[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021]

کومش- جلد ۲۳، شماره ۲ (پیاپی ۸۲)، فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰

ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و سیتوتوکسیتی عصاره هیدروالکلی گیاه Perovskia abrotanoides در سلول‌های MKN45 سرطان معده

مهسا ایرجی [۱](M.Sc)، ملیکا صادق [۱](M.D)، علی خالقیان [۲*](Ph.D)

۱- کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

۲- گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، سمنان، ایران

*نویسنده مسئول، تلفن: ۰۹۱۲۲۷۳۷۰۷۵ khaleghian.ali@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/٤/۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۶/۲۳

چکیده

هدف: سرطان معده، چهارمین سرطان شایع در جهان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان می‌باشد. با توجه این‌که درمان‌های موجود برای آن، در عین هزینه و عوارض بالا، اثربخشی کاملی از خود نشان نداده‌اند. با تکیه بر طب سنتی و عنایت به فعالیت آنتی‌اکسیدانی گیاه دارویی Provskia abrotanoides، این مطالعه، با هدف بررسی تاثیر عصاره‌ی هیدروالکلی این گیاه در بهبود سرطان معده، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه‌ی تجربی، گیاه Perovskia abrotanoides، جمع‌آوری ، خشک و با حلال‌های آب-اتیل استات-متانل (۱۰-۶۰-۳۰) عصاره‌گیری شد. رده‌ی سلول سرطانی آدنوکارسینومای معده‌ی انسانی MKN45 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد. میزان سمیت داروی گیاهی بر سلول‌های سرطانی MKN45 با استفاده از تست MTT، بررسی شد. سنجش پتانسیل آنتی‌اکسیدانی عصاره با استفاده از تست FRAP (Ferric reducing ability of power) و DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrate) انجام شد. در ادامه کار برای بررسی اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر مرگ سلولی، بررسی مورفولوژی سلول‌ها و بررسی قدرت تهاجم سلول‌ها پرداخته شد.

یافته‌ها: نتایج تحلیل داده‌ها با کمک آزمون آماری مجذور کای نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، با ارتباط معنی‌داری، درصد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده‌ی MKN45، کاهش یافته بود ($P<۰/۰۰۱$). هم‌چنین مشخص شد که عصاره هیدروالکلی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی خوبی را در مقایسه با ویتامین C از خود نشان می‌دهد. در نهایت دریافتیم که دوز موثر (IC50) این عصاره برای سلول‌های MKN45 می‌تواند دوز ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر باشدکه برای تست‌های بعدی در جهت یافتن مسیر احتمالی اثر عصاره بر روند مرگ برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) و بررسی قدرت تهاجم و تغییرات مورفولوژی سلول‌ها از این دوز استفاده شده است.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه Perovskia abrotanoides، اثر کشندگی بالایی بر سلول‌های سرطانی معده (MKN45) داشت؛ این درصد کشندگی، با گذر زمان و با افزایش غلظت، افزایش یافته بود و در غلظت IC50 خود باعث مهار تهاجم سلولی و القای آپوپتوز در سلول‌های MKN45 شده است.

واژه‌های کلیدی: Perovskia Abrotanoides، سرطان‌های معده، آپوپتوز، آنتی‌اکسیدان‌ها

مقدمه

سرطان معده (Gastric Cancer) چهارمین سرطان شایع در جهان و دومین عامل مرگ ناشی از سرطان می‌باشد [۱] درمان اصلی سرطان معده در مراحل اولیه جراحی است و رادیوتراپی و شیمی‌درمانی در صورت نیاز به صورت تکمیلی انجام می‌شوند. اما معمولاً به علت عوارض و هزینه‌های بالا با نتایج خوبی همراه نبوده است [۲]. یکی از درمان‌هایی که در مورد اثربخشی آن بر سرطان‌ها و مخصوصاً سرطان معده تاکید شده است استفاده از اثرات گیاهان دارویی گوناگون بر اساس اصول طب سنتی است [۳]. قرن‌ها، گیاهان منبع اصلی کشف داروهای مختلف بوده‌اند که از داروهای ضد سرطان حاصل از گیاهان می‌توان به وین‌بلاستین، وین‌کریستین، تاکزول و کامپتوتسین اشاره کرد [۴،۵] به علت بروز مشکلاتی در درمان سرطان‌ها مانند ایجاد مقاومت روزافزون نسبت به داروهای مختلف سنتتیک و کاهش تاثیر در اثر کاربرد مداوم داروها باعث شده است که استفاده از داروهای گیاهی راه مفیدی به نظر برسد. به عبارت دیگر استفاده‌ی زیاد و نامناسب و روزافزون داروهای ضد التهاب و ضد درد سنتتیک، موجب

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

ایجاد عوارض جانبی، نوعی اعتیاد به این داروها و مقاومت‌های دارویی در بین بیماران شده است، لذا با توجه به موارد ذکر شده، داروهای گیاهی می‌توانند انتخاب مناسبی برای درمان باشند؛ این داروها دارای منشا طبیعی، پروسه‌ی تولید آسان و مواد اولیه‌ی قابل دسترس و ارزانی می‌باشند ولی خواص ویژه‌ی درمانی که در طب سنتی و عامیانه برای هر یک از گیاهان دارویی قائل شده‌اند بایستی در معرض آزمایش گذاشته و صحت و سقم ادعاهای مذکور، مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. در این میان، طب گیاهی، به عنوان رایج‌ترین شاخه‌ی طب جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد و گیاهان، بخش مهمی از عوامل درمان بیماری‌ها را شامل می‌شوند [۶].

در درمان سرطان معده هم استفاده از گیاهان دارویی موضوع بسیاری از مطالعات ضد و نقیض در پزشکی بوده و هست. امروزه با وجود پیشرفت‌های فراوان در صنعت دارو، نه تنها از میزان کشت و تولید گیاهان دارویی کاسته نشده، بلکه تولید و مصرف آن‌ها افزایش چشم‌گیری نیز داشته است، به‌طوری‌که طبق گزارشات سازمان بهداشت جهانی (WHO) امروزه حجم زیادی از مردم جهان برای درمان مشکلات بالینی خود، از گیاهان دارویی استفاده می‌کنند [۷].

خانواده گیاه دارویی Provskia، جزء تیره‌ی نعناع (Lamiaceae) است که داری پنج‌گونه، مثل P.artriplicifolia، P.hybrida و P.abrotanoide است که بومیان آن را با نام‌های دومو، برازمبل و یا گوره می‌شناسند؛ میزان ترکیبات فلاونوئیدی، فنلی و آنتوسیانینی در اندام‌های این گیاه بسیار غنی است و در مناطق مرتفع به میزان این ترکیبات پراهمیت افزوده می‌شود. از این گیاه، برای تسکین دردهای روماتیسمی، رفع التهاب، لیشمانیوز، دفع انگل و ضد عفونی‌کننده استفاده می‌شود [۸]. Geryani و همکاران نشان دادند که، ترکیب myrcene موجود در ماده‌ی موثره گیاه دارویی Provskia abrotanoides، به آن خاصیت ضد عفونی‌کنندگی، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدانی می‌دهد. هم‌چنین آن‌ها در این مطالعه بیان کردند که ترکیب terpinene موجود در این گیاه، دارای خواص ضد توموری مناسبی می‌باشد [۸]. Soni و همکاران اثرات بیولوژیک گیاه Perovskia abrotanoides را مورد بررسی قرار دادند؛ نتایج این مطالعه نشان داد که اثرات آنتی‌اکسیدانی این گیاه با ایجاد اثر ضد رادیکال‌های آزاد اکسیژن، می‌تواند کارایی بالایی در پزشکی داشته باشد [۹]. اثرات آنتی‌اکسیدانی و در نتیجه، ضد سرطانی عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، در مطالعات Nigusse و همکاران در سال ۲۰۱۶، Zaker [۱۰] و همکاران در سال ۲۰۱۵ [۱۱] بررسی و تایید شده است.

نتایج مطالعه Hu و همکاران نشان داد که ترکیب cryptotanshinone استخراج شده از این گیاه، با اثر بر سلول‌های کبدی و نیز، سایر سلول‌های دستگاه گوارشی، مانع از رشد سلول‌های کارسینومای معده‌ی انسانی و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی MKN45 می‌شوند [۱۲]. هم‌چنین، Liang و همکارانش نیز، اثر cryptotanshinone بر سلول‌های سرطانی معده، شامل سلول‌های SGC7901، MGC803، AGS و به‌ویژه، سلول‌های سرطانی MKN45 را مورد تایید قرار داده بودند [۱۳].

بنابراین، با توجه به شیوع بالای سرطان معده در جهان، به‌ویژه ایران و این‌که درمان‌های موجود برای این بیماری، در عین هزینه و عوارض بالا، اثربخشی کاملی از خود نشان نداده‌اند [۱۵،۱۴] و با تکیه بر طب گیاهی و عنایت به غنی بودن این گیاه از پلی‌فنل‌ها و ترپنوئیدهای فعال زیستی که در کنار هم و یا به‌طور جداگانه ویژگی‌های متفاوتی را از خود نشان می‌دهند که در فرایندهایی مثل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آپوپتوز، تاثیر بر مهاجرت سلولی که قسمتی از شاخص‌های مهم یک ترکیب دارویی مورد استفاده در درمان سرطان معده است، این مطالعه گیاه با هدف بررسی تاثیر عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه دارویی Provskia abrotanoides، در بهبود سرطان معده، طرح‌ریزی و انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی ابتدا گیاه بومی Perovskia abrotanoides با هماهنگی قبلی از منطقه‌ی رستنی آن از منطقه‌ی ییلاقی پرور شهرستان سمنان در فصل بهار، با مشخصات جغرافیایی (Iran 34° 18' 46.0" N 46° 11' 21.4" E) جمع‌آوری شده پس از تایید توسط گیاه‌شناس، به آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان منتقل شد. گیاه مربوطه در شرایط مطلوب و ایده‌آل (سایه، درجه‌ی حرارت اتاق و رطوبت مناسب)، خشک شد. جهت تهیه‌ی عصاره‌ی هیدروالکلی با نسبت درصد حلال اتیل استات/متانل/آب به‌صورت ۱۰/۳۰/۶۰، از دستگاه سوکسله استفاده گردید [۸،۴]. ۱۰۰گرم از اندام هوایی گیاه Perovskia abrotanoides پودر و آسیاب شد، و در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر حلال حل شد. سپس در ۳۰ تا ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت دو ساعت حرارت داده شده و عصاره‌ی هیدروالکلی تهیه شد. در ادامه، آب اضافی عصاره به کمک دستگاه روتاری، تغلیظ و عصاره‌ها در ظرف‌های تیره در حرارت مناسب جهت انجام آزمایش نگهداری شدند.

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

کشت سلول. رده‌ی سلول سرطانی آدنوکارسینومای معده‌ی انسانی MKN45 از بانک سلولی انستیتوپاستور تهیه شد. سلول‌ها در محیط ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، با رطوبت ۵٪ CO2 نگهداری شدند. محیط کشت سلولی، HEPES-bufred RPMI 1640 بود که با ۱۰٪ سرم گوساله، گلوتامین و آنتی‌بیوتیک غنی‌سازی شد [۱۶]. سلول‌ها جهت ارزیابی حیاتی در پلیت ۹۶ خانه‌ی مسطح (۱۰۴×۱ سلول در هر خانه)، انکوبه شدند. به سلول‌ها، ۲۴ ساعت استراحت داده شده و سپس با عصاره‌ی گیاهی تیمار شدند.

بررسی سمیت سلولی. عصاره‌های تهیه‌شده با غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به صورت محلول جهت در معرض قراردادن سلول‌های کشت‌داده‌شده استفاده شدند [۸] بررسی میزان سمیت داروی گیاهی بر سلول‌های سرطانی MKN45 با استفاده از تست MTT (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) استفاده شد. برای ارزیابی سمیت، از احیای وابسته به آنزیم دهیدروژناز میتوکندریایی رنگ MTT به ترکیب فورمازان به‌وسیله‌ی میکروپلیت ریدر اتوماتیک در ۵۷۰ نانومتر استفاده شد [۱۷].

سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی. برای انجام تست‌های آنتی‌اکسیدانی ابتدا غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی و ویتامین C (VitC) (کنترل مثبت، آنتی‌اکسیدان استاندارد) را در حلال مورد نیاز تهیه شد و از دو تست FRAP (Ferric reducing Antioxidant power) و DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrate) که از تست‌های استاندارد سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی است استفاده شد [۱۸].

تست DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate):

ترکیب DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با رنگ بنفش و دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۲۰– ۵۱۵ نانومتر است. رادیکال DPPH وقتی با آنتی‌اکسیدان‌هایی که دهنده هیدروژن می‌باشند واکنش می‌دهد رنگ محلول از بنفش تیره به زرد روشن تبدیل شده و در نتیجه میزان جذب کاهش می‌یابد و شدت آن با دستگاه طیف‌سنجی قابل اندازه‌گیری است. اثر آنتی‌اکسیدانی با از بین رفتن رادیکال DPPH در نمونه متناسب است [۲۰،۱۹].

برای این سنجش مقدار ۵۰ ماکرولیتر از غلظت‌های مختلف هر یک از نمونه‌ها را با ۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۰۴٪ از DPPH ترکیب شد و پس از مخلوط کردن برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی قرار داده و در نهایت جذب نوری هر یک از نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر بررسی شد.

تست FRAP (Ferric reducing Antioxidant Power):

این روش محتوی کلی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات سنجیده می‌شود که بر اساس احیای آهن سه ظرفیتی فریک (Fe^{3+}) توسط آنتی‌اکسیدان‌ها به آهن دو ظرفیتی فرو (Fe^{2+}) آبی رنگ در محیط اسیدی پایه‌گذاری شده است و تغییرات رنگ و در نتیجه تغییرات جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [۲۱].

یک میلی‌لیتر از هر غلظت را با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ترکیب کرده سپس ml ۲/۵ پتاسیم فری‌سیانید ۱٪ (۱۰ mg/ml) را اضافه کرده و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه کرده. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه ml ۲/۵ تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ را اضافه کرده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۳۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس ml ۲/۵ از محلول رویی برداشته در لوله دیگر ریخته و ml ۲/۵ آب مقطر اضافه شد. ml ۰/۵ کلرید آهن ۰/۱٪ را اضافه کرده و جذب با اسپکتروفتومتر در ۷۰۰nm بررسی شد.

بررسی مورفولوژی سلول‌ها. به منظور بررسی مورفولوژی سلول‌های MKN45 ابتدا سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت فلاسک‌های T25 کشت داده شدند سپس به منظور بررسی تغییرات مورفولوژی سلول‌های تیمارنشده و تیمارشده با غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (IC50) از عصاره برای زمان ۴۸ اعمال و از آن‌ها تصاویر تهیه شد.

بررسی آپوپتوز با رنگ‌آمیزی اکریدین ارنج/اتیدیوم بروماید (AO/EB) Ethidium Bromide/Acridin Orange:

از دیگر روش‌های بررسی مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) در سلول‌ها رنگ‌آمیزی سلول‌ها با اتیدیوم بروماید و اکریدین ارنج است. اکریدین ارنج (AO) رنگ حیاتی است که به DNA و RNA سلول‌های مرده و زنده متصل می‌شود و سلول را به رنگ سبز در می‌آورد. رنگ اتیدیوم بروماید (EB) وارد سلول‌هایی که یک‌پارچگی غشا خود را از دست داده‌اند شده و به سلول رنگ قرمز می‌دهد [۲۲].

سلول‌های MKN45 را در فلاسک‌های T25 کشت داده و بعد به حد نصاب رسیدن سلول‌ها برای زمان ۴۸ ساعت محیط کشت سلول‌ها یا محیط کشت حاوی غلظت۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (IC50) از عصاره هیدروالکلی تعویض شد. در زمان‌های ۴۸ ساعت پس از تیمار، سلول‌ها را به کمک تریپسین از کف جدا شد. برای تهیه هر کدام از رنگ‌های اتیدیوم برماید و اکریدین نارنجی، مقدار ۱۰۰ میکروگرم از رنگ را در ۱ میلی‌لیتر PBS ترکیب کرده و ترکیبی با نسبت حجمی یک به یک از هر دو رنگ تهیه شد. ۵۰ میکرولیتر از

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

سوسپانسیون سلولی که دارای ۴×۱۰^{۴} سلول است را با ۱ میکرولیتر از محلول رنگ AO/EB ترکیب شده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن را روی لام با میکروسکوپ فلوروسنت مشاهده شد. برای به دست آوردن میزان اعمال آپوپتوز در سلول‌ها حداقل ۱۰ میدان مختلف شمارش شد [۲۴،۲۳].

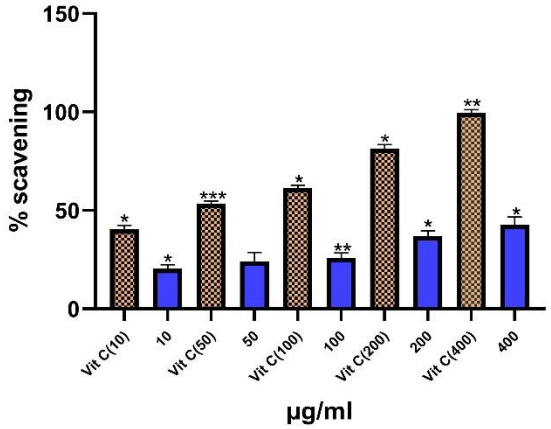
ارزیابی قدرت تهاجم سلول‌ها (Migration). قدرت تهاجم یا قدر ترمیم زخم توانایی در سلول‌ها است که به قدرت رشد و تکثیر سلول‌ها بستگی دارد. این توانایی در سلول‌های سرطانی می‌تواند روند بهبود را به تاخیر انداخته و موجب تکثیر و متاستاز سلول‌های سرطانی شود [۲۵]. در تست Migration که برای بررسی قدرت تهاجم سلول‌ها انجام می‌شود ابتدا سلول‌های MKN45 با تراکم سلولی ۱×۱۰^{۵} سلول در حجم ۱ml را در پلیت ۹۶ چاهکی کشت داده و بعد از رسیدن به تراکم ۸۰٪ در وسط هر یک از چاهک‌ها شیار ایجاد کرده و سپس با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (IC50) از عصاره هیدروالکلی و ۵-فلوئورویوراسیل در محیط کشت سلول‌ها را تیمار کرده و با تصویربرداری از سلول‌ها در زمان‌های مختلف میزان پر شدن شیار ارزیابی شد [۲۶].

بررسی‌های آماری. نتایج به‌دست آمده از آزمون‌های مختلف با استفاده از نسخه بیست و دوم نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند. در این مطالعه، مقادیر p کم‌تر از ۰/۰۵ اختلاف آماری معنادار در نظر گرفته شد.

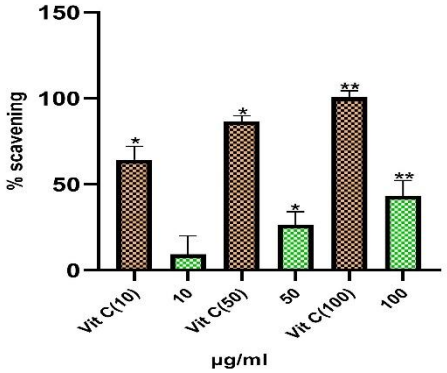
نتایج

نتایج حاصل از تست DPPH. برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی داروی گیاهی Perovskia abrotanoides، اثرات آنتی‌اکسیدانی دوزهای ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این گیاه با دوز مختلف از ویتامین C (به‌عنوان کنترل مثبت)، مورد مقایسه قرار گرفت؛ نتایج تحلیل داده‌ها با کمک آزمون آماری مجذور کای نشان داد که با تمام غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، با ارتباط معنی‌داری، نسبت به خواص آنتی‌اکسیدانی دوزهای متناظر از ویتامین C، رشد افزایشی مناسبی را نشان داد ($P<۰/۰۰۱$) (شکل ۱).

نتایج تست FARP. آنتی‌اکسیدان‌های غیر آنزیمی مانند آسکوربیک اسید معمولاً اهداءکننده الکترون یعنی احیاکننده هستند. در واقع در این آزمایش ما هیچ رادیکال آزادی در محیط نداریم ولی میزان احیای معرف FRAP (FeCl3) توسط واکنش‌گرها سنجیده می‌شود [۲۶،۲۵]. برای عصاره هیدروالکلی غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و متناظر با آن از کنترل مثبت آسکوربیک اسید (VitC) غلظت‌های ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج حاصل از میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه با کمک تست آماری مجذور کای نشان می‌دهد که تفاوت معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی و کنترل آسکوربیک اسید در قدرت آنتی‌اکسیدانی وجود دارد. (شکل ۲)



شکل ۱. مقایسه‌ی خواص آنتی‌اکسیدانی دوزهای 10، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides و کنترل مثبت ویتامین c با غلظت های متناظر نسبت به دوز ۲ میلی‌لیتر محلول متانولی ۰/۰۰۴٪ DPPH

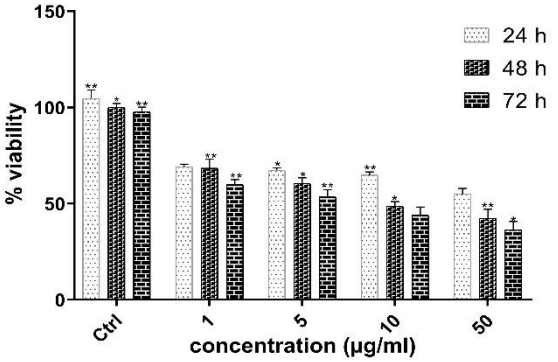


شکل ۲. مقایسه‌ی خواص آنتی‌اکسیدانی دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاهی Perovskia abrotanoides نسبت به دوز های متناظر از ویتامین C (به‌عنوان کنترل مثبت)

بررسی مرگ سلولی در سلول‌های MKN45. برای بررسی میزان سمیت داروی گیاهی Perovskia abrotanoides بر سلول‌های سرطانی MKN45، از تست MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide) استفاده شد؛ نتایج تحلیل داده‌ها با کمک آزمون آماری مجذور کای نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، با ارتباط معنی‌داری، درصد سلول‌های زنده‌ی

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

باقی‌مانده MKN45، کاهش یافته است ($P<۰/۰۰۱$)؛ به‌طوری که مطابق نتایج، ۷۲ ساعت پس از انجام مداخله، در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ی این گیاه، انحراف معیار ± میانگین درصد سلول‌های سرطانی زنده باقی‌مانده‌ی MKN45، به‌ترتیب، ۳/۴۶±۶۲/۳۱ درصد، ۱/۵۱±۵۵/۲۳ درصد، ۶/۶۳±۴۷/۵۷ درصد و ۱/۳۴±۴۰/۳۸ درصد شده بود. این موضوع، به‌وضوح در



شکل ۳ نشان داده شده است.

شکل ۳. توزیع میزان سمیت داروی گیاهی Perovskia abrotanoides بر سلول‌های سرطانی MKN45، به‌تفکیک تست MTT در چهار طیف زمانی بدو مطالعه، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مداخله: محور افقی، غلظت عصاره‌ی این گیاه (۱، ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و محور عمودی، درصد سلول‌های زنده‌ی باقی‌مانده‌ی سرطانی MKN45 را نشان می‌دهد. نتایج این آزمایش میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه است. در این آزمایش کنترل منفی سلول‌های تیمار نشده است.
*=P ≤ ۰/۰۵ **<=P۰/۰۱

تحلیل داده‌ها به‌کمک t زوجی نشان داد که میزان سمیت داروی گیاهی Perovskia abrotanoides بر سلول‌های سرطانی MKN45، در زمان بدو مطالعه با ۲۴ ساعت پس از مداخله ($P<۰/۰۰۱$)، ۲۴ ساعت پس از مداخله با ۴۸ ساعت پس از مداخله ($P<۰/۰۰۱$)، در ۴۸ ساعت پس از مداخله با ۷۲ ساعت پس از مداخله ($P<۰/۰۰۱$)، در ۲۴ ساعت پس از مداخله با ۷۲ ساعت پس از مداخله ($P<۰/۰۰۱$) و در زمان بدو مطالعه با ۷۲ ساعت پس از مداخله ($P<۰/۰۰۱$)، معنی‌دار بوده است؛ هم‌چنین نتایج نشان داد که در غلظت ۱۰ میکرگرم در میلی‌لیتر از عصاره هیدروالکلی در زمان ۲۴ ساعت ۲/۲۳±۶۵/۵۰، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت با ۴/۶۳±۴۷/۵۷ از میزان بقای سلول‌های MKN45 کاسته شده است. بنابراین می‌توان بیان کرد که با توجه نتایج به دست آمده و ترسیم نمودار خطی و بررسی رگرسیون و معادله خط مربوطه در غلظت ۱۰ طی ۴۸ ساعت تیمار با عصاره، کمیت ارزشمند IC50 در این رده سلولی به‌دست می‌آید که در مطالعات بعدی برای بررسی اثر عصاره بر کدام از ویژگی‌های زیستی استفاده می‌شود. هم‌چنین مشخص شد که درصد سلول‌های سرطانی زنده باقی‌مانده‌ی MKN45، به مرور زمان و با افزایش غلظت، با ارتباط معنی‌داری کاهش یافته است.

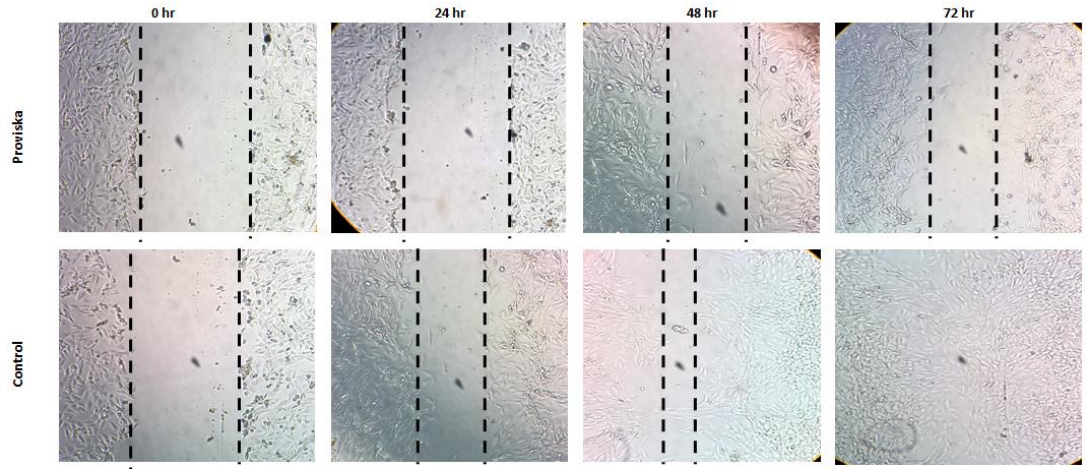
بررسی قدرت تهاجم سلول (Migration). همان‌طور که در تصاویر مشخص است در مقایسه با کنترل که سلول‌های تیمار نشده MKN45 هستند سلول‌ها نتوانستند از زمان صفر (زمان ایجاد شکاف) تا ۷۲ ساعت بعد شکاف ایجاد شده را ترمیم کنند و قدرت تهاجم و ترمیم زخم را از دست داده‌اند. (شکل ۴)

با توجه به شکل ۴، میزان Migration در سلول‌های سرطانی MKN45، در گروه کنترل، بیش‌تر از گروه مورد درمان بود و عصاره هیدروالکلی گیاه Perovskia abrotanoides در IC50 به دست آمده توانسته است تهاجم سلول‌های MKN45 را مهار کند.

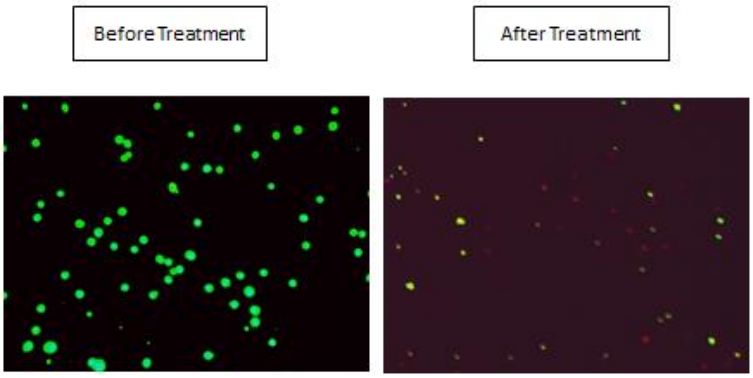
رنگ‌آمیزی اتیدیوم بروماید/اکریدین ارنج (ET/AO). همان‌طورکه در شکل۵ مشاهده می‌شود سلول‌های کنترل که با عصاره گیاه درمان نشده‌اند به میزان بسیار کمی دچار آپوپتوز شده‌اند (حدود ۲-۶٪) اما در مقابل سلول‌های MKN45 که با عصاره تیمار شده‌اند حدود ۵۶-۴۷٪ از سلول‌ها دچار آپوپتوز شده‌اند.

بررسی مورفولوژی سلول‌های MKN45. یکی از ساده‌ترین روش‌ها برای بررسی تاثیر درمان و میزان مرگ سلولی، بررسی مورفولوژی سلول‌ها است. همان‌طور که در طور که در شکل مشخص شده است سلول‌های MKN45 که با عصاره گیاه درمان نشده‌اند بعد از گذشت ۷۲ ساعت سلول‌ها ۱۰۰٪ کف پلیت را پوشانده‌اند و کاملاً شکل دوکی کشیده را نشان می‌دهند. اما بعد از درمان با عصاره گیاه سلول‌های کم‌تری در پلیت رشد کردند و سلول‌ها بعد از ۴۸ ساعت بیش‌تر به فرم چروکیده دیده می‌شوند که به دلیل متراکم شدن کروماتین است و کم‌تر به شکل دوکی دیده می‌شوند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت اکثر سلول‌ها دفرمه و از هم متلاشی شده هستند و غشاء مشخصی ندارند که از نشانه‌های سلول‌های آپوپتوتیک است. (شکل ۶)

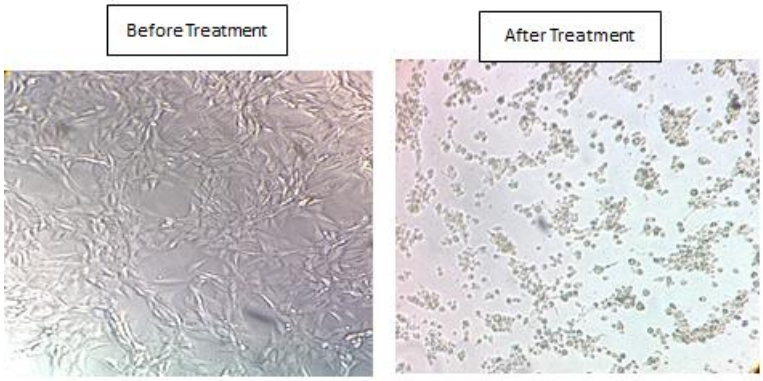
[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021



شکل ۴. تیمار سلول‌های MKN45 با دوز ۱۰µg/ml از عصاره هیدروالکلی و تصویر برداری از سلول‌ها در لحظه ایجاد شکاف (لحظه صفر) بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت.همانطور که در تصاویر مشخص است سلول‌های کنترل با گذشت ۷۲ ساعت توانستند کاملا شکاف ایجاد شده را ترمیم کنند، اما این اتفاق برای سلول‌ها درمان شده با عصاره هیدروالکلی گیاه رخ نداده است. تمام عکس‌ها با بزرگنمایی X40 گرفته شده است



شکل ۵. بررسی میزان آپوپتوز در سلول‌های MKN45 قبل و بعداز تیمار با دوز ۱۰µg/ml از عصاره هیدروالکلی. سلول‌هایی که با اکریدین ارنج به رنگ سبز دیده می‌شوند، سلول‌های زنده MKN45هستند، سلول‌هایی که کروماتین آنها فشره شده و در مراحل اولیه آپوپتوز هستند(Aerly apoptosis) با رنگ نارنجی مشخص می شوند و سلول‌هایMKN45 که با رنگ اتیدیوم بروماید در زیر میکروسکوپ فلوروسنت به رنگ قرمز دیده می‌شوند و نکروز شده‌اند. نشاندهنده سلولهایی است که در مراحل انتهایی آپوپتوز و در حال تبدیل شدن به اجسام آپوپتوتیک هستند(Late apoptosis). نتایج این آزمایش میانگین سه بار تکرار مستقل هر نمونه است. ($P\leq0.05$).



شکل ۶. بررسی مورفولوژی سلول‌های MKN45 قبل و بعد از تیمار با غلظت 10µg/ml از عصاره هیدروالکلی با بزرگنمایی X40

بحث و نتیجه‌گیری

تحلیل داده‌ها در این مطالعه نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، به شکل معنی‌داری، درصد سلول‌های زنده MKN45، کاهش یافته است؛ به‌عبارتی، عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، کشندگی چشم‌گیری بر سلول‌های سرطانی معده (MKN45) اعمال کرده است. از سویی، سمیت عصاره هیدروالکلی گیاه Perovskia abrotanoides بر سلول‌های سرطانی MKN45،

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021]

به صورت وابسته به زمان معنی‌دار بوده است؛ بنابراین می‌توان گفت که درصد سلول‌های سرطانی زنده باقی‌مانده‌ی MKN45، به مرور زمان و با افزایش غلظت، به طور معنی‌داری کاهش یافته است.

ایجاد سمیت عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، بر سلول‌های سرطانی معده (MKN45)، می‌تواند به‌دلیل نوع ترکیبات موجود در این گیاه باشد که به آن، خاصیت مقابله با سلول‌های سرطانی را داده‌اند؛ یکی از این ترکیبات، «myrcene» می‌باشد [۲۵].

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳ توسط Nejad و همکاران انجام شد، عنوان شد که ماده‌ی myrcene موجود در ماده‌ی موثره گیاه دارویی Provskia abrotanoides، به آن خاصیت ضد عفونی‌کنندگی، ضد سرطان، آنتی‌باکتریال و آنتی‌اکسیدانی می‌دهد [۲۸]. مزیت کار انجام شده در این مطالعه نسبت به مطالعه Nejad این است که آن‌ها به بررسی اثر ضدسرطانی فقط یکی از منوترپن‌های استخراج شده از این گیاه پرداختند و نتایجی که به دست آوردند میزان کشندگی کم‌تری نسبت به عصاره هیدروالکلی که ما در این مطالعه به‌کار گرفتیم، داشته است. و از طرفی آن‌ها فقط به سنجش میزان سمیت اکتفا کردند ولی در مطالعه ما اثر تجمعی پلی‌فنل‌ها، ترپنوئیدها و الکالوئیدهای به صورت برایندی نشان داده شده است و هم‌چنین علاوه بر اثبات سمیت سلولی به بررسی مکانیسم عملکرد این ترکیبات نیز پرداخته شد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۳، Roodsari و همکاران منتشر کردند، اثرات دارویی تعدادی از گیاهان دارویی در ایران، مورد بررسی قرار گرفت؛ در این مطالعه‌ی مروری، آن‌ها نتیجه گرفتند که مواد موثره‌ای مانند myrcene موجود در تعدادی از گیاهان دارویی، با اعمال سایتوتوکسیته‌ی بالا، می‌توانند اثربخشی خوبی بر سلول‌های سرطانی داشته باشند [۲۵]. هم‌چنین در مطالعه‌ای خواص آنتی‌باکتریال و ضد سرطانی گیاه Cnidium officinale مورد بررسی قرار گرفت اجزای تشکیل‌دهنده گیاه با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی مورد ارزیابی قرار گرفت و حاوی ترکیبات زیادی از جمله myrcene و α terpinene بود که سمیت مطلوبی را بر سلول‌های Caco-2 و MKN45 اعمال کرده بود [۲۲]. تا الان در مقالات مشابهی که از ترکیب خالص شده Myrcene که یکی از منوترپن‌های موجود در این گیاه است، به دلیل تجاری شدن و در دسترس بودن استفاده شده است و سایر پلی‌فنل‌های موجود در این گیاه چندان مورد توجه و بررسی محققین قرار نگرفته‌اند در حالی‌که در غلظت‌های پایین‌تری از عصاره هیدروالکلی که در این مطالعه نشان داده شده است نتایج بهتری از اثرات تجمعی پلی‌فنل‌های، ترپن‌ها و سایر ترکیبات فعال موجود در این گیاه در کم کردن بقای سلول‌های سرطانی با تمرکز بیش‌تری نشان داده شده است.

از طرفی ترکیب myrcene یکی از منوترپن‌های گیاهی با فرمول مولکولی $C_{10}H_{16}$ می‌باشد که جزو ترکیباتی فعالی است که اغلب در اسانس‌های گیاهی یافت می‌شود ولی به میزان کم‌تری می‌توان آن‌را در عصاره‌ها گیاهی مشاهده کرد که این میزان بستگی به فصل استحصال و اندام گیاهی مورد استفاده دارد.

یکی دیگر از مواد موثره‌ی موجود در عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، که می‌تواند اثرات ضد سرطانی آن را توجیه کند، «terpinene» می‌باشد که منوترپن موجود در اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشد. Cecilia Diaz و همکاران در سال ۲۰۰۷ دریافتند که گیاه Schinus molle که حاوی ترکیباتی مانند myrcene،tricyclene و γ–terpinene است توانایی ایجاد سمیت و مکانیسم القا مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی را دارد [۲۹]. Roh و همکاران در سال ۲۰۱۳، با بررسی اثرات بیولوژیک و ضد سرطانی روغن گیاه Angelica tenuissima Nakai، به این نتیجه رسیدند که α-terpinene، با اثر بر سلول‌های Caco-2 و MKN45، می‌تواند عامل موثری برای خواص ضد سرطانی این گیاه بوده باشد [۳۰]. علاوه بر نوع آلفای terpinene، زیر گروه گامای این ترکیب نیز، خاصیت ضد سرطانی مناسبی را در مطالعات مختلف، به گیاه دارنده‌ی خود بخشیده است.

ترکیب دیگری که می‌توان با آن، قدرت ضد سرطانی گیاه دارویی Provskia abrotanoides را توجیه کرد، ترکیب «Tanshinones» می‌باشد. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۱ توسط Sairafianpour و همکاران انجام شد، عنوان کردند که ترکیبات tanshinones استخراج شده از Provskia abrotanoides، می‌تواند با IC50 ۴۵-۴ میکرومولار بر رده‌ی سلول‌های سرطانی KB-V1 و KB3-1، کشندگی را اعمال کند [۳۱]. در مطالعه‌ای که توسط Li و همکاران در سال ۲۰۱۶ انجام شد نشان داد که Diterpenoid Tanshinone در کاهش viability سلول‌های رده‌ی PC-9 و MCF-7 با IC50 (۷/۴±۱/۰) و (۴/۴±۰/۵) موثر است. اگر چه اثبات شده است که Diterpenoid Tanshinone بازدارندگی ضعیفی در ۷ رده‌ی سلولی دیگر ازجمله MKN45 دارد [۳۲]. استفاده از ترکیبات تخلیص شده که به شکل تجاری در دسترس هستند علاوه بر این‌که هزینه زیادی جهت فراوری آن‌ها نیاز است، دارای فرایند پیچیده‌ای هستند که بر اساس نوع روش انتخابی درصد خلوص متفاوت و قیمت‌های بسیار متفاوتی را دارا

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

خواهند بود که این هزینه گزاف به کسانی که بایستی از این ترکیبات استفاده کنند تحمیل می‌شود در صورتی‌که ما در این مطالعه نشان دادیم عصاره هیدروالکلی این گیاه که به راحتی توسط افردی که حتی دانش بالایی در زمینه شیمی آنالیز مواد ندارد هم قابل استخراج و استفاده می‌باشد. اثرات بسیار بهتری را نسبت به ترکیبات تخلیص شده از خود نشان می‌دهد.

Chen و همکاران در سال ۲۰۱۶، اثر Tanshinone IIA بر هلیکوباکترپیلوری را مورد بررسی قرار دادند؛ نتایج این مطالعه نشان داد که Tanshinone IIA، با ایجاد اثرات التهابی و تحریک آپوپتوز، علاوه بر تاثیر بر باکتری‌های هلیکوباکترپیلوری موجود در معده، رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی MKN45 را نیز متوقف کرده و زمینه را برای افزایش آپوپتوز در آن‌ها فراهم می‌سازند [۳۳]. دو ماده‌ی موثره‌ی دیگری موجود در گیاه دارویی Provskia abrotanoides، شامل «Cryptotanshinone» و «Hydroxycryptotanshinone» می‌باشد؛ به‌طوری که در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۷ توسط Zaker و همکاران انجام شد، دو ترکیب دی‌ترپنی شامل Cryptotanshinone و hydroxycryptotanshinone را از ریشه‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، جداسازی و معرفی کرده و در ادامه، این دو ترکیب را بر رده‌ی سلول‌های سرطانی MCF7 و Hela تاثیر دادند؛ آن‌ها عنوان کردند که این دو ترکیب با اثرات سیتوتوکسیک خود باعث کاهش قدرت بقاء و اعمال آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود [۳۴]. ما در این مطالعه فقط از اندام هوایی گیاه در آخر فصل بهار که دارای بیش‌ترین مقدار ترکیبات موثر بود استفاده کردیم. در مطالعه ما علی‌رقم استفاده از عصاره تام هیدروالکلی اثرات آنتی‌اکسیدانی همراه با اثرات ضد سرطانی نشان داده شده‌اند به طوری‌که با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پلی‌فنل‌ها حجم زیادی از رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده از سرطانی شدن سلول‌ها از بین می‌روند و با خصوصیات آنتی‌کنسری از طریق اعمال آپوپتوز ترکیبات ترپنی جلوی تکثیر سلول‌های سرطانی گرفته می‌شود و این دو دسته از ترکیبات نقش پیشتیبان یک‌دیگر را در این مطالعه به خوبی نشان دادند.

در مطالعه‌ای، Geryani و همکاران در سال ۲۰۱۶، اثرات عصاره‌ی گیاهی Provskia را بر رده سلولی MCF-7 بررسی کردند و مشاهده شد هنگامی که سلول‌های MCF-7 با عصاره‌ی گیاه مورد نظر با غلظت‌های (µg/ml ۱۰۰–۱۰۰۰) به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوبه شوند، کاهش viability سلول‌ها به صورت وابسته به دوز دیده می‌شود. به طوری که پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت عصاره گیاهی به طور بارزی موجب کاهش viability سلول در غلظت‌های ۵۰۰ و µg/ml ۱۰۰۰ شد. هم‌چنین در همین مطالعه اثر عصاره گیاهی Provskia بر رده سلولی Hela نیز بررسی شد. زمانی که رده سلولی Hela با غلظت‌های (µg/ml ۱–۱۰۰۰) از عصاره گیاهی به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند، کاهش viability سلول‌ها به صورت وابسته به زمان و دوز مشاهده و نشان داده شد که پس از ۲۴ و ۷۲ ساعت عصاره‌ی گیاهی تاثیری روی viability سلول‌های Hela ندارد، اما پس از ۴۸ ساعت عصاره گیاهی Provskia باعث کاهش viability سلول‌ها در دوز µg/ml۱۰۰۰ شد [۸]. غلظت‌های به‌کار رفته در مطالعه آن‌ها خیلی بیش‌تر از غلظت‌های به کار رفته در مطالعه ما بود. به طوری‌که آن‌ها غلظت µg/ml ۱۰۰۰ از عصاره را در تیمار سلولی موثر می‌دانستند اما مطالعه ما نشان داد که با ۱٪ از این غلظت یعنی µg/ml ۱۰ هم می‌توان نتایج قابل قبولی را به‌دست آورد و نیازی به استفاده از غلظت‌های بالاتر نمی‌باشد و این به دلیل کاهش عوارض جانبی احتمالی است که ممکن است در اثر استفاده از هر ترکیب دارویی رخ دهد. از طرفی مشکلات غالب مقالات مشابه، بررسی سطحی خصوصیات ضدسرطانی ترکیبات موجود در گیاه است که فقط به بررسی سنجش سمیت سلولی می‌پردازند اما یکی از خصوصیات سلول‌های MKN45 در سرطان معده، قدرت متاستازی و مهاجرت سلولی آن‌ها می‌باشد که در این مطالعه ما اثبات کردیم که ترکیبات موجود در این عصاره علاوه بر اعمال آپوپتوز، می‌توانند مهاجرت سلولی را به شکل معنی‌داری مهار کند. لازم به ذکر است که در هیچ‌کدام از مطالعه‌های انجام شده از این گیاه به بررسی این خصوصیت پرداخته نشده بود و در این مطالعه برای اولین بار به بررسی اثر عصاره هیدروالکلی این گیاه بر قدرت متاستازی سلول‌های سرطانی پرداخته شده است.

یکی دیگر از علل توجیه‌کننده‌ی اثرات ضد سرطانی گیاه Perovskia abrotanoides، اثرات بالای آنتی‌اکسیدانی این گیاه می‌باشد؛ در مطالعه‌ی حاضر، برای بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی داروی گیاهی Perovskia abrotanoides، اثرات آنتی‌اکسیدانی دوزهای ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این گیاه با دوزهای متناظر از ویتامین C (به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی)، مورد مقایسه قرار گرفت؛ نتایج تحلیل داده‌ها نشان داد که تمام غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides، با ارتباط معنی‌داری، با خواص آنتی‌اکسیدانی از ویتامین C، برابری می‌کرده است. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط Ashraf و همکاران انجام شد، با استفاده از تکنیک GC-MS

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

به بررسی ترکیبات موثره‌ی گیاه Perovskia abrotanoides پرداختند؛ آن‌ها نشان دادند که ترکیبات موجود در برگ این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی حدود ۷۶٪ هستند و ترکیبات ساقه‌ی این گیاه، حدود ۴۵٪ باعث مهار پراکسیداسیون لینولئیک می‌شوند [۳۵]. آن‌ها در این مطالعه به لیست کردن تمامی ترکیبات موجود در این گیاه پرداختند و در ادامه به بررسی تست FRAP جهت تعیین قدرت آنتی‌اکسیدانی این گیاه اشاره کردند اما در مطالعه ما علاوه بر روش FRAP که به بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی کلی عصاره گیاه می‌پردازد، به سنجش حذف رادیکال‌های آزاد با روش DPPH اشاره کردیم که به‌ندرت در مقالات مشابه در کنار هم مورد قیاس قرار می‌گیرند. در واقع در مطالعه ما با دو شیوه مختلف که یکی رادیکال‌های آزاد را از طریق مکانیسم اکسیداسیون و احیاء حذف می‌کند (FRAP) و دیگری که با ایجاد رادیکال آزاد در محیط میزان حذف آن توسط ترکیبات آنتی‌اکسیدان را به چالش می‌کشد (DPPH)، به بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و قدرت حذف رادیکال‌های آزاد به‌وسیله عصاره گیاهی پرداخته شد و مشخص گردید که این عصاره نسبت به آسکوربیک اسید دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی خوبی می‌باشد.

یکی از مشکلات موجود در این مطالعه استفاده از عصاره هیدروالکلی اندام هوایی گیاه است که هر چند تعداد متابولیت‌های موجود در آن به خاطر نوع استفاده از حلال‌ها محدود است اما اثرات درمانی را نمی‌توان به وضوح به متابولیت یا ترکیب خاصی ربط داد و نیاز است با جداسازی متابولیت‌های موجود در این عصاره، مقایسه دقیق‌تری از مکانیسم ضد سرطانی ترکیبات این عصاره داشت. بنابراین پیشنهاد می‌شود با توجه به مزیت اندمیک بودن این گیاه و امکان وجود متابولیت خاص و متفاوت در این گیاه نسبت به گیاهان این خانواده، در مطالعات بعدی به بررسی تاثیر ترکیبات تخلیص شده از عصاره هیدروالکلی این گیاه در فرایندهای مولکولی تاثیرگذار در آپوپتوز و بررسی تغییرات بیان ژن‌های مربوطه پرداخته شود.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی سمنان به شماره طرح ۸۳۰ و کد اخلاق IR.SEMUMS.REC.1394.118 انجام شده است.

منابع

[1] Antognoli S, Chiorrini S, Cascinu S. Chemotherapy for advanced gastric cancer: across the years for a standard of care. Expert Opin Pharmacother 2007; 8: 797-808. https://doi.org/10.1517/14656566.8.6.797

[2] Roshanaei G, Kazemnejad A, Sedighi S. Postoperative survival estimation of gastric cancer patients in cancer institute of Tehran, Imam Khomeini hospital and its relative factors. Avicenna J Clin Med 2010; 17: 13-18. (Persian).

[3] Ghahreman A. Iranian naturelle colorfull Flora. La Science faculty, Tehran univ, Iran: Research Institute of Forests and Rangelands 1986; 9: 1059-1060. (Persian).

[4] Beikmohammadi M. The evaluation of medicinal properties of Perovskia abrotanoides Karel. Middle East J Sci Res 2012; 11: 189-193. (Persian).

[5] Fallah Huseini H, Fakhrzadeh H, Larijani B, Shikh Samani A. Review of anti-diabetic medicinal plant used in traditional medicine. J Medicin Plants 2006; 1: 1-8. (Persian).

[6] Arabi F, Moharramipour S, Sefidkon F. Chemical composition and insecticidal activity of essential oil from Perovskia abrotanoides (Lamiaceae) against Sitophilus oryzae (Coleoptera: Curculionidae) and Tribolium castaneum (Coleoptera: Tenebrionidae). Int J Tropical Insect Sci 2008; 28: 144-150. (Persian).
https://doi.org/10.1017/S1742758408079861

[7] Organization WH. Preventing chronic diseases: a vital investment: WHO global report: World Health Organization; 2005.

[8] Geryani MA, Mahdian D, Mousavi SH, Hosseini A. Ctotoxic and apoptogenic effects of Perovskia abrotanoides flower extract on MCF-7 and HeLa cell lines. Avicenna J Phytomed 2016; 6: 410.

[9] Soni A, Krishnamurthy R. Plants-the next generation treatment of leukemia. Indian J Plant Sci 2013; 2: 117-125.

[10] Nigusse Z, Wondifraw W, Abate S. Screening of aloe otallensis exudate and its effect on Leishmania aethiopica. Pharm Anal Acta 2016; 7.
https://doi.org/10.4172/2153-2435.1000515

[11] Zaker A, Sykora C, Gössnitzer F, Abrishamchi P, Asili J, Mousavi SH, Wawrosch C. Effects of some elicitors on tanshinone production in adventitious root cultures of Perovskia abrotanoides Karel. Indust Crops Products 2015; 67: 97-102. (Persian).
https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.015

[12] Hu T, Cho C. Potential applications of tanshinones in gastrointestinal and hepatic diseases. J Biomol Res Ther 2013; 2: 2.
https://doi.org/10.4172/2167-7956.1000110

[13] Liang S, Guo R, Zhang Z, Liu D, Xu H, Xu Z, Wang X, Yang L. Upregulation of the eIF4E signaling pathway contributes to the progression of gastric cancer, and targeting eIF4E by perifosine inhibits cell growth. Oncol Rep 2013; 29: 2422-2430.
https://doi.org/10.3892/or.2013.2397

[14] Zamanian-Azodi M, Rezaie-Tavirani M, Heydari-Kashal S, Kalantari S, Dailian S, Zali H. Proteomics analysis of MKN45 cell line before and after treatment with Lavender aqueous extract. Gastroenterol Hepatol Bed Bench 2012; 5: 35-42.

[15] Hung KF, Hsu CP, Chiang JH, Lin HJ, Kuo YT, Sun MF, Yen HR. Complementary Chinese herbal medicine therapy improves survival of patients with gastric cancer in Taiwan: a nationwide retrospective matched-cohort study. J Ethnopharmacology 2017; 199: 168-174.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.004

[16] Marcelo G, Ariana-Machado J, Enea M, Carmo H, Rodríguez-González B, Luis Capelo J, et al. Toxicological evaluation of luminescent silica nanoparticles as new drug nanocarriers in different cancer cell lines. Materials 2018; 11: 1310.
https://doi.org/10.3390/ma11081310

[17] Morteza-Semnani K, Ghanbarimasir Z. A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological activities of the genus ballota. J Ethnopharmacology 2019; 233: 197-217.
https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.001

[18] Akar B, Akar Z, Sahin B. Identification of antioxidant activity by different methods of a freshwater alga (Microspora Sp.) collected from a high mountain lake. Hitt J Sci Engin 2019; 6: 25-29.
https://doi.org/10.17350/HJSE19030000129

[19] Ghaderi S, Ebrahimi SN, Ahadi H, Moghadam SE, Mirjalili MH. In vitro propagation and phytochemical assessment of Perovskia abrotanoides Karel. (Lamiaceae)-A medicinally important source of phenolic compounds. Biocatal Agricult Biotechnol 2019; 19: 101-113.
https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101113

[20] Fraternale D, Sosa S, Ricci D, Genovese S, Messina F, Tomasini S, Montanari F, Marcotullio MC. Anti-inflammatory,

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

[28] Nejad SK, Jaimand K, Monfared A, Akbarzadeh M. Study of the chemical composition of essential oils of Perovskia abrotanoides karel at the different stage and distillation by gas chromatography. J Med Plants By-Products 2013; 2: 139-142. (Persian).

[29] Díaz C, Quesada S, Brenes O, Aguilar G, Ciccio JF. Chemical composition of Schinus molle essential oil and its cytotoxic activity on tumour cell lines. Nat Prod Res 2008; 22: 1521-1534. https://doi.org/10.1080/14786410701848154

[30] Roh J, Shin S. Biological activities of essential oils from Angelica tenuissima Nakai. Nat Prod Sci 2013; 19: 297-302.

[31] Sairafianpour M, Christensen J, Stærk D, Budnik BA, Kharazmi A, Bagherzadeh K, Jaroszewski JW. Leishmanicidal, antiplasmodial, and cytotoxic activity of novel diterpenoid 1, 2-quinones from Perovskia abrotanoides: new source of tanshinones. J Nat Prod 2001; 64: 1398-1403. https://doi.org/10.1021/np010032f

[32] Li S, Zhaohuan L, Guangshun Z, Guanhua X, Guangji Z. Diterpenoid tanshinones, the extract from Danshen (Radix Salviae Miltiorrhizae) induced apoptosis in nine human cancer cell lines. J Tradit Chin Med 2016; 36: 514-521. https://doi.org/10.1016/S0254-6272(16)30069-3

[33] Chen GY, Shu YC, Chuang DY, Wang YC. Inflammatory and apoptotic regulatory activity of tanshinone IIA in Helicobacter pylori-infected cells. Am J Chin Med 2016; 44: 1187-1206. https://doi.org/10.1142/S0192415X1650066X

[34] Zaker A, Asili J, Abrishamchi P, Tayarani-Najaran Z, Mousavi SH. Cytotoxic and apoptotic effects of root extract and tanshinones isolated from Perovskiaabrotanoides Kar. Iran J Basic Med Sci 2017; 20: 1377.

[35] Ashraf SN, Zubair M, Rizwan K, Tareen RB, Rasool N, Zia-Ul-Haq M, Ercisli S. Compositional studies and Biological activities of Perovskia abrotanoides Kar. oils. Biol Res 2014; 47: 12. https://doi.org/10.1186/0717-6287-47-12

antioxidant and antifungal furanosesquiterpenoids isolated from Commiphora erythraea (Ehrenb.) Engl Resin Fitoterapia 2011; 82: 654-661. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.02.002

[21] Abdul Baqi S, Tareen RB, Mengal A, Khan N, Behlil F, Achakzai AK, et al. 35. Determination of antioxidants in two medicinally important plants, Haloxylon griffithii and Convolvulus leiocalycinus, of Balochistan. Pure Appl Biol 2018; 7: 296-308. https://doi.org/10.19045/bspab.2018.70036

[22] Sim Y, Shin S. Antibacterial activities of the essential oil from the leaves and rhizomes of Cnidium officinale Makino. J Essent Oil Res 2014; 26: 452-457. https://doi.org/10.1080/10412905.2014.951456

[23] Zhu G, Wong B, Eggo M, Ching C, Yuen S, Chan E, Lai K, Lam S. Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in gastric cancer cells is blocked by protein kinase C activation through inhibition of c-myc. Br J Cancer 1999; 79: 393-400. https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690062

[24] Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. Carcinogenesis 2001; 22: 1393-1397. https://doi.org/10.1093/carcin/22.9.1393

[25] Liu ZL, Chu SS, Jiang CH, Hou J, Liu QZ, Jiang GH. Composition and insecticidal activity of the essential oil of lindera aggregata root tubers against sitophilus zeamais and tribolium castaneum. J Essent Oil Bearin Plants 2016; 19: 727-733. https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.960275

[26] Zheng YX, Yang M, Rong TT, Yuan XL, Ma YH, Wang ZH, et al. CD74 and macrophage migration inhibitory factor as therapeutic targets in gastric cancer. World J Gastroenterol 2012; 18: 2253. https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i18.2253

[27] Roodsari MR, Zamanian-Azodi M, Salimpour F. Herbal remedies and medicine; introducing some Iranian plants. J Paramed Sci 2013; 4: 2008-4978.

[DOI: 10.29252/koomesh.23.2.291]
Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir at 10:46 +0430 on Tuesday September 21st 2021

Koomesh -Volume 23, Issue 2 (March and April 2021), 291-300

Anticancer effects of Perovskia abrotanoides hydroalcoholic extracts on MKN45 gastric cancer cells

Mahsa Iraji (M.Sc)[1], Melika Sadegh (M.D)[1], Ali Khaleghian (Ph.D)[*2]
1 - Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran
2 – Dept. of Biochemistry, Semnan University of Medical Sciences, Semnan, Iran

* Corresponding author. +98 9122737075 khaleghian.ali@gmail.com
Received: 14 Jul 2019; Accepted: 13 Sep 2020

Introduction*:* Gastric cancer is the fourth most common cancer worldwide and the second leading cause of death from cancer. Given that existing treatments for it, but the high cost and side effects, have not demonstrated full efficacy and rely on traditional medicine and medicinal plants due to the antioxidant activity of Provskia abrotanoides, this study was performed to investigate the effects of the plant extract in improving gastric cancer.

Materials and Methods*:* In this exprimantal study, Perovskia abrotanoides, collected and after certified specialists from the Center for Applied Science of Jahad Keshavarzi in Semnan, was extracted dry. Human gastric adenocarcinoma cell line MKN 45 was bought from the toxicity of herbal medicine on cancer cells MKN45 were investigated by using the test MTT (dimethylthiazol diphenyl tetrazolium bromide). The antioxidant properties of the hydroalcoholic extracts were evaluated by two in vitro tests, DPPH radical scavenging and reducing power (FRAP). Wound healing and morphological modification were performed in vitro to examine migration and adhesion in the gastric cancer cell line by invert microscopy.

Results: The results showed that with increasing concentration of the extract of Perovskia abrotanoides, with a significant relationship, the percentage of remaining living cells of MKN45, had fallen (P<0.001).At all concentrations of 10, 50 and 100 micrograms per ml of extract, with a significant correlation was equal with the antioxidant properties of 10 micrograms per ml vitamin C (P<0.001). The the hydroalcoholic extracts showed considerable cytotoxic activity against cancer cell lines (IC50 = 10 μg · mL−1). It was found that the proliferation rate of MKN-45 cells decreased after treatment with the extracts in a dosedependent way.

Conclusion: The results of this study showed that the Perovskia abrotanoides extract had high cytotoxic effect on gastric cancer cells (MKN45); and the percentage of lethality, with the passage of time and with increased concentration had risen.

Keywords*:* Perovskia Abrotanoides, Apoptosis, Stomach Neoplasms, Antioxidant