

بررسی اثرات سمیت سلولی گیاهان آشیل تالاگونیکا بوئیز (*Achillea talagonica* Boiss) و آشیل تینوئی فولیا لام (*A. tenuifolia* Lam) به روش ارزیابی سمیت سلولی میگو آب شور (Brine Shrimp Cytotoxicity)

سودابه سعیدنیا* (Ph.D.) احمد رضا گوهری (Ph.D.)* حمدرضا
گوهری** (Ph.D.) فهیمه مرادی افرایلی*** (Ph.D.) فاطمه لطفی مالدار*** (Ph.D.) عباس
حاجی آخوندی**** (Ph.D.)

چکیده

سابقه و هدف: جنس بومادران (*Achillea*) از خانواده کاسنی (Asteraceae) جایگاه قابل توجهی در طب سنتی ایران دارد. آشیل تالاگونیکا و آشیل تینوئی فولیا دو گونه از 19 گونه یافت شده از این جنس می باشد که به طور وسیعی در مناطق شمالی ایران میروید. در این تحقیق اثر سمیت سلولی این دو گونه برای اولین بار به روش ارزیابی کشندگی میگو آب شور (Lethality Assay Brine shrimp) بررسی شد. مواد و روش ها: این بررسی یک کارآزمایی بالینی است که در آن گیاهان پس از جمع آوری خشک و خرد شده و توسط حلال های اتیل استات، متانول و متانول: آب (1:1) و به روش تراوشی (Percolation) مورد عصاره گیری قرار گرفتند. اثر کشندگی عصاره های تام بر لاروهای آرتمیا سالینا (*Artemia Salina*) در غلظت های اولیه 10، 100 و 1000 میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره مورد بررسی قرار گرفت. پس از دستیابی به نتایج اولیه، آزمایش در غلظت های 250، 500 و 750 میکروگرم بر میلی لیتر به روش مشابه تکرار شد. نتایج حاصله تحت مطالعات آماری به روش تحلیل براساس حداقل انحراف از میزان متوسط (Probit analysis) قرار گرفت. یافته ها: از میان عصاره های مورد بررسی، عصاره اتیل استاتی و متانولی از هر دو گیاه با LC_{50} کوچکتر از 1000 qM واجد اثرات سمیت سلولی و عصاره های هیدروالکلی با LC_{50} بزرگتر از 1000 qM فاقد اثر شناخته شدند. عصاره اتیل استاتی گیاه آشیل تالاگونیکا (*Achillea talagonica*) با LC_{50} معادل 413 qM موثرترین عصاره شناخته شد. استنتاج: هر دو گونه از جنس بومادران دارای اثرات سمیت سلولی می باشند و اثرات مذکور با افزایش قطبیت عصاره ها کاهش می یابد. می توان نتیجه گرفت که ترکیبات سمی موجود در این جنس، دارای ساختمان های غیر قطبی می باشند. از دیگر سویی به یقین گلیکوزیدهای فنلی و آلکالوئیدهای بتائینی که قطبیت بالایی داشته و در عصاره آبی- متانولی استخراج می شوند، نقشی در بروز اثرات ندارند.

واژه های کلیدی : آشیل تالاگونیکا (*Achillea talagonica*) ، آشیل تینوئی فولیا (*Achillea tenuifolia*) ، سمیت سلولی ، آرتمیا سالینا (*Artemia salina*)

E این تحقیق طی شماره 60- 83 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* متخصص فارماکونوزی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران⁺ * ساری :
 کیلومتر 18 جاده خزر- دانشکده داروسازی
 ** متخصص آمار حیاتی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
 داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران *** دانشجوی دکتری
 **** متخصص فارماکونوزی، دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
 E تاریخ دریافت : 83/9/9 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 83/11/3 تاریخ
 تصویب: 84/5/26

مقدمه

شده است (2). از جمله گیاهان خانواده کاسنی، جنس بومادران آشیل (Achilles) را می‌توان نام برد که شامل 115 گونه بوده و عموماً در نیمکره شمالی زمین رویش دارند. این جنس در ایران دارای 19 گونه گیاه علفی چند ساله و غالباً

معطر است. برخی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس عبارتند از آشیل و پهللمسی ئی⁷، آشیل بپراستیئی⁸، آشیل کنفرتا⁹، آشیل میله فولیوم نوبلیس¹⁰ که در مناطق مختلفی از ایران می‌روید (4،3). بومادران (Achillea) را از روزگاران گذشته می‌شناخته‌اند و خواص درمانی و دارویی مختلفی برای آن ذکر کرده‌اند. در طب سنتی دم کرده سرشاخه‌های گلدار بومادران، التیام‌دهنده زخم‌ها و جراحات است، در رفع گاستریت‌های حاد و مزمن، نفخ و سوء هاضمه مفید ذکر شده، مصرف جوشانده آن در برخی نواحی ایتالیا جهت درمان تب‌های نوبه بین مردن معمول می‌باشد (5). گونه

آشیل‌تالاکونیکا (A. talagonica)

آندمیک (انحصاری) ایران می‌باشد و اثرات مهارکننده ایمنی آن در مطالعات قبلی به اثبات رسیده (6) و گونه آشیل تنیوئی‌فولیا (A. tenuifolia) نیز که در ایران رویش دارد، از نظر اثرات ضدقارچی علیه تریکوفیتون و روکوزیوم (Trycophyton verucosum)، تریکوفیتون منتاگروفیت‌ها (T. mentagrophytes)،

امروزه مبارزه با برخی انواع سرطان، به‌خصوص تومورهای که رشد سریع دارند، تا حدودی موفقیت‌آمیز بوده است. درمان سرطان به دلیل محدودیت‌های بنیادی در انجام کار، بسیار مشکل‌تر از درمان دیگر بیماری‌ها است. مهم‌ترین محدودیت کشتن با غیرفعال کردن سلول‌های تومور در حضور سلول‌های طبیعی بدون بروز سمیت بر سلول‌های طبیعی است. به منظور دستیابی و تکامل داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی نیاز به یکسری آزمایش‌های غربالگری (Screening) عصاره‌های خام وجود دارد. چندین نوع از عوامل ضد سرطان برای آزمون غربالگری مورد توجه می‌باشند از آن جمله می‌توان ترکیبات دارای اثرات سمیت سلولی و ترکیبات موثر بر سیستم ایمنی را نام برد (1). یکی از معتبرترین آزمون‌ها برای سنجش اثرات سمیت سلولی، آزمون میگوآب شور (Brine Shrimp test) می‌باشد که به وسیله انستیتوی ملی سرطان در آمریکا (NCI) ¹ ارائه شده است (2). تاکنون برخی از جنس‌های خانواده گیاهی کاسنی (Asteracea) بومی کشور آرژانتین با روش BST مورد بررسی قرار گرفته که از آن میان می‌توان گونه‌های کروتون تیجلیوم²، آمیگدالوئیدها³، ایرماکارپوس ستیجروس⁴، آشیروکلین فلکسید⁵ و یوپاتروئیوم اسپپی⁶ را نام برد که اثرات سمیت سلولی جالب توجهی از آن‌ها مشاهده

7. A. Wilhelmsii

8. A. biebersteini

9. A. conferta

10. A. millefolium nobilis

1. National Cancer Institute

2. Croton tiglium

3. Euphorbia amygdaloides

4. Eramcarpus setigerus

5. Achytoclin flaccida

6. Eupatium SPP

آب (1:1) و به روش تراوش تحت
عصاره‌گیری قرار گرفت. عمل
تراوش به ترتیب توسط هر یک
از حلال‌ها به‌صورت متوالی و
برای هر گیاه سه‌بار به مدت
24 ساعت انجام شد. عصاره‌های
حاصله پس از صاف شدن، تحت خلاء
دوار تغلیظ و در دستگاه
منجمدکننده و خشک‌کن، کاملاً
خشک گردید. سپس غلظت‌های
مختلفی از عصاره‌ها در نرمال
سالین (در مورد عصاره‌های
اتیل‌استاتی در نرمال سالین با
کمک- حلال توئین- 80) تهیه و
مورد آزمون زیست‌شناختی
قرار گرفت. لازم به ذکر
است که از روش رقیق نمودن
متوالی (Serial dilution) برای
تهیه غلظت‌های مختلف یک
عصاره خاص استفاده گردیده
است.

$\bar{u}\bar{a}$ $\bar{o}\bar{o}\bar{o}\bar{o}\bar{o}\bar{a}$ $\bar{a}$ $\bar{o}\bar{o}\bar{a}$ $\bar{h}$ $\bar{o}\bar{o}\bar{o}\bar{o}\bar{o}$
 : (Brine shrimp Lethality Assay) θ $\bar{o}\bar{o}\bar{o}$
 تخم های خشک آرتمیاسالینا (*Artemia salina*) جهت تفریخ در آب دریای مصنوعی (معادل سالین 5، 3 درصد وزنی- حجمی) در دمای 28 درجه سانتیگراد ریخته شد. تخم ها در آکواریوم تحت نور و هوادهی مداوم، پس از 48 ساعت تفریخ (hatching) گردید. لاروهای فعال با استفاده از ویژگی فوتوتروپی از پوسته ها و تخم های تفریخ نشده جدا شدند. ابتدا غلظت های 10، 100، 1000 میکرومولار از عصاره ها تهیه و اثر سمیت سلولی آنها در حضور لاروهای فعال در صفحه میکروتیتر (24 چاهک) بررسی شد. در چاهک های آزمون، میزان 500 میکرولیتر سوسپانسیون لارو حاوی 10-20 لارو فعال به همراه 500 میکرولیتر محلول عصاره با غلظت مشخص جای گرفت. نتایج کشندگی هر غلظت از عصاره ها

تریكوفیتون شوئن لئینی (T.schoenleinii) مورد توجه است (7). در مطالعات کتابخانه ای گزارشی از اثرات سمیت سلولی این دو گونه ایرانی وجود ندارد. در این پژوهش اثرات کشندگی سلولی این گیاهان با روش آزمون میگو آبشور (BST) برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع آوري گياه : اين بررسي
يك کارآزمایي باليني است که
در آن ابتدا سرشاخه هاي هوايي
و گلدار گياه

آشیلا تالاگونیکا بوئیس (Achillea talagonica Boiss) در تیر ماه 1380 از ارتفاعات طالقان واقع در شمال ایران جمع آوری و مورد تایید قرار گرفت و یک نمونه از آن در محل نگهداری گیاهان (Herbarium) دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی و نمونه دیگر در محل نگهداری گیاهان دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران حفظ می شود. گیاه آشیلا تنیوئی فولیالام (Acheillea tenuifolia Lam) نیز در خرداد همان سال از سه راهی آبیک- خروجی اتوبان کرج به سمت طالقان جمع آوری، توسط گیاه شناس مورد تایید قرار گرفته و یک نمونه از آن در محل نگهداری گیاهان دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران حفظ می شود. هر دو گیاه دور از نور و حرارت مستقیم خشک و به قطعات کوچکتر خرد شدند.

قطعات خرد شده سرشاخه هوایی
گیاهان (A.talagonica) (700 گرم) و
آشیلاتاگونیفولیا (A.tenuifolia)
(180 گرم) توسط حلال های
اتیل، استات، متانول و متانول -

6/37	3/60	1/37	آشیل تالگونیکا (Achillea talagonica)
9/33	7/22	5/10	آشیل تنیوفیولیا (Achillea tenuifolia)

نمودار شماره 1: میانگین درصد مرگ و میر لاروهای آرتمیا سالینا (Artemia salina) در حضور غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی گیاه آشیل تالگونیکا (Achillea talagonica)

نمودار شماره 2: میانگین درصد مرگ و میر لاروهای آرتمیا سالینا (Artemia salina) در حضور غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی گیاه آشیل تنیوفیولیا (Achillea tenuifolia)

LC₅₀ هر یک از عصاره‌ها که طبق روش آماری تحلیل براساس حداقل انحراف از میزان متوسط (Probit Analysis) با بازه اطمینان 95 درصد محاسبه گردیده، در جدول شماره 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 2: LC₅₀ محاسبه شده (با واحد میکرومولار) برای هر یک از عصاره‌های گیاهان آشیل تنیوفیولیا (Achillea tenuifolia) و آشیل تالگونیکا (Achillea talagonica) در مقایسه با کنترل مثبت برترین هیدروکلراید (LC₅₀=25)

نوع عصاره	اتیل استاتی	متانولی	متانولی-آبی
گونه گیاهی	آبی	متانولی (1:1)	متانولی

بر لاروهای آرتمیا سالینا (Artemia salina) 3 بار مشاهده شد. برای هر غلظت سه چاهک کاملاً مشابه چاهک آزمون ولی فاقد عصاره در نظر گرفته شد. صفحات در دمای 28-30 درجه سانتیگراد انکوبه شده و پس از 24 ساعت تعداد لاروهای زنده باقیمانده در چاهک‌ها توسط حلقه شمارش گردید (8). پس از دستیابی به نتایج اولیه در مورد عصاره‌هایی که اثر سمی سلولی آن‌ها کمتر از 1000 میکرومولار بود، آزمون در غلظت‌های 500، 250، 750 میکرومولار تکرار گردید. غلظت‌های مختلفی از آلکالوئیدبربرین هیدروکلراید به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج خام به صورت درصد مرگ و میر بیان شده و برای محاسبه LC₅₀ وارد آزمون آماری تحلیل براساس حداقل انحراف از میزان متوسط (Probit Analysis) شد.

یافته‌ها

درصد عصاره‌های به دست آمده از میزان 180 گرم گیاه آشیل تنیوفیولیا (A. tenuifolia) و 700 گرم از گیاه آشیل تالگونیکا (A. talagonica) در جدول شماره 1 خلاصه شده است. میانگین درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های مختلف از عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی گیاهان مورد مطالعه در نمودارهای 1 و 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 1: بازدهی عملیات عصاره‌گیری درمورد گیاهان آشیل تالگونیکا و آشیل تنیوفیولیا (A. tenuifolia, Achillea talagonica)

نوع عصاره	درصد وزن - وزن عصاره خشک به پودر گیاهی	اتیل استاتی	متانولی	آبی
گونه گیاهی	متانولی (1:1)	متانولی	متانولی	آبی

آشیلتا لاگونیکا (Achillea talagonica)	413	752	>1000
آشیل تینوئوفولیا (Achillea tenuifolia)	534/5	956	>1000

بحث

دستیابی و تکامل داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی نیازمند آزمون‌های غربالگری عصاره‌های خام (Crud drugs) است. یکی از معتبرترین آزمون‌ها برای سنجش اثرات سمیت سلولي، آزمون میگوآبشور (BST) می‌باشد که به وسیله انستیتو ملی سرطان در آمریکا (NCI) ارائه و گیاهان بسیاری را با این روش مورد آزمایش قرار داده‌اند. در این آزمون‌ها توانایی مهار رشد یا کشتن سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود. از مزایای این روش این است که اگرچه عوامل فعال با هر مکانیسمی که عمل‌کنند تشخیص داده می‌شوند، تنها عواملی قابل ردیابی هستند که بتوانند وارد سلول‌ها شده و یا دیواره سلولي را تخریب نمایند (8و7).

در این پروژه گونه‌هایی از جنس آشیل (Achillea) که در ایران می‌روید برای اولین بار به منظور مطالعات سمیت سلولي براساس روش فوق‌الذکر انتخاب شده‌اند. به این منظور عصاره‌هایی با قطبیت متفاوت از سرشاخه‌های هوایی گلدار گیاهان مذکور به روش تراوش تهیه و سپس اثرات کشندگی سلولي آن‌ها بر لاروهای فعال آرتمیاسالینا (Artemia salina) با روش آزمون میگوآبشور (BST) مورد مطالعه قرار گرفته است. همان‌گونه که نتایج پس از محاسبات آماری نشان می‌دهد، عصاره‌های هیدروالکلی (آبی-متانولي 50 درصد) از هر دو گیاه که قطبیت‌ترین عصاره‌های گیاهی در این مطالعه به شمار می‌آیند، در هیچ‌یک از غلظت‌های به کار رفته سمیت سلولي ایجاد

نکرده و LC_{50} آن‌ها بالاتر از 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شده است (جدول شماره 2). آن‌جایی‌که LC_{50} بیش از 1000 از نظر اثرات سمیت سلولي فاقد ارزش می‌باشد، این عصاره‌ها موثر شناخته نشده‌اند. عمده‌ترین ترکیبات شناخته شده موجود در عصاره‌های آبی-متانولي گونه‌های مختلف جنس بومادران، آلکالوئیدهای بتائینی و اسیدهای آمینه آزاد نظیر پرولین می‌باشند (10) که به‌نظر می‌رسد فاقد اثر کشندگی سلولي هستند. مطالعه عصاره‌های اتیل استاتی و متانولي هر دو گیاه در غلظت‌های 10، 100 و 1000 میکرومولار نشان داد که این عصاره‌ها در غلظت‌های 10 و 100 اثر سمیت سلولي نشان ندادند اما در غلظت 1000 میکرومولار در مقایسه با شاهد موثر بودند. به همین دلیل در غلظت‌های 500، 250 و 750 میکرومولار آزمون شده و LC_{50} آن‌ها بر مبنای تحلیل آماری بر اساس حداقل انحراف از میزان توسط (Probit Analysis) محاسبه گردید (جدول شماره 2). مقادیر LC_{50} گویای آن است که عصاره‌های اتیل‌استاتی هر دو گونه سمیت سلولي بیشتری نسبت به عصاره‌های متانولي این گیاهان داشته (نمودارهای 1 و 2، جدول شماره 2) و نیز عصاره اتیل استاتی گیاه آشیل (Achillea talagonica) موثرترین عصاره دارای سمیت سلولي شناخته شده است. اثرات سمیت سلولي گیاه آشیل تالاگونیکا (Achillea talagonica) در تمامی عصاره‌ها بیشتر آشیل‌تینوئوفولیا (Achillea tenuifolia) بوده است. کاهش تدریجی اثر بخشی از عصاره‌های غیرقطبی به عصاره‌های قطبی‌تر نشانه آن

که دو گونه اخیر از جنس بومادران دارای اثر سمیت سلولی قابل قیاس با یوپاتوریوم آرنوتیانوم (*Eupatorium arnottianum*) می‌باشند. عصاره دی‌کلرومتاتی یوپاتوریوم دارای LC_{50} معادل 502 میکرومولار است. جنس‌های نظیر باکاریس (*Baccharis*) و گونه‌هایی دیگر یوپاتوریوم همچون یوپاتوریوم بونیئی فولیوم (*E. buniifolium*) به ترتیب با LC_{50} معادل 217 و 154 میکرومولار اثر سمیت سلولی بیشتری نسبت به جنس بومادران نشان داده‌اند (3 و 8).

است که احتمالاً ترکیبات غیرقطبی همچون فلاونوئیدهای متوکسیله و ترپنوئیدها به ویژه سزکوئی‌ترپن (Sesquiterpene lactones) و تری‌ترپن‌های (Triterpen) موجود در عصاره اتیل استاتی این گیاهان (11) می‌تواند در بروز اثرات سمیت سلولی نقش مهمی را ایفا نمایند که البته اثبات آن نیازمند جداسازی و شناسایی ترکیبات مزبور از این گیاهان بوده و در پروژه مصوب دیگری در دانشکده داروسازی در دست انجام می‌باشد.

مقایسه نتایج حاضر با آنچه در دیگر منابع معتبر منتشر گردیده نشان می‌دهد

فهرست منابع

1. Hanskell CM. *Cancer Treatment*. 4th edn, Philadelphia: W. B. Saunders Company: 1995.
2. Mongelli E, Martino V, Coussio J. Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. *Int J. Pharmacogn*. 1996; 34(4): 249-250.
3. Bremer K. *Astraceae; cladistics and clasification* oregon. Timber press, 1994.
4. Huber morath A. *Achillea In: Flora Iranica*. (K.H. Rechinger ed). No. 158, Ackademeche Druck- U. Verlagsansfalt, Graz: 1989; pp: 57- 58.
5. Kuhn M.N, Wistone D. *Herbal therapy and suppleaments a scientific traditional approach*; New York Lippin cott; 2000: 347- 350.
6. Rezaeipoor R, Saeidnia S, Kamalinejad M. Immunosuppressive activity of *Achillea talagonica* on humune responses in experimental animals. *J. Ethnopharm*. 1999; 65: 273- 276.
7. Amin G, Dehmoobed-sharifabadi A. Salehi Surmaghi MH, Screening of Iranian plants for antifungal activity. *DARU*. 2002; 9(1): 38-47.
8. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam L, Jacobsen LB, Nichols DE. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med*. 1982; 45: 31- 34.
9. Setzer WN, Setzer MC, Moriarity DM. Biological activity of the essential oil of *Myrcianthes* sp. Nov, black fruit from monte verde, costa Rica. *Planta Med*. 1999; 65: 468- 469.

10. Mehifuhrer M, Troll K, Auer H, Kobelka W. Betaines and free proline within the achillea mil lefolium group. *Phytochemistry*, 1997; 44: 1067- 1069.
11. Viera LM, Kijoa A, Pereira JA, Gedrist E, Herz W. Germacrenolide and flavonoids from Achillea ageratum. *Phytochemistry*, 1997; 45(1): 111- 115.

بررسی اثرات سمیت سلولی گیاهان آشیل تالاگونیکا بوئیز (*Achillea talagonica* Boiss) و آشیل تینوئی فولیا لام (*A. tenuifolia* Lam) به روش ارزیابی سمیت سلولی میگو آب شور (Brine Shrimp Cytotoxicity)

سودابه سعیدنیا* (Ph.D.) احمد رضا گوهری (Ph.D.)* حمدرضا
گوهری** (Ph.D.) فهیمه مرادی افرایی (Ph.D.)* فاطمه لطفی مالدار (Ph.D.)* عباس
حاجی آخوندی (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف: جنس بومادران (*Achillea*) از خانواده کاسنی (Asteraceae) جایگاه قابل توجهی در طب سنتی ایران دارد. آشیل تالاگونیکا و آشیل تینوئی فولیا دو گونه از 19 گونه یافت شده از این جنس می باشد که به طور وسیعی در مناطق شمالی ایران می روید. در این تحقیق اثر سمیت سلولی این دو گونه برای اولین بار به روش ارزیابی کشندگی میگو آب شور (Lethality Assay Brine shrimp) بررسی شد. مواد و روش ها: این بررسی یک کارآزمایی بالینی است که در آن گیاهان پس از جمع آوری خشک و خرد شده و توسط حلال های اتیل استات، متانول و متانول: آب (1:1) و به روش تراوشی (Percolation) مورد عصاره گیری قرار گرفتند. اثر کشندگی عصاره های تام بر لاروهای آرتمیا سالینا (*Artemia Salina*) در غلظت های اولیه 10، 100 و 1000 میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره مورد بررسی قرار گرفت. پس از دستیابی به نتایج اولیه، آزمایش در غلظت های 250، 500 و 750 میکروگرم بر میلی لیتر به روش مشابه تکرار شد. نتایج حاصله تحت مطالعات آماری به روش تحلیل براساس حداقل انحراف از میزان متوسط (Probit analysis) قرار گرفت. یافته ها: از میان عصاره های مورد بررسی، عصاره اتیل استاتی و متانولی از هر دو گیاه با LC_{50} کوچکتر از 1000 qM واجد اثرات سمیت سلولی و عصاره های هیدروالکلی با LC_{50} بزرگتر از 1000 qM فاقد اثر شناخته شدند. عصاره اتیل استاتی گیاه آشیل تالاگونیکا (*Achillea talagonica*) با LC_{50} معادل 413 qM موثرترین عصاره شناخته شد. استنتاج: هر دو گونه از جنس بومادران دارای اثرات سمیت سلولی می باشند و اثرات مذکور با افزایش قطبیت عصاره ها کاهش می یابد. می توان نتیجه گرفت که ترکیبات سمی موجود در این جنس، دارای ساختمان های غیر قطبی می باشند. از دیگر سویی به یقین گلیکوزیدهای فنلی و آلکالوئیدهای بتائینی که قطبیت بالایی داشته و در عصاره آبی- متانولی استخراج می شوند، نقشی در بروز اثرات ندارند.

واژه های کلیدی : آشیل تالاگونیکا (*Achillea talagonica*) ، آشیل تینوئی فولیا (*Achillea tenuifolia*) ، سمیت سلولی ، آرتمیا سالینا (*Artemia salina*)

E این تحقیق طی شماره 60- 83 در شورای پژوهشی دانشگاه ثبت شده و با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی مازندران انجام شده است.

* متخصص فارماکونوزی، عضو هیأت علمی (استادیار) دانشگاه علوم پزشکی مازندران⁺ * ساری :
 کیلومتر 18 جاده خزر- دانشکده داروسازی
 ** متخصص آمار حیاتی، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی تهران
 داروسازی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران *** دانشجوی دکتری
 **** متخصص فارماکونوزی، دانشیار دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران
 E تاریخ دریافت : 83/9/9 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : 83/11/3 تاریخ
 تصویب: 84/5/26

مقدمه

شده است (2). از جمله گیاهان خانواده کاسنی، جنس بومادران آشیل (Achilles) را می‌توان نام برد که شامل 115 گونه بوده و عموماً در نیمکره شمالی زمین رویش دارند. این جنس در ایران دارای 19 گونه گیاه علفی چند ساله و غالباً

معطر است. برخی از مهم‌ترین گونه‌های این جنس عبارتند از آشیل و پهللمسی ئی⁷، آشیل بپراستیئی⁸، آشیل کنفرتا⁹، آشیل میله فولیوم نوبلیس¹⁰ که در مناطق مختلفی از ایران می‌روید (4,3). بومادران (Achillea) را از روزگاران گذشته می‌شناخته‌اند و خواص درمانی و دارویی مختلفی برای آن ذکر کرده‌اند. در طب سنتی دم کرده سرشاخه‌های گلدار بومادران، التیام‌دهنده زخم‌ها و جراحات است، در رفع گاستریت‌های حاد و مزمن، نفخ و سوء هاضمه مفید ذکر شده، مصرف جوشانده آن در برخی نواحی ایتالیا جهت درمان تب‌های نوبه بین مردن معمول می‌باشد (5). گونه

آشیل‌تالاکونیکا (A. talagonica)

آندمیک (انحصاری) ایران می‌باشد و اثرات مهارکننده ایمنی آن در مطالعات قبلی به اثبات رسیده (6) و گونه آشیل تنیوئی‌فولیا (A. tenuifolia) نیز که در ایران رویش دارد، از نظر اثرات ضدقارچی علیه تریکوفیتون و روکوزیوم (Trycophyton verucosum)، تریکوفیتون منتاگروفیت‌ها (T. mentagrophytes)،

امروزه مبارزه با برخی انواع سرطان، به‌خصوص تومورهای که رشد سریع دارند، تا حدودی موفقیت‌آمیز بوده است. درمان سرطان به دلیل محدودیت‌های بنیادی در انجام کار، بسیار مشکل‌تر از درمان دیگر بیماری‌ها است. مهم‌ترین محدودیت کشتن با غیرفعال کردن سلول‌های تومور در حضور سلول‌های طبیعی بدون بروز سمیت بر سلول‌های طبیعی است. به منظور دستیابی و تکامل داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی نیاز به یکسری آزمایش‌های غربالگری (Screening) عصاره‌های خام وجود دارد. چندین نوع از عوامل ضد سرطان برای آزمون غربالگری مورد توجه می‌باشند از آن جمله می‌توان ترکیبات دارای اثرات سمیت سلولی و ترکیبات موثر بر سیستم ایمنی را نام برد (1). یکی از معتبرترین آزمون‌ها برای سنجش اثرات سمیت سلولی، آزمون میگوآب شور (Brine Shrimp test) می‌باشد که به وسیله انستیتوی ملی سرطان در آمریکا (NCI) ¹ ارائه شده است (2). تاکنون برخی از جنس‌های خانواده گیاهی کاسنی (Asteracea) بومی کشور آرژانتین با روش BST مورد بررسی قرار گرفته که از آن میان می‌توان گونه‌های کروتون تیجلیوم²، آمیگدالوئیدها³، ایرماکارپوس ستیجروس⁴، آشیروکلین فلکسید⁵ و یوپاتروئیوم اسپپی⁶ را نام برد که اثرات سمیت سلولی جالب توجهی از آن‌ها مشاهده

7. A. Wilhelmsii

8. A. biebersteini

9. A. conferta

10. A. millefolium nobilis

1. National Cancer Institute

2. Croton tiglium

3. Euphorbia amygdaloides

4. Eramcarpus setigerus

5. Achytoclin flaccida

6. Eupatium SPP

آب (1:1) و به روش تراوش تحت
عصاره‌گیری قرار گرفت. عمل
تراوش به ترتیب توسط هر یک
از حلال‌ها به‌صورت متوالی و
برای هر گیاه سه‌بار به مدت
24 ساعت انجام شد. عصاره‌های
حاصله پس از صاف شدن، تحت خلاء
دوار تغلیظ و در دستگاه
منجمدکننده و خشک‌کن، کاملاً
خشک گردید. سپس غلظت‌های
مختلفی از عصاره‌ها در نرمال
سالین (در مورد عصاره‌های
اتیل‌استاتی در نرمال سالین با
کمک- حلال توئین- 80) تهیه و
مورد آزمون زیست‌شناختی
قرار گرفت. لازم به ذکر
است که از روش رقیق نمودن
متوالی (Serial dilution) برای
تهیه غلظت‌های مختلف یک
عصاره خاص استفاده گردیده
است.

۰۰۰۰۰۰ ٸ ٸٸ ٸٸ

ٸٸ ۰۰۰۰۰۰ٸٸ ۰۰ٸ٨ ۰۰۰۰۰۰

: (*Brine shrimp Lethality Assay*) θ ۰۰۰

تخم های خشک آرتمیاسالینا (*Artemia salina*) جهت تفریح در آب دریای مصنوعی (معادل سالین 5، 3 درصد وزنی- حجمی) در دمای 28 درجه سانتیگراد ریخته شد. تخمها در آکواریوم تحت نور و هوادهی مداوم، پس از 48 ساعت تفریح (hatching) گردید. لاروهای فعال با استفاده از ویژگی فوتوتروپی از پوسته ها و تخم های تفریح نشده جدا شدند. ابتدا غلظتهای 1000، 100، 10 میکرومولار از عصاره ها تهیه و اثر سمیت سلولی آنها در حضور لاروهای فعال در صفحه میکروتیتر (24 چاهک) بررسی شد. در چاهک های آزمون، میزان 500 میکرولیتر سوسپانسیون لارو حاوی 10-20 لارو فعال به همراه 500 میکرولیتر محلول عصاره با غلظت مشخص جای گرفت. نتایج کشندگی هر غلظت از عصاره ها

تریكوفیتون شوئن لئینی (T.schoenleinii) مورد توجه است(7). در مطالعات کتابخانه ای گزارشی از اثرات سمیت سلولی این دو گونه ایرانی وجود ندارد. در این پژوهش اثرات کشندگی سلولی این گیاهان با روش آزمون میگو آبشور (BST) برای اولین بار مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع آوري گياه : اين بررسي
يك کارآزمایي باليني است که
در آن ابتدا سرشاخه هاي هوايي
و گلدان

آشیلا تالاگونیکا بوئیس (Achillea talagonica Boiss) در تیر ماه 1380 از ارتفاعات طالقان واقع در شمال ایران جمع آوری و مورد تایید قرار گرفت و یک نمونه از آن در محل نگهداری گیاهان (Herbarium) دانشکده داروسازی دانشگاه شهید بهشتی و نمونه دیگر در محل نگهداری گیاهان دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران حفظ می شود. گیاه آشیلا تنیوئیفولیالام (Acheillea tenuifolia Lam) نیز در خرداد همان سال از سه راهی آبیک- خروجی اتوبان کرج به سمت طالقان جمع آوری، توسط گیاه شناس مورد تایید قرار گرفته و یک نمونه از آن در محل نگهداری گیاهان دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مازندران حفظ می شود. هر دو گیاه دور از نور و حرارت مستقیم خشک و به قطعات کوچکتر خرد شدند.

قطعات خرد شده سرشاخه هوایی
گیاهان (A.talagonica) (700 گرم) و
آشیلاتاگونیفولیا (A.tenuifolia)
(180 گرم) توسط حلال های
اتیل، استات، متانول و متانول -

6/37	3/60	1/37	آشیل تالگونیکا (Achillea talagonica)
9/33	7/22	5/10	آشیل تنیوفیولیا (Achillea tenuifolia)

نمودار شماره 1: میانگین درصد مرگ و میر لاروهای آرتمیا سالینا (Artemia salina) در حضور غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی گیاه آشیل تالگونیکا (Achillea talagonica)

نمودار شماره 2: میانگین درصد مرگ و میر لاروهای آرتمیا سالینا (Artemia salina) در حضور غلظت‌های مختلفی از عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی گیاه آشیل تنیوفیولیا (Achillea tenuifolia)

LC₅₀ هر یک از عصاره‌ها که طبق روش آماری تحلیل براساس حداقل انحراف از میزان متوسط (Probit Analysis) با بازه اطمینان 95 درصد محاسبه گردیده، در جدول شماره 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 2: LC₅₀ محاسبه شده (با واحد میکرومولار) برای هر یک از عصاره‌های گیاهان آشیل تنیوفیولیا (Achillea tenuifolia) و آشیل تالگونیکا (Achillea talagonica) در مقایسه با کنترل مثبت برترین هیدروکلراید (LC₅₀=25)

نوع عصاره	اتیل استاتی	متانولی	متانولی-آبی
گونه گیاهی	آشیل تالگونیکا	آشیل تنیوفیولیا	آشیل تالگونیکا

بر لاروهای آرتمیا سالینا (Artemia salina) 3 بار مشاهده شد. برای هر غلظت سه چاهک کاملاً مشابه چاهک آزمون ولی فاقد عصاره در نظر گرفته شد. صفحات در دمای 28-30 درجه سانتیگراد انکوبه شده و پس از 24 ساعت تعداد لاروهای زنده باقیمانده در چاهک‌ها توسط حلقه شمارش گردید (8). پس از دستیابی به نتایج اولیه در مورد عصاره‌هایی که اثر سمی سلولی آن‌ها کمتر از 1000 میکرومولار بود، آزمون در غلظت‌های 500، 250، 750 میکرومولار تکرار گردید. غلظت‌های مختلفی از آلکالوئیدبربرین هیدروکلراید به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نتایج خام به صورت درصد مرگ و میر بیان شده و برای محاسبه LC₅₀ وارد آزمون آماری تحلیل براساس حداقل انحراف از میزان متوسط (Probit Analysis) شد.

یافته‌ها

درصد عصاره‌های به دست آمده از میزان 180 گرم گیاه آشیل تنیوفیولیا (A. tenuifolia) و 700 گرم از گیاه آشیل تالگونیکا (A. talagonica) در جدول شماره 1 خلاصه شده است. میانگین درصد مرگ و میر لاروها در غلظت‌های مختلف از عصاره‌های اتیل استاتی و متانولی گیاهان مورد مطالعه در نمودارهای 1 و 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 1: بازدهی عملیات عصاره‌گیری درمورد گیاهان آشیل تالگونیکا و آشیل تنیوفیولیا (A. tenuifolia, Achillea talagonica)

نوع عصاره	درصد وزن - وزن عصاره خشک به پودر گیاهی	اتیل استاتی	متانولی	آبی
گونه گیاهی	آشیل تالگونیکا	آشیل تنیوفیولیا	آشیل تالگونیکا	آشیل تالگونیکا

آشیلتا لاگونیکا (Achillea talagonica)	413	752	>1000
آشیل تینوئوفولیا (Achillea tenuifolia)	534/5	956	>1000

بحث

دستیابی و تکامل داروهای ضدسرطان از منابع طبیعی نیازمند آزمون‌های غربالگری عصاره‌های خام (Crud drugs) است. یکی از معتبرترین آزمون‌ها برای سنجش اثرات سمیت سلولي، آزمون میگوآبشور (BST) می‌باشد که به وسیله انستیتو ملی سرطان در آمریکا (NCI) ارائه و گیاهان بسیاری را با این روش مورد آزمایش قرار داده‌اند. در این آزمون‌ها توانایی مهار رشد یا کشتن سلول‌ها اندازه‌گیری می‌شود. از مزایای این روش این است که اگرچه عوامل فعال با هر مکانیسمی که عمل‌کنند تشخیص داده می‌شوند، تنها عواملی قابل ردیابی هستند که بتوانند وارد سلول‌ها شده و یا دیواره سلولي را تخریب نمایند (8 و 7).

در این پروژه گونه‌هایی از جنس آشیل (Achillea) که در ایران می‌روید برای اولین بار به منظور مطالعات سمیت سلولي براساس روش فوق‌الذکر انتخاب شده‌اند. به این منظور عصاره‌هایی با قطبیت متفاوت از سرشاخه‌های هوایی گلدار گیاهان مذکور به روش تراوش تهیه و سپس اثرات کشندگی سلولي آن‌ها بر لاروهای فعال آرتمیاسالینا (Artemia salina) با روش آزمون میگوآبشور (BST) مورد مطالعه قرار گرفته است. همان‌گونه که نتایج پس از محاسبات آماری نشان می‌دهد، عصاره‌های هیدروالکلی (آبی-متانولي 50 درصد) از هر دو گیاه که قطبیت‌ترین عصاره‌های گیاهی در این مطالعه به شمار می‌آیند، در هیچ‌یک از غلظت‌های به کار رفته سمیت سلولي ایجاد

نکرده و LC_{50} آن‌ها بالاتر از 1000 میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شده است (جدول شماره 2). آن‌جایی‌که LC_{50} بیش از 1000 از نظر اثرات سمیت سلولي فاقد ارزش می‌باشد، این عصاره‌ها موثر شناخته نشده‌اند. عمده‌ترین ترکیبات شناخته شده موجود در عصاره‌های آبی-متانولي گونه‌های مختلف جنس بومادران، آلکالوئیدهای بتائینی و اسیدهای آمینه آزاد نظیر پرولین می‌باشند (10) که به نظر می‌رسد فاقد اثر کشندگی سلولي هستند. مطالعه عصاره‌های اتیل استاتی و متانولي هر دو گیاه در غلظت‌های 10، 100 و 1000 میکرومولار نشان داد که این عصاره‌ها در غلظت‌های 10 و 100 اثر سمیت سلولي نشان ندادند اما در غلظت 1000 میکرومولار در مقایسه با شاهد موثر بودند. به همین دلیل در غلظت‌های 500، 250 و 750 میکرومولار آزمون شده و LC_{50} آن‌ها بر مبنای تحلیل آماری بر اساس حداقل انحراف از میزان توسط (Probit Analysis) محاسبه گردید (جدول شماره 2). مقادیر LC_{50} گویای آن است که عصاره‌های اتیل‌استاتی هر دو گونه سمیت سلولي بیشتری نسبت به عصاره‌های متانولي این گیاهان داشته (نمودارهای 1 و 2، جدول شماره 2) و نیز عصاره اتیل استاتی گیاه آشیل (Achillea talagonica) موثرترین عصاره دارای سمیت سلولي شناخته شده است. اثرات سمیت سلولي گیاه آشیل تالاگونیکا (Achillea talagonica) در تمامی عصاره‌ها بیشتر آشیل‌تینوئوفولیا (Achillea tenuifolia) بوده است. کاهش تدریجی اثر بخشی از عصاره‌های غیرقطبی به عصاره‌های قطبی‌تر نشانه آن

که دو گونه اخیر از جنس بومادران دارای اثر سمیت سلولی قابل قیاس با یوپاتوریوم آرنوتیانوم (*Eupatorium arnottianum*) می‌باشند. عصاره دی‌کلرومتاتی یوپاتوریوم دارای LC_{50} معادل 502 میکرومولار است. جنس‌های نظیر باکاریس (*Baccharis*) و گونه‌هایی دیگر یوپاتوریوم همچون یوپاتوریوم بونیئی فولیوم (*E. buniifolium*) به ترتیب با LC_{50} معادل 217 و 154 میکرومولار اثر سمیت سلولی بیشتری نسبت به جنس بومادران نشان داده‌اند (8 و 3).

است که احتمالاً ترکیبات غیرقطبی همچون فلاونوئیدهای متوکسیله و ترپنوئیدها به ویژه سزکوئی‌ترین (Sesquiterpene lactones) و تری‌ترین‌های (Triterpen) موجود در عصاره اتیل استاتی این گیاهان (11) می‌تواند در بروز اثرات سمیت سلولی نقش مهمی را ایفا نمایند که البته اثبات آن نیازمند جداسازی و شناسایی ترکیبات مزبور از این گیاهان بوده و در پروژه مصوب دیگری در دانشکده داروسازی در دست انجام می‌باشد.

مقایسه نتایج حاضر با آنچه در دیگر منابع معتبر منتشر گردیده نشان می‌دهد

فهرست منابع

1. Hanskell CM. *Cancer Treatment*. 4th edn, Philadelphia: W. B. Saunders Company: 1995.
2. Mongelli E, Martino V, Coussio J. Screening of Argentine medicinal plants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. *Int J. Pharmacogn.* 1996; 34(4): 249-250.
3. Bremer K. *Astraceae; cladistics and clasification* oregon. Timber press, 1994.
4. Huber morath A. *Achillea In: Flora Iranica*. (K.H. Rechinger ed). No. 158, Ackademeche Druck- U. Verlagsansfalt, Graz: 1989; pp: 57- 58.
5. Kuhn M.N, Wistone D. *Herbal therapy and suppleaments a scientific traditional approach*; New York Lippin cott; 2000: 347- 350.
6. Rezaei poor R, Saeidnia S, Kamalinejad M. Immunosuppressive activity of *Achillea talagonica* on humune responses in experimental animals. *J. Ethnopharm.* 1999; 65: 273- 276.
7. Amin G, Dehmoobed-sharifabadi A. Salehi Surmaghi MH, Screening of Iranian plants for antifungal activity. *DARU.* 2002; 9(1): 38-47.
8. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam L, Jacobsen LB, Nichols DE. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.* 1982; 45: 31- 34.
9. Setzer WN, Setzer MC, Moriarity DM. Biological activity of the essential oil of *Myrcianthes* sp. Nov, black fruit from monte verde, costa Rica. *Planta Med.* 1999; 65: 468- 469.

10. Mehifuhrer M, Troll K, Auer H, Kobelka W. Betaines and free proline within the achillea mil lefolium group. *Phytochemistry*, 1997; 44: 1067- 1069.
11. Viera LM, Kijoa A, Pereira JA, Gedrist E, Herz W. Germacrenolide and flavonoids from Achillea ageratum. *Phytochemistry*, 1997; 45(1): 111- 115.