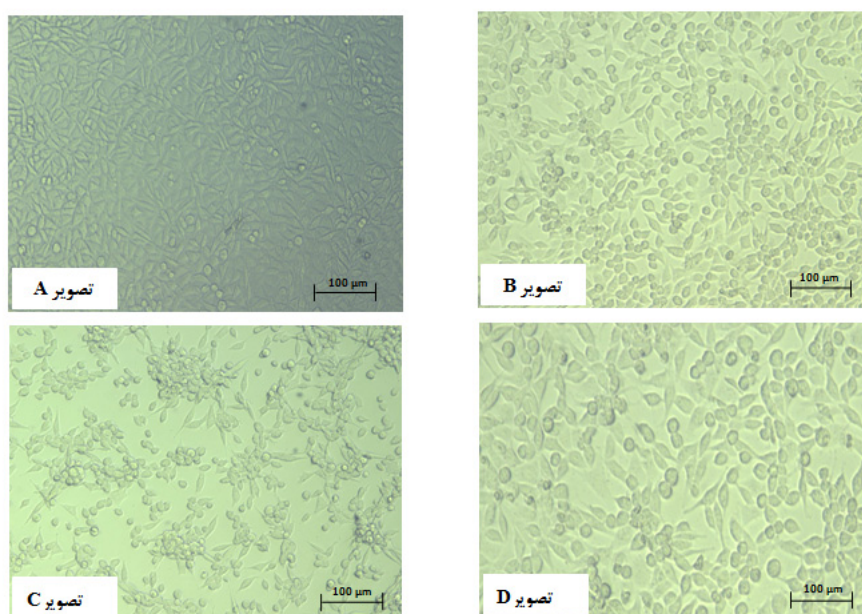
یافته‌ها

نتایج بررسی مورفولوژی: شکل ۱ نتایج مورفولوژی رده سلولی SK-BR-3 را نشان می‌دهد. عصاره تام آرتمیزیای 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

سلول نشان ندادند بنابراین زمان ۲۴ ساعت زمان مناسب برای سنجش بعدی در نظر گرفته شد. غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر آرتیمیزیا سبیری و غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر آرتیمیزیا اسکوپاریا در مقایسه با غلظت ۱۰۰ میکرو مولار (۰/۰۸۵۴) میلی گرم/میلی لیتر) پاکلیتاکسل باعث مهار معنی دار 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

حیاتی در رده سلولی مذکور با غلظت های مختلف از دو عصاره گیاهی در مقایسه با داروی پاکلیتاکسل در زمان های 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 ۲۱/۰۹-۳۶/۲۸ و ۵۶/۷۴ میکرو مولار، آرتیمیزیا سبیری ۱۸-۲۸/۰۲ و ۳۴/۱۴ میلی گرم بر میلی لیتر و آرتیمیزیا اسکوپاریا ۰/۳۱-۰/۳۵ و ۰/۵۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. از آنجا که عصاره ها در زمان ۴۸ و ۷۲ ساعت کاهش معنی داری در میزان مرگ



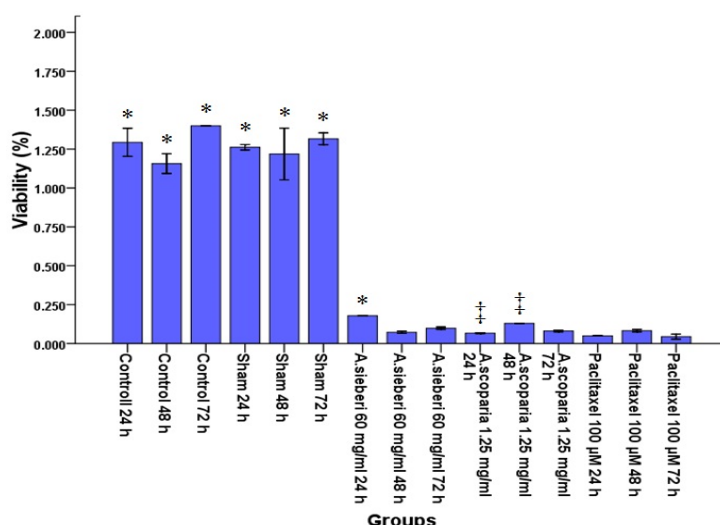
شکل ۱- سلول های SK-BR-3 کنترل و تحت تیمار در مدت زمان ۲۴ ساعت با میکروسکوپ اینورت با بزرگنمایی 10X

تصویر A: سلول زنده SK-BR-3 پس از ۲۴ ساعت کشت سلولی (کنترل). تصویر B: سلول SK-BR-3 تحت تیمار آرتیمیزیا سبیری با غلظت 30 میلی گرم بر میلی لیتر. تصویر C: سلول SK-BR-3 تحت تیمار آرتیمیزیا 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

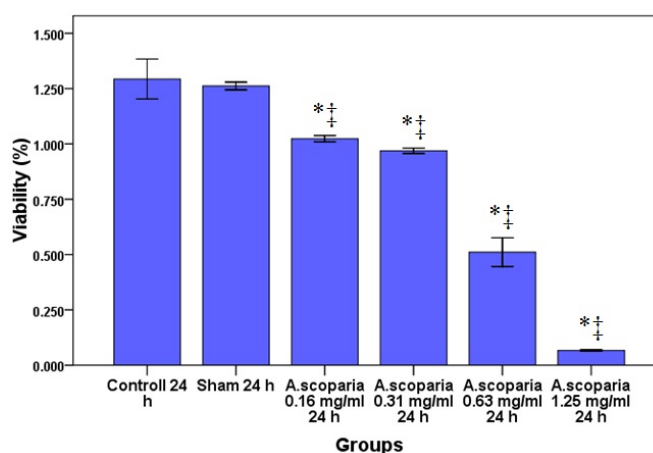
جدول ۱- میانگین سلول های زنده در غلظت ها و گروه های مختلف نسبت به پاکلیتاکسل

توان حیاتی (درصد)	توان حیاتی (درصد)	توان حیاتی (درصد)	گروه ها
در ۷۲ ساعت	در ۴۸ ساعت	در ۲۴ ساعت	متغیر
$۱/۰ \pm ۴۰۰/۰۰۰$	$۱/۰ \pm ۱۵۶/۰۶۳$	$۱/۰ \pm ۲۹۳/۰۹۰$	کنترل
$۱/۰ \pm ۳۱۶/۰۳۸$	$۱/۰ \pm ۲۱۸/۱۶۶$	$۱/۰ \pm ۲۶۲/۰۱۷$	شم
$۱/۰ \pm ۸۲/۰۰۹$	$۰/۰ \pm ۹۹۰/۰۰۶$	$۱/۰ \pm ۱۶۶/۰۰۱$	<i>A.sieberi</i> 7.5 میلی گرم بر میلی لیتر
$۰/۰ \pm ۹۷۲/۰۱۰$	$۰/۰ \pm ۸۴۸/۰۱۴$	$۱/۰ \pm ۱۰۹/۰۰۵$	<i>A.sieberi</i> 15 میلی گرم بر میلی لیتر
$۰/۰ \pm ۱۳۶/۰۷۳$	$۰/۰ \pm ۵۶۹/۰۵۲$	$۰/۰ \pm ۹۳۳/۰۲۵$	<i>A.sieberi</i> 30 میلی گرم بر میلی لیتر
$۰/۰ \pm ۰۹۸/۰۰۷$	$۰/۰ \pm ۰۷۲/۰۰۷$	$۰/۰ \pm ۱۷۹/۰۰۲$	<i>A.sieberi</i> 60 میلی گرم بر میلی لیتر
$۱/۰ \pm ۱۹۴/۰۱۶$	$۱/۰ \pm ۰۹۵/۰۰۳$	$۱/۰ \pm ۰۳۳/۰۱۴$	<i>A.scoparia</i> 0.16 میلی گرم بر میلی لیتر
$۱/۰ \pm ۰۱۰/۰۰۷$	$۱/۰ \pm ۰۴۳/۰۰۱$	$۰/۰ \pm ۰۹۶۹/۰۱۲$	<i>A.scoparia</i> 0.31 میلی گرم بر میلی لیتر
$۰/۰ \pm ۰۶۹۵/۰۱۹$	$۰/۰ \pm ۰۷۹۶/۰۱۳$	$۰/۰ \pm ۰۵۱۱/۰۶۵$	<i>A.scoparia</i> 0.63 میلی گرم بر میلی لیتر
$۰/۰ \pm ۰۸۰/۰۰۶$	$۰/۰ \pm ۱۲۹/۰۰۱$	$۰/۰ \pm ۰۶۶/۰۰۳$	<i>A.scoparia</i> 1.25 میلی گرم بر میلی لیتر
$۰/۰ \pm ۰۴۴/۰۱۶$	$۰/۰ \pm ۰۸۲/۰۰۸$	$۰/۰ \pm ۰۴۹/۰۰۰$	Paclitaxel 100 میکرو مولار

*اختلاف معنا دار غلظت های 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.



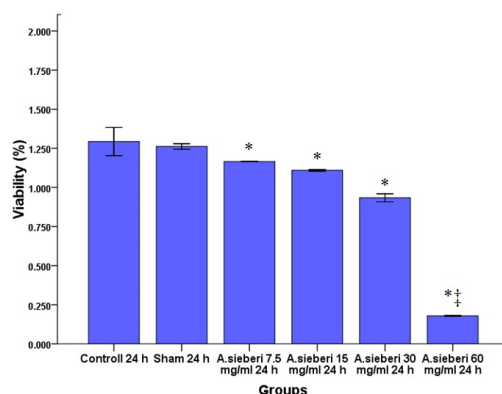
نمودار ۲- نمودار مقایسه غلظت های اسکوپاریا باهم

درصد سلول های زنده با تیمار غلظت های متفاوت آرتمیزیاسکوپاریا در تست MTT پس از ۲۴ ساعت. * اختلاف معنادار با گروه Sham با دوز مشابه؛ † اختلاف معنادار با گروه کنترل در زمان مشابه.

سلولی وابسته به غلظت بود و عدم وابستگی به زمان داشتند. به طوریکه فقط پس از ۲۴ ساعت با افزایش غلظت توان حیاتی به طور معنی داری ($p < 0.001$) کاهش یافت (نمودار ۱ و جدول ۱).

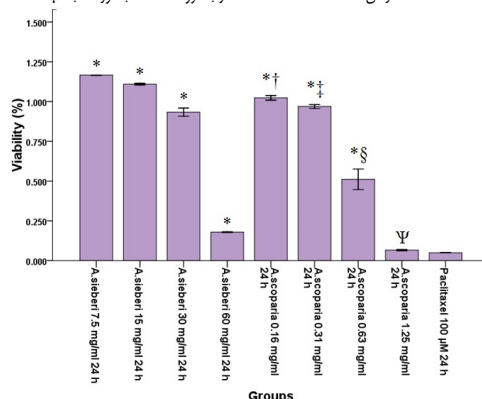
نتایج سنجش Aneexin V & PI: این نتایج نشان داد که عصاره ها و پاکلیتاکسل عامل القای آپتوز سلولی بوده اند (شکل ۲) و درصد آپتوز با Paclitaxel ۵۱/۱۳٪ و بدون نکروز بود و عصاره الکلی *A.scoparia* با آپتوز ۴۱/۷۱٪ و نکروز کمتر از ۰/۰۱٪ مشاهده گردید، همچنین عصاره الکلی *A.sieberi* عامل القای آپتوز پس ۳/۵۳٪ و نکروز کمتر از ۰/۱۵٪ در رده سلولی SK-BR-3 بودند (نمودار ۵) (شکل ۳).

غلظت عصاره ها سمیت و مهار رشد افزایش معنی دار نشان داد ($p < 0.001$)، ($p = 0.001$) (نمودار ۲ و ۳). همچنین عصاره آرتمیزیاسکوپاریا با غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر، ۹۰ تا ۹۵٪ سمیت داشت و عصاره آرتمیزیاسیبری با غلظت ۶۰ میلی گرم بر میلی لیتر، ۸۵٪ سمیت ایجاد کرد (نمودار ۴-۱)؛ و اختلاف بین دو عصاره نیز پس از ۲۴ ساعت اختلاف معنی دار ($p < 0.001$) بود (نمودار ۴) و غلظت ۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر عصاره آرتمیزیاسکوپاریا مشابه غلظت ۱۰۰ میکرو مولار پاکلیتاکسل توانست موجب سمیت و مرگ سلول های سرطانی به طور معنی دار ($p = 0.001$) گردد (نمودار ۴). نتایج نشان داد که مرگ



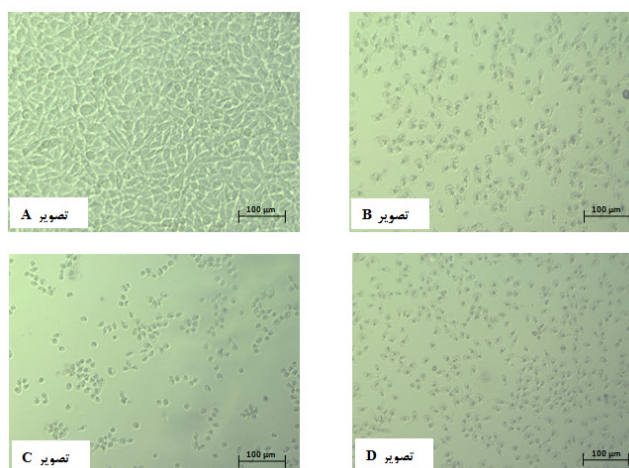
نمودار ۳- نمودار مقایسه غلظت های سبیری باهمدیگر

درصد حیات سلول ها در تیمار غلظت های متفاوت آرتیمیزیا سبیری در تست 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 گروه های *A.sieberi* Paclitaxel 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؛ ¶ اختلاف معنادار با گروه *A.sieberi* غلظت 60 در زمان مشابه.



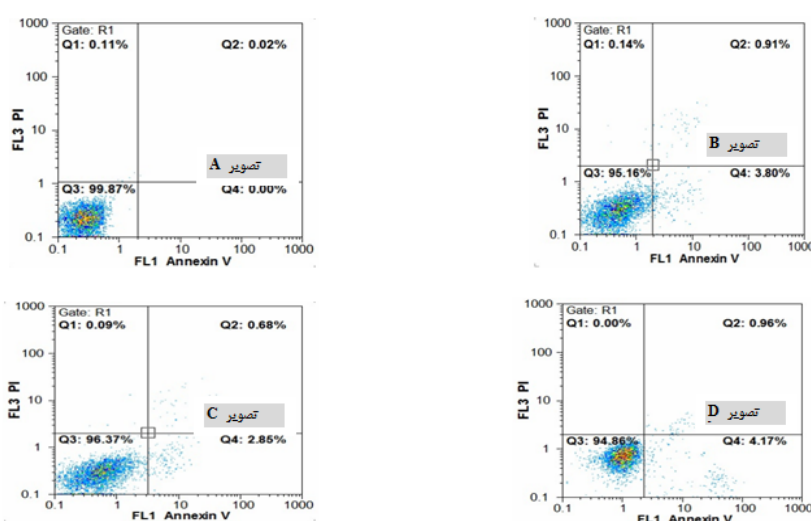
شکل ۲- سلول های SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت های به دست آمده از تست MTT در گروه تجربی و کنترل.

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 آرتیمیزیا اسکوپاریا پس از ۲۴ ساعت. تصویر C: شکل سلول های SK-BR-3 تحت تیمار با غلظت 34.14 میلی گرم بر میلی لیتر آرتیمیزیا سبیری 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 نتیجه گیری

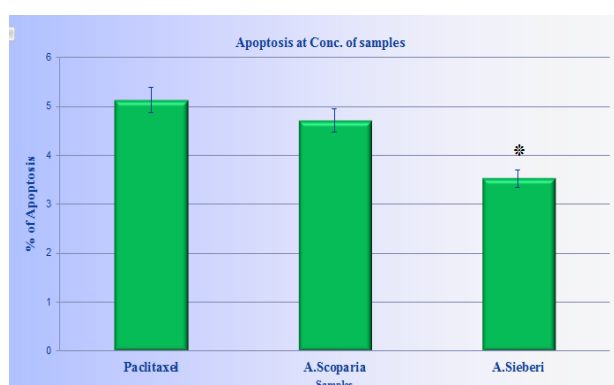
ایران این بیماری با میانگین سنی ۴۷/۴۸-۱/۸ سال است و نسبت به کشورهای توسعه یافته یک دهه جوان تر شده است (۲). درمان های کنونی در بسیاری

سرطان سینه یکی از سرطان های شایع در بین زنان، به خصوص کشورهای غربی می باشد (۱). در میان زنان



شکل ۳- نتایج آزمون Aneexin V و رنگ PI:

تصویر A: گروه کنترل پس از ۲۴ ساعت بدون تیمار در آزمایش Aneexin V - رنگ PI و شمارش سلول‌های سرطانی در هر فاز توسط دستگاه فلوسایتمتری. تصویر B: گروه تیمار آرتمیاز اسکوپاریا با غلظت 0.55 پس از ۲۴ ساعت در آزمایش Aneexin V - رنگ PI و شمارش سلول‌های سرطانی در هر فاز توسط دستگاه فلوسایتمتری. تصویر C: گروه تیمار آرتمیاز سیبری با غلظت 34.14 میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت در آزمایش Aneexin V - رنگ PI و شمارش سلول‌های سرطانی در هر فاز توسط دستگاه فلوسایتمتری. تصویر D: گروه تیمار پاکلیتاکسل با غلظت 0.0484 میلی گرم بر میلی لیتر پس از ۲۴ ساعت در آزمایش Aneexin V - رنگ PI و شمارش سلول‌های سرطانی در هر فاز توسط دستگاه فلوسایتمتری.



نمودار ۵- نمودار آزمون PI & Aneexin V

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

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/میلی لیتر و سرطان رحم (HaLa) با IC_{50} ۹۰ میکروگرم/میلی لیتر داشته است همچنین *absinthium*

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 آرتمیاز دارای اثرات ضد سرطانی در مدل حیوانی هستند (۱۷، ۲۰). محققان در سال ۲۰۱۳ با استفاده از عصاره متانولی شش گونه آرتمیزیای ترکیه‌ای (*-vulgaris* -*santonium* -*campestris* -*scoparia* -*arborescens* *absinthium*) به بررسی اثر سمیت روی چند رده سلولی شامل رده

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 میلی گرم/میلی لیتر و آرتمیزیا سبیری در محدوده غلظت‌های ۶۰ الی ۷/۵ میلی گرم/میلی لیتر، به ترتیب با افزایش غلظت عصاره اتانولی، افزایش سمیت 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 سبیری 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، بورنول، پیرپیتون و گاما تیرپنین و آلفا و بتا تیجون و کاپیلن و کاپیلین، ۱ و ۸ سیننول 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

A. (افسنطین) بیشترین تأثیر را با IC_{50} 270 میکروگرم/میلی لیتر 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 میلی گرم/میلی لیتر نسبت به آرتمیزیا سبیری با غلظت ۶۰ میلی گرم/میلی لیتر سمیت بیشتری دارد. از آنجا که نشان داده شده اسکوپاریا ترکیب اسکوالن و بتا آمیزین و آرتمیزینین بیشتری نسبت به سبیری دارد به نظر می‌رسد اختلاف سمیت به دلیل وجود این ترکیبات باشد (۲۲، ۲۳). همچنین می‌تواند این اختلاف مقدار IC_{50} آرتمیزیا اسکوپاریا 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 سبیری 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/میلی لیتر 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 سبیری با IC_{50} ۲۸/۰۲ میلی گرم/میلی لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا با IC_{50} 0.35 میلی گرم/میلی لیتر 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 سبیری در غلظت ۶۰ میلی گرم/میلی لیتر و آرتمیزیا اسکوپاریا در غلظت ۱/۲۵ میلی گرم/میلی لیتر 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

- 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

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 آرتیمیزیا 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 آرتیمیزیا 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 SKBR3 و MCF7 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 آرتیمیزین 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,

- Alternat Med; 2013. 2013.
19. Blancafort A, Giró-Perafita A, Oliveras G, Palomeras S, Turrado C, Campuzano Ó, 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.