مقاله پژوهشی

مجله سلول و بافت (علمی - پژوهشی)
جلد۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹

بررسی اثر عصاره اتانولی *Achillea wilhelmsii* بربقای سه رده سلول سرطانی در محیط کشت

فیروزه خسروی .M.Sc*، جمال مشتاقیان .Ph.D، سید حمید زرکش .Ph.D

- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، اصفهان، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: Firouzehkhosravi1351@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۲/۲۵

چکیده

هدف: هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره اتانولی برگ و گل گیاه بومادران بر بقای سه رده سلول سرطانی HELA، CAOV، MCF7 و امکان تولید دارویی ارزان قیمت بدون عوارض جانبی است.

مواد و روش‌ها: پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون لاین‌های سلولی سرطانی ، سوسپانسیون سلولی تهیه شده و به مدت ۴۲ ساعت با سلولهایی با غلظت‌های مختلف در محیط کشت توزیع شد. سپس عصاره برگ و گل *iismlehliw aellihcA* تهیه و استریل شد. رقت های متوالی ۰/۴ ، ۰/۸، ۱/۶ ، ۳/۲ و ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و به هر چاهک حاوی سوسپانسیون سلول اضافه و در دستگاه انکوباتور قرار گرفت. محیط‌ها پس از ۸۴ ساعت از نظر میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند و جذب نور پس از آزمایش TTM تعیین شد

نتایج: نتایج نشان داد که در سلول های سرطانی MCF7، کمترین میزان بقای سلول در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی لیتر و CAOV و HELA در غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی لیتر عصاره برگ مشاهده شد. در مقایسه، بیشترین اثر ضد سرطانی عصاره گل بومادران بر روی سه رده سلول سرطانی در MCF7 با غلظت ۶/۴ گرم در میلی لیتر ثبت شد، در حالی که در رده سلول های سرطانی HELA کمترین میزان زنده ماندن سلول در غلظت ۶/۴ میلی گرم در میلی لیتر در تیمار ۷۲ ساعت مشاهده شد.

نتیجه گیری: با توجه به این‌که بقای سلول‌ها در تیمارهای مختلف عصاره برگ و گل گیاه بومادران در سه رده سلول سرطانی تفاوت دارد، می‌توان استفاده از این ماده جهت کاهش بقای سلول‌های سرطانی را توصیه کرد.

واژگان کلیدی: بومادران، رده های سلول سرطانی HELA،CAOV ،MCF7، بقای سلول سرطانی

مقدمه

سرطان، نارسایی قلبی و سکته از عمده ترین و رایج‌ترین علل مکرر مرگ در سراسر جهان هستند. سرطان سومین دلیل مرگ در ایران پس از بیماری‌های کرونر قلب، تصادف و سایر پدیده-ها است. رایج‌ترین سرطان بین زنان و مردان سرطان پستان و معده است. این بیماری به‌دلیل عوامل و جایگاه‌های متعدد زیست شناختی و رویکردهای مداخل‌های بی‌شمار که به‌خوبی شناخته نشده اند، مجموعه ای نسبتا پیچیده از مشکلات را نشان می‌دهد. طبق آمار سازمان جهانی بهداشت سالانه ۱۰ میلیون مورد جدید سرطان تشخیص داده می‌شود. آمارهای زیستی مبنی بر نرخ رخداد سرطان، نشان می‌دهند که این بیماری یک چالش جدی در مراقبت سلامت و بقای انسان است و یک اثر جدی بر سیستم سلامت جامعه وارد می‌کند و چالشی بین پژوهش‌گران علوم پزشکی ایجاد کرده است. در حالی‌که شواهدی بر گسترش و توسعه تعداد بسیاری دارو برعلیه سرطان وجود دارد، نرخ مرگ برای بیش‌تر سرطان‌های رایج کاهش نداشته است (۱، ۲). یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها در بیش‌تر کشورهای جهان به‌جز ژاپن سرطان پستان است. سرطان پستان یکی از رایج‌ترین علل مرگ در زنان مبتلا است. سرطان تخمدان هشتمین سرطان منجر به‌مرگ در سراسر جهان است. در ایران سومین سرطان رایج از میان سرطان‌های وابسته به جنس سرطان دهانه رحم است (۳). از عوامل دخیل بر ایجاد سرطان می‌توان وراثت، عوامل هورمونی، سن، محدودیت‌های دوره جنینی، ویروس‌ها و باکتری‌ها، نژاد، جنس، درمان‌های باروری، شیردهی، رژیم غذایی، سیگار کشیدن، استرس‌های زندگی روزانه، چاقی، امید به‌زندگی، سم‌های محیطی، آلایندههایی مانند هیدروکربن‌های چند حلقه‌های معطر و آمین‌های معطر را نام برد (۴). درمان براساس نوع سرطان و مرحله آن متفاوت است. منظور از مرحله سرطان میزان رشد و گسترش تومور از محل اصلی خود است. اگر تومور در یک محل قرار دارد و گسترش پیدا نکرده معمول‌ترین رویکرد درمانی برای مداوای سرطان جراحی است. از آن‌جا که عمل جراحی نمی‌تواند همه موضع سرطانی را برداشته و حذف کند، گزینه های درمانی شامل پرتودرمانی، شیمی‌درمانی یا هردو است (۵).

یکی از بهترین راه‌ها برای کم‌کردن احتمال ابتلا به‌سرطان استفاده از مواد طبیعی است. تعداد زیادی از داروهای ضدسرطان مورد استفاده در شیمی‌درمانی از منابع طبیعی مشتق شده‌اند که برخی از منابع گیاهی و برخی دیگر مانند Doxorobicin که یک داروی کارآمد برای سرطان پستان است، از منابع دریایی به‌دست آمده‌اند. در سراسر جهان تلاش‌های زیادی برای کشف گوناگونی زیستی غنی خوراکی‌ها و گیاهان دارویی به‌منظور پی‌گیری و تعقیب موثرترین ضدسرطان‌زاهای گیاهی می‌شود. این مواد زیست فعال وابسته به‌گروه‌های گوناگون ترکیب‌های شیمیایی متفاوت مانند فنلیها، رنگدانه‌ها، آلیل سولفیدها، گلوکوزینولات‌ها، تانین‌ها، آنتوسیانین‌ها، فلاونوئیدها، استرول‌های گیاهی، بازدارنده‌های پروتئاز و استروژن‌های گیاهی هستند بسیاری از این مواد بخشی از خواص ضدسرطانزایی شان را از راه فعال‌سازی سیستم ایمنی و یا حفاظت در مقابل بیماری‌های قلبی عروقی اعمال می‌کنند (۶، ۷). *Achillea wilhelmsii* به خانواده Acteraceae، تعلق دارد که به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان پراکنده می‌باشد. این گیاه دارویی پراکنش نسبتا وسیعی در استان‌های مختلف ازجمله گلستان، مازندران، اصفهان، خراسان، فارس، چهارمحال و بختیاری، همدان و کرمان دارد و خواص درمانی آن مشهور است (۸).

گزارش‌هایی مبنی بر فعالیت‌های دارویی، ایمنی، زیستی و سایر فعالیت‌های درمانی این گیاهان ارزشمند وجود دارد. مطالعه توده‌های بومی گیاهان دارویی مناطق مختلف کشور گامی موثر در جهت شناسایی استعدادهای ژنتیکی گیاهان فوق در راستای دست‌یابی به‌انواع مناسب از نظر شیمیایی و استفاده در برنامه‌های اصلاح و اهلی نمودن و درنهایت استفاده از این توده‌ها به‌منظور توسعه کشت گیاهان دارویی در راستای تامین مواد موثر مورد نیاز صنایع داروسازی داخلی و خارجی خواهد بود (۹). بدین منظور این آزمایش به‌منظور بررسی اثر عصاره اتانولی *Achillea wilhelmsii* بر بقای سه رده سلول سرطانی در محیط کشت HELA، CAOV، MCF7 انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهی: گیاه بومادران در اواخر خرداد ماه که فصل گل‌دهی آن است، از منطقه سردشت شهرستان لردگان واقع در استان چهار محال و بختیاری جمع‌آوری شد. بخش‌های برگ و گل گیاه جداسازی شد و در شرایط مناسب، به‌دور از نور و رطوبت خشک شد. پس از آن به‌منظور استخراج بهینه‌ی عصاره، گل و برگ گیاه توسط آسیاب برقی پودر شد. به‌منظور استخراج عصاره از گیاه بومادران، میزان ۱۰۰ گرم از پودر برگ و گل گیاه جداگانه با ۴۰۰ میلی‌لیتر الکل ۹۶ درصد در ارلن مخلوط شد و برای جلوگیری از تبخیر الکل درب ظرف با پارافیلم بسته و روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت مخلوط حاصل با استفاده از کاغذ صافی، قیف بوخنر و پمپ خلا فیلتر شده، عصاره در ارلن خلا جمع‌آوری شد. تفاله مانده روی کاغذ صافی دوباره در ارلن با الکل ۷۰ درصد مخلوط شد و روی هم‌زن به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و پس از آن دوباره فیلتر شد. عصاره حاصل به‌عصاره قبلی اضافه شد و تفاله دور ریخته شد.

برای کاهش میزان حلال موجود در عصاره و خشک شدن سریع آن، از دستگاه روتاری با روش تقطیر در خلا استفاده شد. بدین منظور، داخل بالن دستگاه ۱/۳ حجمی عصاره ریخته و دستگاه به‌پمپ خلا وصل شد. الکل تبخیر شده، تحت عنوان الکل بازیافتی، در بالن دیگری از دستگاه جمع‌آوری شد. کار غلیظ سازی تا زمانی که حجم عصاره به ۱/۳ حجم اولیه برسد، ادامه یافت. جداسازی چربی‌ها از عصاره غلیظ شده با استفاده از کلروفرم و روش دکانته کردن انجام شد. در روش دکانته کردن، ابتدا ۱۰۰ میلی‌لیتر عصاره را با ۱۰۰ میلی‌لیتر کلروفرم مخلوط کرده در قیف دکانته ریخته درب قیف برای جلوگیری از تبخیر کلروفرم با چوب پنبه بسته شد و به‌مدت ۱۵ دقیقه زمان داده شد. پس از آن پیچ قیف به‌آرامی باز شد تا فاز زیرین جدا شد و فاز بالایی در قیف باقی ماند. فاز بالایی حاوی عصاره، در ظرف دیگر ریخته و با ۵۰ میلی‌لیتر کلروفرم مخلوط شد. پس از ۱۵ دقیقه فاز زیرین دور ریخته و فاز بالایی نگه‌داری شد. خشک کردن عصاره نهایی در آون در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد مدت یک هفته به‌طول انجامید. سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در یخچال و به‌دور از نور و رطوبت نگه‌داری شد.

تهیه و کشت سلولی: رده‌های سلول سرطانی سرطان بافت اپی‌تلیال غدد و مجاری پستانی انسان (MCF-7) از یک زن سفید پوست ۶۹ ساله، سرطان بافت اپی‌تلیال دهانه رحم انسان (HELA) از زن سفیدپوست ۵۴ ساله و سرطان بافت اپی‌تلیال تخمدان انسان (CAOV) از زن سفیدپوست ۵۴ ساله به‌دست آمدند. رده‌های سلولی مورد آزمون از نوع سلول‌های چسبنده بودند.

سه ویال هرکدام حاوی یک رده سلول سرطانی منجمد از تانک نیتروژن خارج شد. ویال‌های حاوی رده‌های سلول منجمد در بن‌ماری به‌دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسانده تا سلول‌ها ذوب شدند. سلول‌های ذوب شده به‌فلاسک حاوی حجم مناسب محیط کشت کامل DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) حاوی ۹۰ درصد محیط کشت خام، ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین افزوده شده و به‌انکوباتور انتقال داده شدند. پس از ۴۸ ساعت انکوبه کردن (۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۷ درصد و دی‌اکسیدکربن ۵ درصد)، فلاسک حاوی سلول و اطمینان از رشد کافی سلول‌ها و پرشدن کف فلاسک، آن را به زیر هود انتقال داده محیط رویی حذف شد. پس از سرریز کردن محیط، حجم مناسب تریپسین EDTA/ (Ethylenediaminetetraacetic acid)، بسته به‌حجم فلاسک و میزان سلول‌ها، به‌فلاسک حاوی سلول افزوده و به‌مدت ۳ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا سلول‌ها از کف فلاسک جدا شدند. جدا شدن سلول‌ها با مشاهده آن‌ها زیر میکروسکوپ تایید شد. سلول‌ها به‌فالکون منتقل شده و دو برابر حجم تریپسین محیط کشت کامل افزوده به‌مدت ۵ دقیقه در دور ۱۰۰۰-۸۰۰ سانتریفیوژ شده محیط رویی که حاوی تریپسین نیز بود، حذف شده رسوب سلولی در ۱ میلی‌لیتر محیط کشت کامل امولسیون شد. از رسوب سلولی امولسیون شده ۱۰ میکرولیتر با ۱۰ میکرولیتر تریپان‌بلو مخلوط و روی لام هماسیتومتر شمارش شده میانگین سلول‌ها محاسبه شد. برای تیمار سلول‌ها از پلیت ۹۶ چاهکی استفاده شد. به‌منظور توزیع سلول‌ها در چاهک‌های پلیت به فالکون حاوی ۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون سلول ۱ میلی‌لیتر محیط کشت کامل اضافه شد. برای افزایش دقت نتایج، هر تیمار با ۳ تکرار انجام شد. در ردیف A هرکدام چاهک‌های ۱، ۲ و هر کدام ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی افزوده و به‌عنوان کنترل در نظر گرفته شدند. در همین ردیف چاهک‌های ۴، ۵ و ۶ هرکدام دارای ۵۰ میکرولیتر محیط کشت بوده به‌عنوان بلانک در نظر گرفته شدند .در

ردیف‌های B تا F هم هرکدام ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی به‌منظور افزودن تیمار توزیع شد. پلیت را در انکوباتور قرار داده و ۲۴ ساعت زمان داده شد تا سلول‌ها رشد و تقسیم کردند (۱۰).

تیمار سلول‌ها با عصاره گیاه بومادران: میزان ۱۲۸ میلی‌گرم عصاره پولکی برگ و گل هرکدام در فالکون حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب، معادل ۱۲/۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، در دمای آزمایشگاه حل شد. عصاره‌های مذکور با گذراندن از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استریل شده و غلظت‌های متوالی ۰/۴، ۲/۸، ۲/۰، ۳/۱ و ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر ساخته شدند. پس از گذشت زمان لازم برای انکوبه شدن ردیف‌های B تا F با غلظت‌های مختلف عصاره تیمار شدند و هم‌زمان برای رساندن مواد غذایی ۵۰ میکرولیتر محیط کامل به‌همه چاهک‌های کنترل و تیمار افزوده شد و مجددا پلیت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.

اندازه گیری بقا سلول‌ها پس از افزودن عصاره گیاه بومادران: در مشاهده میکروسکوپی سلول‌ها پلیت‌های حاوی سه رده سلول سرطانی در حالت کنترل و حالت تیمار شده با عصاره بومادران در زیر میکروسکوپ و با بزرگ‌نمایی ۴۰ مشاهده و بررسی شدند و از آن‌ها عکس گرفته شد.

به‌منظور بررسی بقا سلول‌ها و به‌دست آوردن تعداد سلول‌های زنده از آزمون سنجش MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide] انجام شد. میزان ۱۰ میلی‌گرم از پودر آن در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت حل شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت، ۱۰ میکرولیتر از محلول به‌چاهک‌های کنترل و چاهک‌های دارای تیمار افزوده شد و دوباره به‌مدت ۴ ساعت انکوبه گشت. سپس محیط درون چاهک‌ها خالی شده و ۱۵۰ میکرولیتر محلول دی‌متیل‌سولفوکسید اضافه شد. MTT توسط آنزیم‌های احیاکننده میتوکندریایی فعال در سلول زنده به فورمازان ارغوانی احیا می‌شود. افزایش در تعداد سلول‌های زنده، افزایش در میزان فورمازان تشکیل شده را که بازتابی از احیا MTT و فعال بودن آنزیم‌های احیاکننده است، نشان میدهد که موجب افزایش در جذب نوری میشد. سنجش جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر و توسط یک طیف نورسنج انجام شد. میانگین جذب نوری گروه کنترل از دیگر غلظت‌های تیمار گل و برگ بیش‌تر است و با توجه به‌این‌که میزان جذب نوری رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های زنده دارد، میانگین کنترل با دارا بودن بیش‌ترین تعداد سلول زنده، به‌عنوان شاهدی برای سنجش تعداد و درصد سلول‌های زنده در هر غلظت عصاره گل و برگ درنظر گرفته شد.

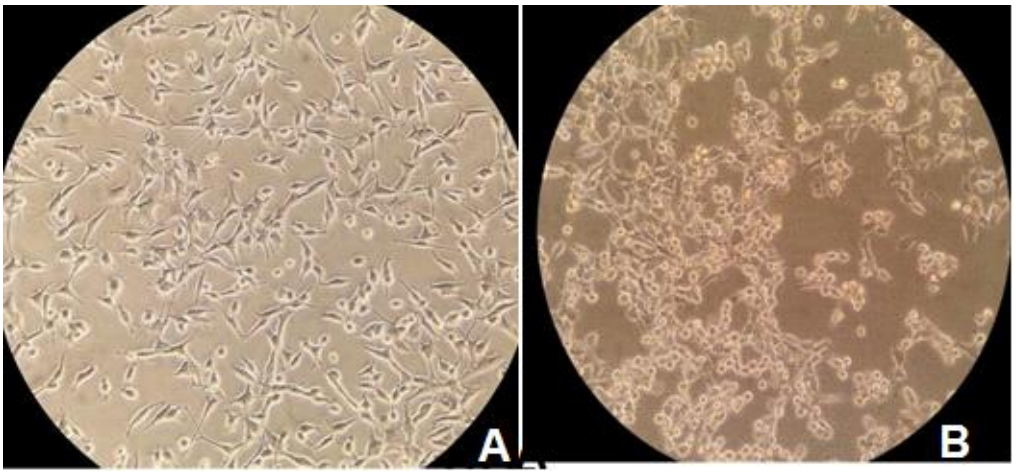
آنالیز آماری

مراحل بالا با تیمار ۷۲ ساعت نیز تکرار و آزمون جذب نوری انجام شد. از داده‌های دستگاه در هر ردیف پلیت با استفاده از نرم افزار اکسل میانگین گرفته و درصد سلول‌های زنده در هر غلظت عصاره برای تیمارهای برگ و گل ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت گیاه بومادران با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

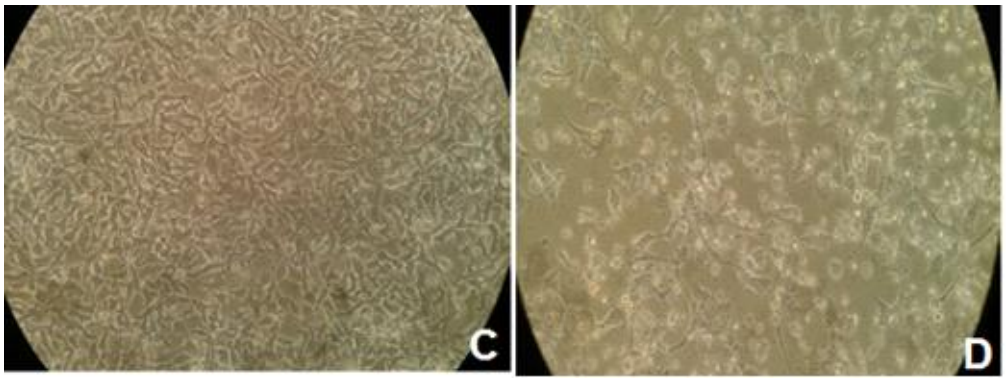
۱۰۰×(بلانک -میانگین جذب نوری ردیف کنترل)/(بلانک -میانگین جذب نوری هر ردیف چاهک)= درصد سلول‌های زنده در هر چاهک؛ داده‌های حاصل از آزمون با استفاده از نرم افزار اکسل میانگین‌گیری و پردازش شده و با استفاده از نرم افزار SPSS-۱۹ تجزیه و تحلیل شده و نمودارها رسم شدند.

نتایج

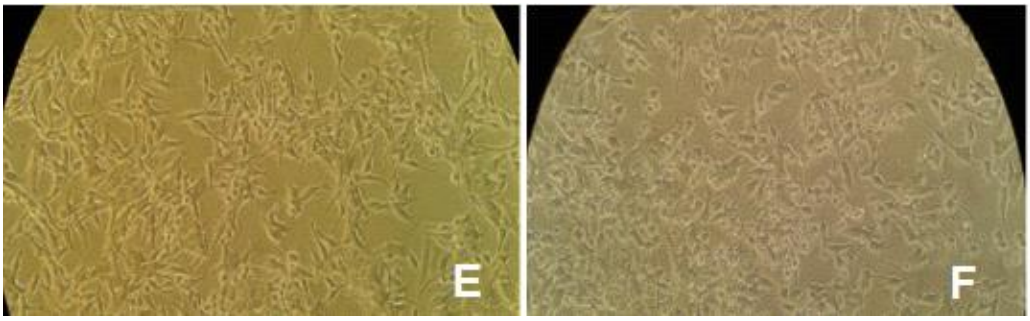
پلیت‌های حاوی رده سلول سرطانی CAOV، MCF7 و HELA در حالت کنترل و حالت تیمار شده با عصاره بومادران در زیر میکروسکوپ و با بزرگ‌نمایی ۴۰ در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب نشان داده شده است.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی رده سلول سرطانی MCF7 کنترل (A) و رده سلول سرطانیMCF7 تیمار با عصاره بومادران (B)



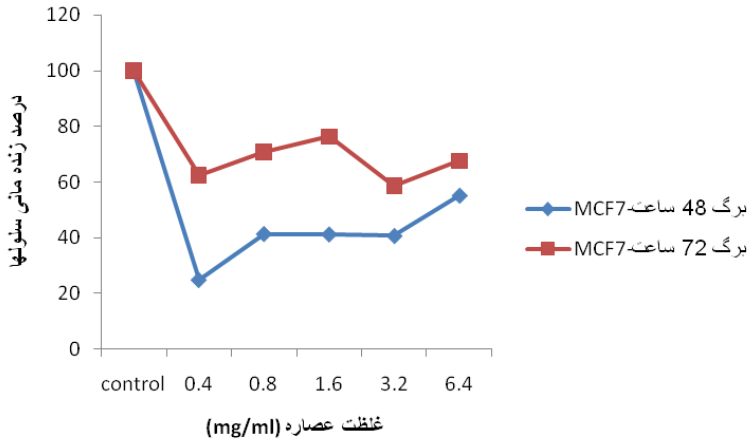
شکل ۲: تصویر میکروسکوپی رده سلول سرطانی CAOV کنترل (C) و رده سلول سرطانی CAOV تیمار با عصاره بومادران (D)



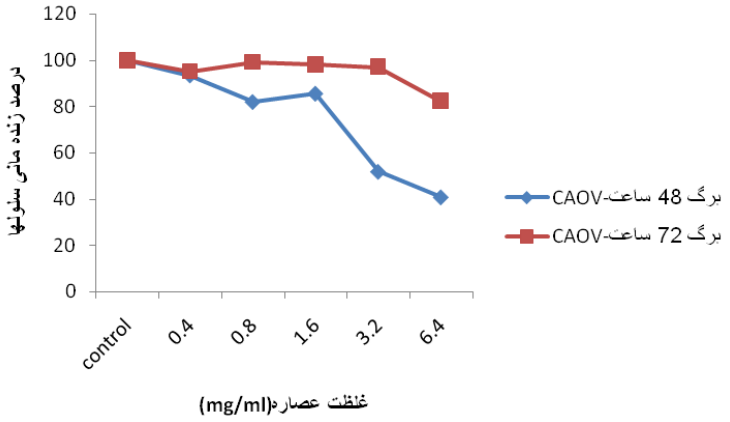
شکل ۳: تصویر میکروسکوپی رده سلول سرطانی HELA کنترل (E) و رده سلول سرطانی HELA تیمار با عصاره بومادران (F). بزرگنمایی: ×۴۰

مقایسه اثر عصاره برگ گیاه بومادران بر سه رده سلول سرطانی در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸، ۲/۰، ۱/۳ و ۶/۴ میلی گرم در لیتر میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت

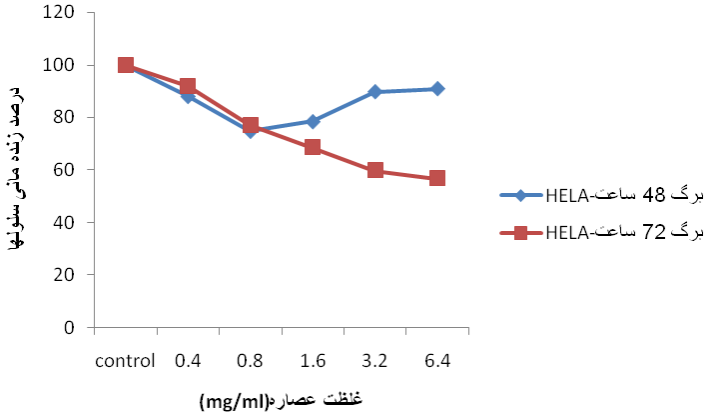
در سلول سرطانی رده MCF7 در مقایسه غلظت‌ها و تیمارهای ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت، کم‌ترین میزان بقای سلولی در غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و در تیمار ۴۸ ساعت مشاهده شد (نمودار ۱). در رده سلول سرطانیCAOV در غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر عصاره و در تیمار ۴۸ کم‌ترین میزان بقای سلولی مشاهده شد و به نظر می‌رسد که مواد موثر موجود در عصاره برگ گیاه در غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و به‌مدت ۷۲ ساعت برای اثر بر سلول‌ها مناسب بوده است (نمودار ۲). در رده سلول سرطانی HELA نیز بهترین مدت زمان تیمار و مناسب‌ترین غلظت عصاره برگ گیاه، غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تیمار ۷۲ ساعت بود. به‌نظر می‌رسد که میزان مواد موثر موجود در عصاره برگ گیاه و مدت زمان تیمار ۷۲ ساعت برای اثر بر سلول‌ها کافی بوده است (نمودار ۳). تیمار شاهد دارای بیش‌ترین تعداد سلول زنده بود.



نمودار۱: اثر عصاره اتانولی برگ گیاه بومادران با تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول سرطانی MCF7



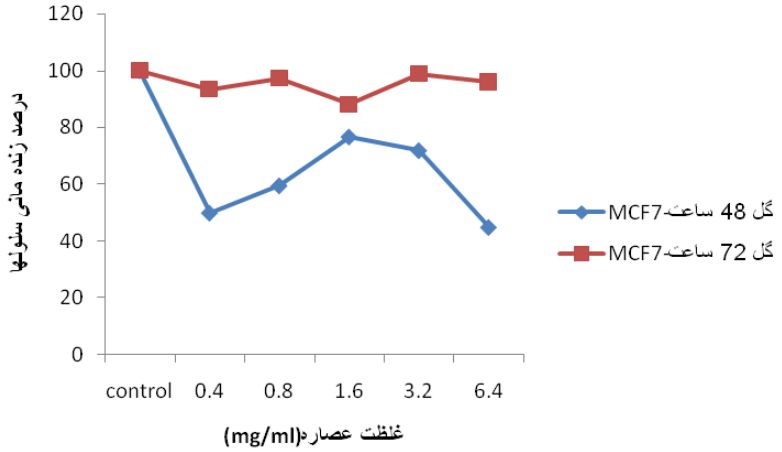
نمودار ۲: اثر عصاره اتانولی برگ گیاه بومادران با تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول سرطانی CAOV



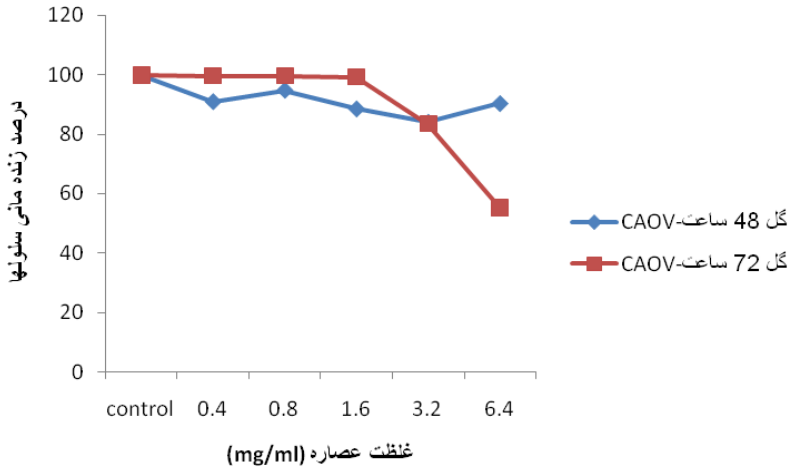
نمودار ۳: اثر عصاره اتانولی برگ گیاه بومادران با تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول سرطانی HELA

مقایسه اثر عصاره گل گیاه بومادران بر سه رده سلول سرطانی در غلظت‌های ۰/۴، ۰/۸، ۱/۰، ۲/۲، ۳/۲ و ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت

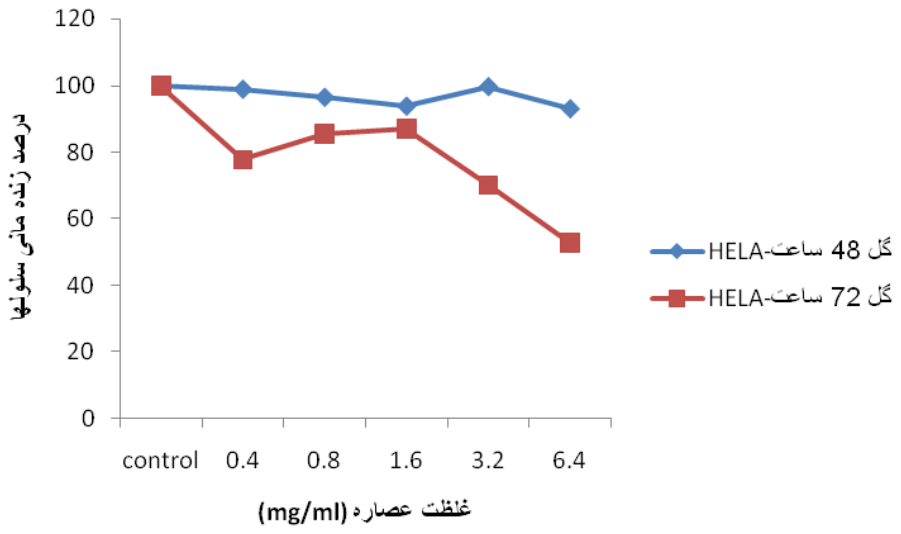
در رده سلول سرطانی MCF7 کم‌ترین میزان بقای سلولی در تیمار ۴۸ ساعت و در غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است. به نظر می‌رسد (نمودار ۴). در صورتی‌که در رده‌های سلولی CAOV در تیمار ۴۸ ساعت و ۳/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و HELA در تیمار ۷۲ ساعت و ۶/۴ میلی‌گرم عصاره گل گیاه کم‌ترین بقا سلولی مشاهده شد که دلیل بر کفایت مواد موثره و زمان تیمار عصاره بر این رده سلول است (نمودار ۵و ۶) . تیمار شاهد دارای بیش‌ترین تعداد سلول زنده بود.



نمودار ۴: اثر عصاره اتانولی گل گیاه بومادران با تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول سرطانی MCF7



نمودار ۵: اثر عصاره اتانولی گل گیاه بومادران با تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول سرطانی CAOV



نمودار۶: اثر عصاره اتانولی گل گیاه بومادران با تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت بر رده سلول سرطانی HELA

مقایسه اثر عصاره گل و برگ گیاه بومادران بر سه رده سلول سرطانی در غلظت‌های۰/۴، ۶/۸، ۲/۰، ۳/۱ و ۴/۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و تیمارهای ۴۸ و ۷۲ ساعت

در رده سلول MCF7 غلظت ۰/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در تیمار ۴۸ ساعت گل نسبت به غلظت ۳/۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تیمار ۷۲ ساعت برگ بقا کم‌تر سلول‌ها ثبت شد. در رده CAOV غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در تیمار ۴۸ ساعت برگ کم‌ترین بقا را نسبت به غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تیمار گل ۷۲ ساعت نشان داده است. در رده سلول HELA تیمار ۷۲ ساعت برگ غلظت ۶/۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کم‌ترین بقا سلول مشاهده شده است.

میانگین سلول‌های زنده گروه کنترل از دیگر تیمارهای برگ و گل بیش‌تر است و باتوجه به‌این‌که میزان جذب نوری رابطه مستقیم با تعداد سلول‌های زنده دارد، میانگین کنترل با دارا بودن بیش‌ترین تعداد سلول زنده، به‌عنوان شاهدی برای سنجش تعداد و درصد سلول‌های زنده در هر غلظت عصاره در نظر گرفته می‌شود. مقایسه درصد زنده مانی رده سلول سرطانی MCF7 با دو رده سلول سرطانی دیگر نشان می‌دهد که رده سلول سرطانی MCF7 درصد تعداد سلول زنده کمتری نسبت به دو رده سلول سرطانی دیگر دارد. مقایسه میزان سلول زنده رده سلول سرطانی HELA با دو رده سلول سرطانی دیگر بیانگر آن است که سلول سرطانی HELA بیش‌ترین تعداد سلول زنده را نسبت به دو رده سلول سرطانی دیگر دارد. این نتیجه که رده سلول سرطانی HELA بیش‌ترین تعداد سلول زنده را دارد، بیان‌گر حساسیت کم‌تر این رده سلول به‌مواد موثر موجود در عصاره برگ و گل گیاه بومادران نسبت به دو رده سلول سرطانی MCF7 و CAOV است. باتوجه به موارد بالا این نتیجه به‌دست می‌آید که اثر تیمارها به‌نوع رده سلول سرطانی بستگی دارد و هر تیمار عصاره گل و برگ بر هر نوع رده سلول سرطانی اثرهای متفاوتی دارد.

بحث

در مقایسه سه رده سلول سرطانی مورد پژوهش رده سلول سرطانیMCF7 حساس‌ترین رده سلول به‌عصاره گل و برگ گیاه بومادران بوده و رده سلولی HELA و CAOV مقاوم‌ترین آن‌ها می‌باشد. فروزنده و همکاران (۱۱) دریافتند که عصاره اسپند با اثر وابسته به‌دوز و زمان بر سلول‌های سرطانی HeLa می‌تواند باعث مهار رشد این سلول‌ها شود؛ سید علیپور و همکاران (۱۲) گزارش کردند که عصاره اتانولی برگ گیاه پسته وحشی دارای اثر مهاری بر رده سلولی Hela وMCF7 است. نتایج پژوهش صفی‌پور افشار و همکاران (۱۳) بیان‌گر سمیت انتخابی عصاره ریشه گیاه شیرین بیان بر سلول‌های سرطانی رده MCF7 است.

نتایج تحقیق آقاعباسی و همکاران (۱۴) حاکی از اثر بالقوه عصاره عصاره هیدروالکلی بذر گیاه خارسنبل بر بیان ژن *BCL*۲ در سلول‌های سرطانی پستان و پروستات انسان و ارتباط آن با مهار رشد سلول‌های سرطانی است. یافته‌های پژوهش دلالی اصفهانی و همکاران (۱۵) نشان داد که اسانس برگ گیاه بومادران دارای اثرات سیتوتوکسیک قوی‌تری نسبت به عصاره متانولی می‌باشد عصاره متانولی برگ این گیاه به‌علت وجود ترکیبات فنولی بالاخص فلاونوئیدها اثر مهاری روی رده سلولی سرطان کولون HT-29 دارد ولی اسانس برگ به‌علت وجود ترکیباتی مونوترپنی هم‌چون ۱، ۸ سینئول و آلفاپینن دارای اثر مهاری قوی برروی رده سلولی HT-29 می‌باشد. نتایج فوق با یافته

بنابر گزارش‌های اعلام شده گیاه بومادران سرشار از فلاونوییدها و سزکویی ترپن براساس داده‌های به‌دست آمده از تست MTT بیش‌ترین سمیت عصاره برای سلول‌ها تعیین شد. میزان IC50 مربوط به‌عصاره هیدروالکلی در ۲۴ و ۴۸ ساعت به‌ترتیب برابر با ۱۵۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. از طرف‌دیگر، نتایج حاصل از دستگاه فلوسایتومتری نشان داد این عصاره قابلیت توقف چرخه سلولی در گروه‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت را نیز دارد (۱۸).

تفاوت در مقادیر میانگین جذب نوری سه رده سلول سرطانی در تیمارهای کنترل بیان‌گر تفاوت در ویژگی‌های اختصاصی هر رده سلول سرطانی هست. تفاوت در میانگین جذب نوری سه رده سلول سرطانی در غلظت‌های مختلف تیمارهای آزمون می‌تواند مربوط به تفاوت در ویژگی‌های اختصاصی هر رده سلول سرطانی و نیز میزان مواد موثر و بازدارنده رشد موجود در نوع و غلظت تیمار باشد. موارد بالا نیازمند تجزیه عصاره برگ و گل گیاه بومادران و بررسی جداگانه مواد به‌دست آمده ازنظر بازدارندگی رشد و بقای سلول‌ها بر سه رده سلول سرطانی هست.

نتیجه گیری

باتوجه به‌این‌که بقای سلول‌ها در تیمارهای مختلف عصاره برگ و گل گیاه بومادران در سه رده سلول سرطانی تفاوت دارد، می‌توان نتیجه گرفت که هر رده سلول سرطانی به‌یک نوع تیمار و غلظت مشخص حساسیت کم‌تر و به‌نوع دیگر تیمار با غلظتی دیگر حساسیت بیش‌تری دارد. این تفاوت در حساسیت سلول‌های سرطانی به تیمارهای مختلف می‌تواند مربوط به‌برهم‌کنش هر رده سلول سرطانی با مواد موثر موجود در عصاره گل و یا برگ گیاه بومادران باشد و نیز این‌که کدام ماده موجود در عصاره گل یا برگ بر کدام رده سلول سرطانی اثر بازدارندگی رشد بیش‌تری دارد. شاید در تیمارهای گل یا برگ یک ماده موثر موجود در عصاره برگ یا گل گیاه بومادران مانع از اثر بازدارندگی رشد ماده دیگر موجود در عصاره موردنظر می‌شود. تفاوت در مقادیر آنتی اکسیدانتی و بازدارندگی بقای سلول بستگی به‌تفاوت در حضور، میزان و انواع ترکیب‌های فنلی و پلی‌فنلی در غلظت‌های متفاوت عصاره بخش‌های گل و برگ گیاه بومادران و مقاوت سلولی دارد. لذا، عصاره گل و برگ بومادران برای کاهش میزان بقای سلول‌های سرطانی لاین‌های مورد آزمایش توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از دانشگاه اصفهان برای حمایت‌های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

1. Mousavi SM, Gouya MM, Ramazani R, Davanlou M, et al. Annal Oncol. 2009; 20(3): 563-556.
2. Ghavami G, Sardari S, Shokrgozar MA. Anticancerous potentials of Achillea species against selected cell lines. J MedPlants Res. 2010; 4(22): 2411-2417.

3. Hamta A, Parvini P. BRCA1 gene expression in DMBA-induced breast cancer in rats Scientific J Gorgan Uni Med Sci. 2014; 7(15) 25-31.
4. Kubatka P, Ahlersova E, Ahhlers I, Bojkova B, et al. Variability of Mammary Carcinogenesis Induction in Female Sprague-Dawley and Wistar: Han Rats: the Effect of Season and Age J Physiol Res. 2002; 51: 633-640.
5. Bifulco M, Di Marzo V. Targeting the endocannabinoid system in cancer therapy A call for further research. J Nature Med. 2002; 8 (6):212-220.
6. Bhattacharya S. Natural Antimutagens: A Review Research Journal of Medicinal Plant 2010; 5(2):116-126.
7. Sajadi E, Naderi GA, Ziaee R. Antioxidant Effects of Some Medicinal Plants. J Kermanshah Uni Med Sci. 2004; 8(2):34-48.
8. Özgen U, Mavi A, Terzi Z, Coflkun M, et al. Antioxidant activities and total phenolic compounds amount of some asteraceae species. Turk J Pharmacol Sci. 2009; 1(3):203-216.
9. Benedec D, Vlase L, Oniga I, Mot AC, et al. Polyphenolic composition, antioxidant and antibacterial activities for two Romanian subspecies of Achillea distans Waldst. et Kit. ex Willd. J Mol. 2013; 18(8): 8725-8739.
10. Freshney R. Culture of animal cells, wiley publisher, fifth edition, 2005; 566 pp.
11. Forouzandeh F, Salimi S, Naghsh N, Zamani N, et al. Anticancer effect of hydroalcoholic extract of Pecan seed on human cervical epithelial carcinoma cells. J Shahrekord Uni Med Sci. 2014; 16(4): 1-8.
12. Seyedalipour B, Pourakbar E, Taravati A. The Cytotoxic Effect of Ethanolic Extract of Pistacia Khinjuk Leaf onHeLa and MCF-7 Cancerous Cell Lines. JRUMS. 2016; 14 (11) :939-952
13. Safipour Afshar A, Saeed Nematpour F, Lakzian M. The effect of licorice extract on the expression of Orentin decarboxylase gene and cell proliferation in human breast cancer cell lines. J Cell Tissue. 2015; 1(8): 42-51.
14. Agha Abbasi K, Hassani Komala H, Askari N, Torkzad Mahani M, et al. Evaluation of anti-cancer effect of hydroalcoholic extract of Harsanbeh seed on breast and prostate cancer cell line and its synergistic effect with doxorubicin. J Cell Tissue. 2016; 3(3) 206-220.
15. Dalali Esfahani L, Monjemi R, Amjad L. Effect of cytotoxicity of *Achillea wilhelmsii* C. Koch extract and leaf essential oil on human colon cancer cells. J Experiment Animal Biol. 2012; 1(3): 1-6.
16. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S. Animicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by paliyar tribe from Tamil Nadu, India. BMC Complement Altern Med. 2006; 6: 35.
17. Zakaria ZA, Mohamed AM, Mohd Jamil NS, Rofiee MS, et al. In vitro cytotoxic and antioxidant properties of the aqueous, chloroform and methanol extracts of *Dicranopteris linearis* leaves. Ame J Bot, 2010; 10(2): 273-282.
18. Moallemzadeh Sh, Rajab Beigi E, Montazeri M. Cytotoxic effect of hydroalcoholic extract of *Artemisia sieberi* on cell line breast cancer cells. SKBr3. J Cell Tissue. 2017; 10 (4):252-260.

Journal of Cell & Tissue (JCT)
Winter 2021; 11(4)

Original Article

The effect of ethanolic extract of *Achilleawilhelmsii* on the survival of three cancer cell lines in vitro culture

KhosraviF*M.Sc., Moshtaghian J Ph.D., Zarkesh SH Ph.D.

- Department of Biology, Faculty of Science, University of Isfahan, Isfahan, Iran

* Email corresponding author: Firouzehkhosravi1351@gmail.com

Received:17 Agu. 2020 Accepted: 15 Mar. 2021

Abstract

Aim: This experiment was performed to investigate the effect of ethanolic extract of yarrow leaves and flowers on the survival of three cancer cell lines namely; HELA, CAOV, MCF7, for the possibile production of inexpensive drugs without side effects.

Material and Methods: After incubation of cancer cell liners 48 hours, cell suspension was prepared and distributed with cells at different concentration in culture medium for 24 hours. Then *Achilleawilhelmsii* leaf and flower extract were prepared and sterilized. Consecutive dilutions of 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 and 6.4 mg / ml were prepared and added to each well containing cell suspension and placed in an incubator. The plates were examined microscopically after 48 hours and light absorption was determined after MTT assay.

Results: The results showed that in MCF7 with 0.4 mg / ml; CAOV, and HELA cancer cell lines, the lowest cell survival rate was observed at the concentration of 6.4 mg / ml leaf extraction. In comparison, the highest anti-cancer effect of yarrow flower extract on three cancer cell lines was recorded in MCF7 cancer cells at a concentration of 6.4 mg / ml, while in HELA cancer cell line the lowest cell survival ware observed at the concentration of 6.4 mg / ml in a 72-hour treatment.

Conclusion: According to the results, yarrow flower and leaf extract treatment is recommended to decrease of three cancer cell lines survival.

Keywords: Yarrow, Cancer cell lines, CAOV, MCF7, HELA, Cancer cell survival