Archive of SID

پژوهشي

مجله دانشگاه علوم پزشكي مازندران
دوره پانزدهم شماره 50 بهمن و اسفند سال 1384 (6-1)

بررسي اثرات سميت سلولي گياهان آشيلا تالاگونيكا بوئيز (Achillea talagonica Boiss) و آشيلا تينوئي فوليا لام (A. tenuifolia Lam) به روش ارزيابي سميت سلولي ميگو آب شور (Brine Shrimp Cytotoxicity)

سودابه سعيدنيا(Ph.D.)*+ احمدرضا گوهري(Ph.D.)* محمدرضا گوهري(Ph.D.)**
فهيمه مرادي افراپلي(Ph.D.)*** فاطمه لطفي ماندار(Ph.D.)*** عباس حاجي آخوندي(Ph.D.)****

چكيده

سابقه و هدف: جنس بومادران (Achillea) از خانواده كاسني(Asteraceae) جايگاه قابل توجهي در طب سنتي ايران دارد. آشيلا تالاگونيكا و آشيلا تينوئي فوليا دو نمونه از 19 گونه يافت شده از اين جنس مي‌باشد كه به طور وسيعي در مناطق شمالي ايران مي‌رويد. در اين تحقيق اثر سميت سلولي اين دو گونه براي اولين بار به روش ارزيابي كشندگي ميگوآب شور (Lethality Assay Brine shrimp) بررسي شد.

مواد و روشها: اين بررسي يك كارآزمايي باليني است كه در آن گياهان پس از جمع‌آوري خشك و خردشده و توسط حلال‌هاي اتيل استات، متانول و متانول: آب(1:1) و به روش تراوشي(Percolation) مورد عصاره‌گيري قرار گرفتند. اثركشندگي عصاره‌هاي تام بر لاروهاي آرتميا سالينا(Artemia Salina) در غلظت‌هاي اوليه 10، 100 و 1000 ميكروگرم بر ميلي‌ليتر از عصاره مورد بررسي قرار گرفت. پس از دستيابي به نتايج اوليه، آزمايش در غلظت‌هاي 250، 500 و 750 ميكروگرم بر ميلي‌ليتر به روش مشابه تكرار شد. نتايج حاصله تحت مطالعات آماري به روش تحليل براساس حداقل انحراف از ميزان متوسط(Probit analysis) قرار گرفت.

يافته‌ها: از ميان عصاره‌هاي مورد بررسي، عصاره اتيل استاتي و متانولي از هر دو گياه با LC_{50} كوچكتر از 1000 qM واجد اثرات سميت سلولي و عصاره‌هاي هيدروالكلي با LC_{50} بزرگتر از 1000 qM فاقد اثر شناخته شدند. عصاره اتيل استاتي گياه آشيلا تالاگونيكا (Achillea talagonica) با LC_{50} معادل 413 qM موثرترين عصاره شناخته شد.

استنتاج: هردوگونه ازجنس بومادران داراي اثرات سميت سلولي مي‌باشند و اثرات مذكور با افزايش قطبيت عصاره‌ها كاهش مي‌يابد. مي‌توان نتيجه گرفت كه تركيبات سمي موجود در اين جنس، داراي ساختمان‌هاي غيرقطبي مي‌باشند. از ديگر سوي به يقين گليكوزيدهاي فنلي و آلكالوئيدهاي بتائيني كه قطبيت بالايي داشته و در عصاره آبي- متانولي استخراج مي‌شوند، نقشي در بروز اثرات ندارند.

واژه‌هاي كليدي: آشيلاتالاگونيكا (Achillea talagonica)، آشيلاتينوئي‌فوليا (Achillea tenufolia)، سميت سلولي، آرتميا سالينا (Artemia salina)

E اين تحقيق طي شماره 60- 83 در شوراي پژوهشي دانشگاه ثبت شده و با حمايت مالي دانشگاه علوم پزشكي مازندران انجام شده است.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

* متخصص فارماكوگنوزي، عضو هيأت علمي (استاديار) دانشگاه علوم پزشكي مازندران + * ساري : كيلومتر 18 جاده خزر- دانشكده داروسازي
** متخصص آمار حياتي، دانشكده بهداشت دانشگاه علوم پزشكي تهران *** دانشجوي دكتراي داروسازي، دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي مازندران
**** متخصص فارماكوگنوزي، دانشيار دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تهران
E تاريخ دريافت : 83/9/9 تاريخ ارجاع جهت اصلاحات : 83/11/3 تاريخ تصويب: 84/5/26

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

مقدمه

امروزه مبارزه با برخي انواع سرطان، به‌خصوص تومورهايي كه رشد سريع دارند، تاحدودي موفقيت‌آميز بوده است. درمان سرطان به دليل محدوديت‌هاي بنيادي در انجام كار، بسيار مشكل‌تر از درمان ديگر بيماري‌ها است. مهم‌ترين محدوديت كشتن با غيرفعال كردن سلول‌هاي توموز در حضور سلول‌هاي طبيعي بدون بروز سميت بر سلول‌هاي طبيعي است. به منظور دستيابي و تكامل داروهاي ضدسرطان ازمنابع طبيعي نياز به‌يكسري آزمايش‌هاي غربالگري(Screening) عصاره‌هاي خام وجود دارد. چندين نوع از عوامل ضد سرطان براي آزمون غربالگري مورد توجه مي‌باشند از آن جمله مي‌توان تركيبات داراي اثرات سميت سلولي و تركيبات موثر بر سيستم ايمني را نام برد(1). يكي از معتبرترين آزمون‌ها براي سنجش اثرات سميت سلولي، آزمون ميگوآب شور (BST) Brine Shrimp test مي‌باشد كه به وسيله انستيتوي ملي سرطان در آمريكا (NCI)[1] ارائه شده است(2). تاكنون برخي ازجنس‌هاي خانواده گياهي كاسني(Asteracea) بومي كشور آرژانتين با روش BST مورد بررسي قرار گرفته كه از آن ميان مي‌توان گونه‌هاي كروتون تيجليوم[2]، يوفوربيا آميگدالوئيدها[3]، ايرماكارپوس ستيجروس[4]، آشيروكلين فلكسيدا[5] و يوپاتروئيوم اسپي‌پي[6] را نام برد كه اثرات سميت سلولي جالب توجهي از آن‌ها مشاهده شده است(2). از جمله گياهان خانواده كاسني، جنس بومادران آشيلا(Achilles) را مي‌توان نام برد كه شامل 115 گونه بوده و عموماً در نيمكره شمالي زمين رويش دارند. اين جنس در ايران داراي 19 گونه‌گياه علفي چند ساله و غالباً معطر است. برخي ازمهم‌ترين‌گونه‌هاي اين‌جنس عبارتند از آشيلا ويلهلمسي ئي[7]، آشيلا ببيراستيتي‌ئي[8]، آشيلا كنفرتا[9]، آشيلا ميله فوليوم نوبي‌ليس[10] كه در مناطق مختلفي از ايران مي‌رويد(3،4). بومادران(Achillea) را از روزگاران گذشته مي‌شناخته‌اند و خواص درماني و دارويي مختلفي براي آن ذكركرده‌اند. در طب سنتي دم كرده سرشاخه‌هاي گلدار بومادران، التيام‌دهنده زخم‌ها وجراحات است، در رفع‌گاستريت‌هاي حاد ومزمن، نفخ و سوء هاضمه مفيد ذكر شده، مصرف جوشانده آن در برخي نواحي ايتاليا جهت درمان تب‌هاي نوبه بين مردن معمول‌مي‌باشد(5). گونه آشيلاتالاگونيكا (A.talagonica) آندميك (انحصاري) ايران مي‌باشد و اثرات مهاركننده ايمني آن در مطالعات قبلي به اثبات رسيده(6) و گونه آشيلا تنيوئي‌فوليا (A.teunuifilia) نيزكه درايران رويش دارد، ازنظر اثرات‌ضدقارچي عليه تريكوفيتون وروكوزيوم (Trycophyton verucosum)، تريكوفيتون منتاگروفيت‌ها (T.mentagrophytes)،

1. National Cancer Institue
2. Croton tiglium
3. Euphorbia amygdaloides
4. Eramcarpus setigerus
5. Achytoclin flaccida
6. Eupatrium SPP

7. A. Wilhelmsii
8. A. biebersteinni
9. A. conferta
10. A. millefolium nobilis

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

تريكوفيتون شوئن لئينيئي (T.schoenleinii) مورد توجه است(7).
در مطالعات كتابخانه‌اي گزارشي از اثرات سميت سلولي اين دو گونه ايراني وجود ندارد. در اين پژوهش اثرات كشندگي سلولي اين گياهان با روش آزمون ميگوآبشور(BST) براي اولين بار مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوري گياه : اين بررسي يك كارآزمايي باليني است كه در آن ابتدا سرشاخه‌هاي هوايي و گلدار گياه

آشيلا تالاگونيكا بوئيس (Achillea talagonica Boiss) در تير ماه 1380 از ارتفاعات طالقان واقع در شمال ايران جمع‌آوري و مورد تاييد قرار گرفت و يك نمونه از آن در محل نگه‌داري گياهان(Herbarium) دانشكده داروسازي دانشگاه شهيد بهشتي و نمونه ديگر در محل نگه‌داري گياهان دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي مازندران حفظ مي‌شود. گياه آشيلا تنيوئي‌فوليالام (Acheillea tenuifolia Lam) نيز در خرداد همان سال از سه راهي آبيك- خروجي اتوبان كرج به سمت طالقان جمع‌آوري، توسط گياه‌شناس مورد تاييد قرار گرفته و يك نمونه از آن در محل نگه‌داري گياهان دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي مازندران حفظ مي شود. هر دو گياه دور از نور و حرارت مستقيم خشك و به قطعات كوچك‌تر خرد شدند.

ɵO Ã ɵŭO :

قطعات خردشده سرشاخه هوايي گياهان آشيلاتالاگونيكا (A.talagonica) (700 گرم) و آشيلاتنيوئي‌فوليا (A.tenuifolia) (180 گرم) توسط حلال‌هاي اتيل‌استات، متانول و متانول- آب (1:1) و به روش تراوش تحت عصاره‌گيري قرار گرفت. عمل تراوش به ترتيب توسط هر يك از حلال‌ها به‌صورت متوالي و براي هر گياه سه‌بار به مدت 24 ساعت انجام شد. عصاره‌هاي حاصله پس از صاف شدن، تحت خلاء دوار تغليظ و در دستگاه منجمدكننده و خشك‌كن، كاملاً خشك گرديد. سپس غلظت‌هاي مختلفي از عصاره‌ها در نرمال سالين (در مورد عصاره‌هاي اتيل‌استاتي در نرمال سالين با كمك- حلال توئين- 80) تهيه و مورد آزمون زيستشناختي قرار گرفت. لازم به ذكر است كه از روش رقيق نمودن متوالي (Serial dilution) براي تهيه غلظ‌هاي مختلف يك عصاره خاص استفاده گرديده است.

ɵOOOOŭ¯ŭOO ɵŭ
ÙĂ OOOOOã OOÃʰ OOOOO
: (Brine shrimp Lethality Assay)ɵ OOO

تخم‌هاي خشك آرتمياسالينا (Artemia salina) جهت تفريخ در آب درياي مصنوعي(معادل سالين 5، 3 درصد وزني- حجمي) در دماي 28 درجه سانتي‌گراد ريخته شد. تخم‌ها در آكواريوم تحت نور و هوادهي مداوم، پس از 48 ساعت تفريخ (hatching) گرديد. لاروهاي فعال با استفاده از ويژگي فوتوتروپي از پوسته‌ها و تخم‌هاي تفريخ‌نشده جدا شدند. ابتدا غلظت‌هاي 10، 100، 1000 ميكرومولار از عصاره‌ها تهيه و اثر سميت سلولي آن‌ها در حضور لاروهاي فعال در صفحه ميكروتيتر(24 چاهك) بررسي شد. در چاهك‌هاي آزمون، ميزان 500 ميكروليتر سوسپانسيون لارو حاوي 10-20 لارو فعال به همراه 500 ميكروليتر محلول عصاره با غلظت مشخص جاي گرفت. نتايج كشندگي هر غلظت از عصاره‌ها

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

بر لاروهاي آرتمياسالينا (Artemia salina) 3 بار مشاهده شد. براي هر غلظت سه چاهك كاملاً مشابه چاهك آزمون ولي فاقد عصاره در نظر گرفته شد. صفحات در دماي 28- 30 درجه سانتيگراد انكوبه شده و پس از 24 ساعت تعداد لاروهاي زنده باقيمانده در چاهكها توسط حلقه شمارش گرديد(8). پس از دستيابي به نتايج اوليه در مورد عصارههايي كه اثر سمت سلولي آنها كمتر از 1000 ميكرومولار بود، آزمون در غلظتهاي 250،500، 750 ميكرومولار تكرار گرديد. غلظتهاي مختلفي از آلكالوئيدبربرين هيدروكلايد بهعنوان كنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نتايج خام بهصورت درصد مرگ و مير بيان شده و براي محاسبه LC_{50} وارد آزمون آماري تحليل براساس حداقل انحراف از ميزان متوسط (Probit Analysis) شد.

يافتهها

درصد عصارههاي به دست آمده از ميزان 180 گرم گياه آشيلاتنيوئيفوليا (A.tenuifolia) و 700 گرم از گياه آشيلا تالاگونيكا (A.talagonica) درجدول‌شماره1 خلاصه شده است. ميانگين درصد مرگ و مير لاروها در غلظتهاي مختلف از عصارههاي اتيل استاتي و متانولي گياهان مورد مطالعه در نمودارهاي 1 و 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 1: بازدهي عمليات عصارهگيري درموردگياهان آشيلا تالاگونيكا و آشيلاتنيويفوليا (A.tenuifolia,Achillea talagonica)

نوع عصاره گونه گياهي	درصدوزني- وزنيعصاره خشك به پودرگياهي		
	اتيل‌استاتي	متانولي	آبي-متانولي(1:1)
آشيلا تالاگونيكا (Achillea talagonica)	1/37	3/60	6/37
آشيلاتنيويفوليا (Achillea tenuifolia)	5/10	7/22	9/33

نمودار شماره 1: ميانگين درصد مرگ و مير لاروهاي آرتميا سالينا (Artemia salin) در حضور غلظتهاي مختلفي از عصارههاي اتيل‌استاتي و متانولي گياه آشيلاتالاگونيكا (Achillea talagonica)

نمودار شماره 2: ميانگين درصد مرگ و مير لاروهاي آرتمياسالينا (Artemia salina) در حضور غلظتهاي مختلفي از عصارههاي اتيل‌استاتي و متانولي گياه آشيلاتنيويفوليا (Achillea tenuifolia)

LC_{50} هر يك از عصارهها كه طبق روش آماري تحليل براساس حداقل انحراف از ميزان متوسط(Probit Analysis) با بازه اطمينان 95 درصد محاسبه گرديده، در جدول شماره 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 2: LC_{50} محاسبه شده (با واحد ميكرومولار) براي هر يك از عصارههاي گياهان آشيلا تينوئيفوليا (Achillea tenuifolia) و آشيلاتالاگونيكا (Achillea talagonica) در مقايسه با كنترل مثبت بربرين هيدروكلرايد (LC50= 25)

نوع عصاره گونه گياهي	اتيل‌استاتي	متانولي	متانولي-آبي

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

آشیلاتالاگونیکا (Achillea talagonica)	413	752	>1000
آشیلا تینوئیفولیا (Achillea tenuifolia)	534/5	956	>1000

بحث

دستیابي و تکامل داروهاي ضدسرطان از منابع طبیعي نیازمند آزمون‌هاي غربالگري عصاره‌هاي خام(Crud drugs) است. یکي از معتبرترین آزمون‌ها براي سنجش اثرات سمیت سلولي، آزمون میگوآبشور(BST) مي‌باشد که به‌وسیله انستیتو ملي سرطان در آمریکا(NCI) ارائه و گیاهان بسیاري را با این روش مورد آزمایش قرار داده‌اند. در این آزمون‌ها توانایي مهار رشد یا کشتن سلول‌ها اندازه‌گیري مي‌شود. از مزایاي این روش این است که اگرچه عوامل فعال با هر مکانیسمي که عمل‌کنند تشخیص داده مي‌شوند، تنها عواملي قابل ردیابي هستند که بتوانند وارد سلول‌ها شده و یا دیواره سلولي را تخریب نمایند(7و8).

در این پروژه گونه‌هایي از جنس آشیلا(Achillea) که در ایران مي‌رویند براي اولین‌بار به منظور مطالعات سمیت سلولي براساس روش فوق‌الذکر انتخاب شده‌اند. به این منظور عصاره‌هایي با قطبیت متفاوت از سرشاخه‌هاي هوایي گلدار گیاهان مذکور به روش تراوش تهیه و سپس اثرات کشندگي سلولي آن‌ها بر لاروهاي فعال آرتمیاسالینا (Artemia salina) با روش آزمون میگوآبشور (BST) مورد مطالعه قرار گرفته است. همان‌گونه که نتایج پس از محاسبات آماري نشان مي‌دهد، عصاره‌هاي هیدروالکلي (آبي-متانولي 50 درصد) از هر دو گیاه که قطبي‌ترین عصاره‌هاي گیاهي در این مطالعه به شمار مي‌آیند، در هیچ‌یک از غلظت‌هاي به کار رفته سمیت سلولي ایجاد نکرده و LC_{50} آن‌ها بالاتر از 1000 میکروگرم بر میلي‌لیتر محاسبه شده است (جدول شماره 2) آن‌جایي‌که LC_{50} بیش از 1000 از نظر اثرات سمیت سلولي فاقد ارزش مي‌باشد، این عصاره‌ها موثر شناخته نشده‌اند. عمده‌ترین ترکیبات شناخته شده موجود در عصاره‌هاي آبي-متانولي گونه‌هاي مختلف جنس بومادران، آلکالوئیدهاي بتائیني و اسیدهاي آمینه آزاد نظیر پرولین مي‌باشند(10) که به‌نظر مي‌رسد فاقد اثر کشندگي سلولي هستند. مطالعه عصاره‌هاي اتیل استاتي و متانولي هر دو گیاه در غلظت‌هاي 10، 100 و 1000 میکرومولار نشان داد که این عصاره‌ها در غلظت‌هاي 10 و 100 اثر سمیت سلولي نشان ندادند اما در غلظت 1000 میکرومولار در مقایسه با شاهد موثر بودند. به همین دلیل در غلظت‌هاي 500، 250 و 750 میکرومولار آزمون شده و LC_{50} آن‌ها بر مبناي تحلیل آماري بر اساس حداقل انحراف از میزان توسط (Probit Analysis) محاسبه گردید (جدول شماره 2). مقادیر LC_{50} گویاي آن است که عصاره‌هاي اتیل‌استاتي هر دو گونه سمیت سلولي بیشتري نسبت به عصاره‌هاي متانولي این گیاهان داشته (نمودارهاي1 و 2، جدول شماره 2) و نیز عصاره اتیل استاتي گیاه آشیلا تالاگونیکا (Achillea talagonica) موثرترین عصاره داراي سمیت سلولي شناخته شده است. اثرات سمیت سلولي گیاه آشیلا تالاگونیکا (Achillea talagonica) در تمامي عصاره‌ها بیشتر آشیلاتنیوئي‌فولیا (Achillea tenuifolia) بوده است. کاهش تدریجي اثربخشي از عصاره‌هاي غیرقطبي به عصاره‌هاي قطبي‌تر نشانه آن

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

است كه احتمالاً تركيبات غيرقطبي همچون فلاوونوئيدهاي متوكسيله و ترپنوئيدها به ويژه سزكوئي‌ترپن (Sesquiterpene lactones) و تري‌ترپن‌هاي (Triterpen) موجود در عصاره اتيل استاتي اين گياهان(11) مي‌تواند در بروز اثرات سميت سلولي نقش مهمي را ايفا نمايند كه البته اثبات آن نيازمند جداسازي و شناسايي تركيبات مزبور از اين گياهان بوده و در پروژه مصوب ديگري در دانشكده داروسازي در دست انجام مي‌باشد.

مقايسه نتايج حاضر با آنچه در ديگر منابع معتبر منتشر گرديده نشان مي‌دهد كه دو گونه اخير از جنس بومادران داراي اثر سميت سلولي قابل قياس با يوپاتوريوم آرنوتيانوم (Eupatorium arnottianum) مي‌باشند. عصاره ديكلرومتاني يوپاتوريوم داراي LC_{50} معادل 502 ميكرومولار است. جنس‌هاي نظير باكاريس (Baccharis) و گونه‌هايي ديگر يوپاتوريوم همچون يوپاتوريوم بوني‌ئي فوليوم (E.buniiffolium) به ترتيب با LC_{50} معادل 217 و 154 ميكرومولار اثر سميت سلولي بيشتري نسبت به جنس بومادران نشان داده اند(3و8).

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 olants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. ***Int J. Pharmacogn.*** 1996; 34(4): 249-250.
3. Bremer K. ***Astraceae; cladistics and clasification*** oregone. Timber press, 1994.
4. Huber morath A. ***Achillea In: Flora Iranica.*** (K.H. Rechinger ed). No. 158, Ackademiche 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 monteverde, costa Rica. ***Planta Med.*** 1999; 65: 468- 469.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

پژوهشي

مجله دانشگاه علوم پزشكي مازندران
دوره پانزدهم شماره 50 بهمن و اسفند سال 1384 (6-1)

بررسي اثرات سميت سلولي گياهان آشيلا تالاگونيكا بوئيز (Achillea talagonica Boiss) و آشيلا تينوئي فوليا لام (A. tenuifolia Lam) به روش ارزيابي سميت سلولي ميگو آب شور (Brine Shrimp Cytotoxicity)

سودابه سعيدنيا(Ph.D.)*+ احمدرضا گوهري(Ph.D.)* محمدرضا گوهري(Ph.D.)**
فهيمه مرادي افراپلي(Ph.D.)*** فاطمه لطفي ماندار(Ph.D.)*** عباس حاجي آخوندي(Ph.D.)****

چكيده

سابقه و هدف: جنس بومادران (Achillea) از خانواده كاسني(Asteraceae) جايگاه قابل توجهي در طب سنتي ايران دارد. آشيلا تالاگونيكا و آشيلا تينوئي فوليا دو نمونه از 19 گونه يافت شده از اين جنس مي‌باشد كه به طور وسيعي در مناطق شمالي ايران مي‌رويد. در اين تحقيق اثر سميت سلولي اين دو گونه براي اولين بار به روش ارزيابي كشندگي ميگوآب شور (Lethality Assay Brine shrimp) بررسي شد.

مواد و روشها: اين بررسي يك كارآزمايي باليني است كه در آن گياهان پس از جمع‌آوري خشك و خردشده و توسط حلال‌هاي اتيل استات، متانول و متانول: آب(1:1) و به روش تراوشي(Percolation) مورد عصاره‌گيري قرار گرفتند. اثركشندگي عصاره‌هاي تام بر لاروهاي آرتميا سالينا(Artemia Salina) در غلظت‌هاي اوليه 10، 100 و 1000 ميكروگرم بر ميلي‌ليتر از عصاره مورد بررسي قرار گرفت. پس از دستيابي به نتايج اوليه، آزمايش در غلظت‌هاي 250، 500 و 750 ميكروگرم بر ميلي‌ليتر به روش مشابه تكرار شد. نتايج حاصله تحت مطالعات آماري به روش تحليل براساس حداقل انحراف از ميزان متوسط(Probit analysis) قرار گرفت.

يافته‌ها: از ميان عصاره‌هاي مورد بررسي، عصاره اتيل استاتي و متانولي از هر دو گياه با LC_{50} كوچكتر از 1000 qM واجد اثرات سميت سلولي و عصاره‌هاي هيدروالكلي با LC_{50} بزرگتر از 1000 qM فاقد اثر شناخته شدند. عصاره اتيل استاتي گياه آشيلا تالاگونيكا (Achillea talagonica) با LC_{50} معادل 413 qM موثرترين عصاره شناخته شد.

استنتاج: هردوگونه ازجنس بومادران داراي اثرات سميت سلولي مي‌باشند و اثرات مذكور با افزايش قطبيت عصاره‌ها كاهش مي‌يابد. مي‌توان نتيجه گرفت كه تركيبات سمي موجود در اين جنس، داراي ساختمان‌هاي غيرقطبي مي‌باشند. از ديگر سوي به يقين گليكوزيدهاي فنلي و آلكالوئيدهاي بتائيني كه قطبيت بالايي داشته و در عصاره آبي- متانولي استخراج مي‌شوند، نقشي در بروز اثرات ندارند.

واژه‌هاي كليدي: آشيلاتالاگونيكا (Achillea talagonica)، آشيلاتينوئي‌فوليا (Achillea tenufolia)، سميت سلولي، آرتميا سالينا (Artemia salina)

E اين تحقيق طي شماره 60- 83 در شوراي پژوهشي دانشگاه ثبت شده و با حمايت مالي دانشگاه علوم پزشكي مازندران انجام شده است.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

* متخصص فارماكوگنوزي، عضو هيأت علمي (استاديار) دانشگاه علوم پزشكي مازندران + * ساري : كيلومتر 18 جاده خزر- دانشكده داروسازي
** متخصص آمار حياتي، دانشكده بهداشت دانشگاه علوم پزشكي تهران *** دانشجوي دكتراي داروسازي، دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي مازندران
**** متخصص فارماكوگنوزي، دانشيار دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي تهران
E تاريخ دريافت : 83/9/9 تاريخ ارجاع جهت اصلاحات : 83/11/3 تاريخ تصويب: 84/5/26

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

مقدمه

امروزه مبارزه با برخي انواع سرطان، به‌خصوص تومورهايي كه رشد سريع دارند، تاحدودي موفقيت‌آميز بوده است. درمان سرطان به دليل محدوديت‌هاي بنيادي در انجام كار، بسيار مشكل‌تر از درمان ديگر بيماري‌ها است. مهم‌ترين محدوديت كشتن با غيرفعال كردن سلول‌هاي توموز در حضور سلول‌هاي طبيعي بدون بروز سميت بر سلول‌هاي طبيعي است. به منظور دستيابي و تكامل داروهاي ضدسرطان ازمنابع طبيعي نياز به‌يكسري آزمايش‌هاي غربالگري(Screening) عصاره‌هاي خام وجود دارد. چندين نوع از عوامل ضد سرطان براي آزمون غربالگري مورد توجه مي‌باشند از آن جمله مي‌توان تركيبات داراي اثرات سميت سلولي و تركيبات موثر بر سيستم ايمني را نام برد(1). يكي از معتبرترين آزمون‌ها براي سنجش اثرات سميت سلولي، آزمون ميگوآب شور (BST) Brine Shrimp test مي‌باشد كه به وسيله انستيتوي ملي سرطان در آمريكا (NCI)[1] ارائه شده است(2). تاكنون برخي ازجنس‌هاي خانواده گياهي كاسني(Asteracea) بومي كشور آرژانتين با روش BST مورد بررسي قرار گرفته كه از آن ميان مي‌توان گونه‌هاي كروتون تيجليوم[2]، يوفوربيا آميگدالوئيدها[3]، ايرماكارپوس ستيجروس[4]، آشيروكلين فلكسيدا[5] و يوپاتروئيوم اسپي‌پي[6] را نام برد كه اثرات سميت سلولي جالب توجهي از آن‌ها مشاهده شده است(2). از جمله گياهان خانواده كاسني، جنس بومادران آشيلا(Achilles) را مي‌توان نام برد كه شامل 115 گونه بوده و عموماً در نيمكره شمالي زمين رويش دارند. اين جنس در ايران داراي 19 گونه‌گياه علفي چند ساله و غالباً معطر است. برخي ازمهم‌ترين‌گونه‌هاي اين‌جنس عبارتند از آشيلا ويلهلمسي ئي[7]، آشيلا ببيراستيتي‌ئي[8]، آشيلا كنفرتا[9]، آشيلا ميله فوليوم نوبي‌ليس[10] كه در مناطق مختلفي از ايران مي‌رويد(3،4). بومادران(Achillea) را از روزگاران گذشته مي‌شناخته‌اند و خواص درماني و دارويي مختلفي براي آن ذكركرده‌اند. در طب سنتي دم كرده سرشاخه‌هاي گلدار بومادران، التيام‌دهنده زخم‌ها وجراحات است، در رفع‌گاستريت‌هاي حاد ومزمن، نفخ و سوء هاضمه مفيد ذكر شده، مصرف جوشانده آن در برخي نواحي ايتاليا جهت درمان تب‌هاي نوبه بين مردن معمول‌مي‌باشد(5). گونه آشيلاتالاگونيكا (A.talagonica) آندميك (انحصاري) ايران مي‌باشد و اثرات مهاركننده ايمني آن در مطالعات قبلي به اثبات رسيده(6) و گونه آشيلا تنيوئي‌فوليا (A.teunuifilia) نيزكه درايران رويش دارد، ازنظر اثرات‌ضدقارچي عليه تريكوفيتون وروكوزيوم (Trycophyton verucosum)، تريكوفيتون منتاگروفيت‌ها (T.mentagrophytes)،

1. National Cancer Institue
2. Croton tiglium
3. Euphorbia amygdaloides
4. Eramcarpus setigerus
5. Achytoclin flaccida
6. Eupatrium SPP

7. A. Wilhelmsii
8. A. biebersteinni
9. A. conferta
10. A. millefolium nobilis

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

تريكوفيتون شوئن لئينيئي (T.schoenleinii) مورد توجه است(7).
در مطالعات كتابخانه‌اي گزارشي از اثرات سميت سلولي اين دو گونه ايراني وجود ندارد. در اين پژوهش اثرات كشندگي سلولي اين گياهان با روش آزمون ميگوآبشور(BST) براي اولين بار مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوري گياه : اين بررسي يك كارآزمايي باليني است كه در آن ابتدا سرشاخه‌هاي هوايي و گلدار گياه

آشيلا تالاگونيكا بوئيس (Achillea talagonica Boiss) در تير ماه 1380 از ارتفاعات طالقان واقع در شمال ايران جمع‌آوري و مورد تاييد قرار گرفت و يك نمونه از آن در محل نگه‌داري گياهان(Herbarium) دانشكده داروسازي دانشگاه شهيد بهشتي و نمونه ديگر در محل نگه‌داري گياهان دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي مازندران حفظ مي‌شود. گياه آشيلا تنيوئي‌فوليالام (Acheillea tenuifolia Lam) نيز در خرداد همان سال از سه راهي آبيك- خروجي اتوبان كرج به سمت طالقان جمع‌آوري، توسط گياه‌شناس مورد تاييد قرار گرفته و يك نمونه از آن در محل نگه‌داري گياهان دانشكده داروسازي دانشگاه علوم پزشكي مازندران حفظ مي شود. هر دو گياه دور از نور و حرارت مستقيم خشك و به قطعات كوچك‌تر خرد شدند.

ɵO Ã ɵŭO :

قطعات خردشده سرشاخه هوايي گياهان آشيلاتالاگونيكا (A.talagonica) (700 گرم) و آشيلاتنيوئي‌فوليا (A.tenuifolia) (180 گرم) توسط حلال‌هاي اتيل‌استات، متانول و متانول- آب (1:1) و به روش تراوش تحت عصاره‌گيري قرار گرفت. عمل تراوش به ترتيب توسط هر يك از حلال‌ها به‌صورت متوالي و براي هر گياه سه‌بار به مدت 24 ساعت انجام شد. عصاره‌هاي حاصله پس از صاف شدن، تحت خلاء دوار تغليظ و در دستگاه منجمدكننده و خشك‌كن، كاملاً خشك گرديد. سپس غلظت‌هاي مختلفي از عصاره‌ها در نرمال سالين (در مورد عصاره‌هاي اتيل‌استاتي در نرمال سالين با كمك- حلال توئين- 80) تهيه و مورد آزمون زيستشناختي قرار گرفت. لازم به ذكر است كه از روش رقيق نمودن متوالي (Serial dilution) براي تهيه غلظ‌هاي مختلف يك عصاره خاص استفاده گرديده است.

ɵOOOOŭ¯ŭOO ɵŭ
ÙĂ OOOOOã OOÃʰ OOOOO
: (Brine shrimp Lethality Assay)ɵ OOO

تخم‌هاي خشك آرتمياسالينا (Artemia salina) جهت تفريخ در آب درياي مصنوعي(معادل سالين 5، 3 درصد وزني- حجمي) در دماي 28 درجه سانتي‌گراد ريخته شد. تخم‌ها در آكواريوم تحت نور و هوادهي مداوم، پس از 48 ساعت تفريخ (hatching) گرديد. لاروهاي فعال با استفاده از ويژگي فوتوتروپي از پوسته‌ها و تخم‌هاي تفريخ‌نشده جدا شدند. ابتدا غلظت‌هاي 10، 100، 1000 ميكرومولار از عصاره‌ها تهيه و اثر سميت سلولي آن‌ها در حضور لاروهاي فعال در صفحه ميكروتيتر(24 چاهك) بررسي شد. در چاهك‌هاي آزمون، ميزان 500 ميكروليتر سوسپانسيون لارو حاوي 10-20 لارو فعال به همراه 500 ميكروليتر محلول عصاره با غلظت مشخص جاي گرفت. نتايج كشندگي هر غلظت از عصاره‌ها

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

بر لاروهاي آرتمياسالينا (Artemia salina) 3 بار مشاهده شد. براي هر غلظت سه چاهك كاملاً مشابه چاهك آزمون ولي فاقد عصاره در نظر گرفته شد. صفحات در دماي 28- 30 درجه سانتيگراد انكوبه شده و پس از 24 ساعت تعداد لاروهاي زنده باقيمانده در چاهكها توسط حلقه شمارش گرديد(8). پس از دستيابي به نتايج اوليه در مورد عصارههايي كه اثر سمت سلولي آنها كمتر از 1000 ميكرومولار بود، آزمون در غلظتهاي 250،500، 750 ميكرومولار تكرار گرديد. غلظتهاي مختلفي از آلكالوئيدبربرين هيدروكلايد بهعنوان كنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. نتايج خام بهصورت درصد مرگ و مير بيان شده و براي محاسبه LC_{50} وارد آزمون آماري تحليل براساس حداقل انحراف از ميزان متوسط (Probit Analysis) شد.

يافتهها

درصد عصارههاي به دست آمده از ميزان 180 گرم گياه آشيلاتنيوئيفوليا (A.tenuifolia) و 700 گرم از گياه آشيلا تالاگونيكا (A.talagonica) درجدول‌شماره1 خلاصه شده است. ميانگين درصد مرگ و مير لاروها در غلظتهاي مختلف از عصارههاي اتيل استاتي و متانولي گياهان مورد مطالعه در نمودارهاي 1 و 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 1: بازدهي عمليات عصارهگيري درموردگياهان آشيلا تالاگونيكا و آشيلاتنيويفوليا (A.tenuifolia,Achillea talagonica)

نوع عصاره گونه گياهي	درصدوزني- وزنيعصاره خشك به پودرگياهي		
	اتيل‌استاتي	متانولي	آبي-متانولي(1:1)
آشيلا تالاگونيكا (Achillea talagonica)	1/37	3/60	6/37
آشيلاتنيويفوليا (Achillea tenuifolia)	5/10	7/22	9/33

نمودار شماره 1: ميانگين درصد مرگ و مير لاروهاي آرتميا سالينا (Artemia salin) در حضور غلظتهاي مختلفي از عصارههاي اتيل‌استاتي و متانولي گياه آشيلاتالاگونيكا (Achillea talagonica)

نمودار شماره 2: ميانگين درصد مرگ و مير لاروهاي آرتمياسالينا (Artemia salina) در حضور غلظتهاي مختلفي از عصارههاي اتيل‌استاتي و متانولي گياه آشيلاتنيويفوليا (Achillea tenuifolia)

LC_{50} هر يك از عصارهها كه طبق روش آماري تحليل براساس حداقل انحراف از ميزان متوسط(Probit Analysis) با بازه اطمينان 95 درصد محاسبه گرديده، در جدول شماره 2 خلاصه شده است.

جدول شماره 2: LC_{50} محاسبه شده (با واحد ميكرومولار) براي هر يك از عصارههاي گياهان آشيلا تينوئيفوليا (Achillea tenuifolia) و آشيلاتالاگونيكا (Achillea talagonica) در مقايسه با كنترل مثبت بربرين هيدروكلرايد (LC50= 25)

نوع عصاره گونه گياهي	اتيل‌استاتي	متانولي	متانولي-آبي

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

آشیلاتالاگونیکا (Achillea talagonica)	413	752	>1000
آشیلا تینوئیفولیا (Achillea tenuifolia)	534/5	956	>1000

بحث

دستیابي و تکامل داروهاي ضدسرطان از منابع طبیعي نیازمند آزمون‌هاي غربالگري عصاره‌هاي خام(Crud drugs) است. یکي از معتبرترین آزمون‌ها براي سنجش اثرات سمیت سلولي، آزمون میگوآبشور(BST) مي‌باشد که به‌وسیله انستیتو ملي سرطان در آمریکا(NCI) ارائه و گیاهان بسیاري را با این روش مورد آزمایش قرار داده‌اند. در این آزمون‌ها توانایي مهار رشد یا کشتن سلول‌ها اندازه‌گیري مي‌شود. از مزایاي این روش این است که اگرچه عوامل فعال با هر مکانیسمي که عمل‌کنند تشخیص داده مي‌شوند، تنها عواملي قابل ردیابي هستند که بتوانند وارد سلول‌ها شده و یا دیواره سلولي را تخریب نمایند(7و8).

در این پروژه گونه‌هایي از جنس آشیلا(Achillea) که در ایران مي‌رویند براي اولین‌بار به منظور مطالعات سمیت سلولي براساس روش فوق‌الذکر انتخاب شده‌اند. به این منظور عصاره‌هایي با قطبیت متفاوت از سرشاخه‌هاي هوایي گلدار گیاهان مذکور به روش تراوش تهیه و سپس اثرات کشندگي سلولي آن‌ها بر لاروهاي فعال آرتمیاسالینا (Artemia salina) با روش آزمون میگوآبشور (BST) مورد مطالعه قرار گرفته است. همان‌گونه که نتایج پس از محاسبات آماري نشان مي‌دهد، عصاره‌هاي هیدروالکلي (آبي-متانولي 50 درصد) از هر دو گیاه که قطبي‌ترین عصاره‌هاي گیاهي در این مطالعه به شمار مي‌آیند، در هیچ‌یک از غلظت‌هاي به کار رفته سمیت سلولي ایجاد نکرده و LC_{50} آن‌ها بالاتر از 1000 میکروگرم بر میلي‌لیتر محاسبه شده است (جدول شماره 2) آن‌جایي‌که LC_{50} بیش از 1000 از نظر اثرات سمیت سلولي فاقد ارزش مي‌باشد، این عصاره‌ها موثر شناخته نشده‌اند. عمده‌ترین ترکیبات شناخته شده موجود در عصاره‌هاي آبي-متانولي گونه‌هاي مختلف جنس بومادران، آلکالوئیدهاي بتائیني و اسیدهاي آمینه آزاد نظیر پرولین مي‌باشند(10) که به‌نظر مي‌رسد فاقد اثر کشندگي سلولي هستند. مطالعه عصاره‌هاي اتیل استاتي و متانولي هر دو گیاه در غلظت‌هاي 10، 100 و 1000 میکرومولار نشان داد که این عصاره‌ها در غلظت‌هاي 10 و 100 اثر سمیت سلولي نشان ندادند اما در غلظت 1000 میکرومولار در مقایسه با شاهد موثر بودند. به همین دلیل در غلظت‌هاي 500، 250 و 750 میکرومولار آزمون شده و LC_{50} آن‌ها بر مبناي تحلیل آماري بر اساس حداقل انحراف از میزان توسط (Probit Analysis) محاسبه گردید (جدول شماره 2). مقادیر LC_{50} گویاي آن است که عصاره‌هاي اتیل‌استاتي هر دو گونه سمیت سلولي بیشتري نسبت به عصاره‌هاي متانولي این گیاهان داشته (نمودارهاي1 و 2، جدول شماره 2) و نیز عصاره اتیل استاتي گیاه آشیلا تالاگونیکا (Achillea talagonica) موثرترین عصاره داراي سمیت سلولي شناخته شده است. اثرات سمیت سلولي گیاه آشیلا تالاگونیکا (Achillea talagonica) در تمامي عصاره‌ها بیشتر آشیلاتنیوئي‌فولیا (Achillea tenuifolia) بوده است. کاهش تدریجي اثربخشي از عصاره‌هاي غیرقطبي به عصاره‌هاي قطبي‌تر نشانه آن

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

است كه احتمالاً تركيبات غيرقطبي همچون فلاوونوئيدهاي متوكسيله و ترپنوئيدها به ويژه سزكوئي‌ترپن (Sesquiterpene lactones) و تري‌ترپن‌هاي (Triterpen) موجود در عصاره اتيل استاتي اين گياهان(11) مي‌تواند در بروز اثرات سميت سلولي نقش مهمي را ايفا نمايند كه البته اثبات آن نيازمند جداسازي و شناسايي تركيبات مزبور از اين گياهان بوده و در پروژه مصوب ديگري در دانشكده داروسازي در دست انجام مي‌باشد.

مقايسه نتايج حاضر با آنچه در ديگر منابع معتبر منتشر گرديده نشان مي‌دهد كه دو گونه اخير از جنس بومادران داراي اثر سميت سلولي قابل قياس با يوپاتوريوم آرنوتيانوم (Eupatorium arnottianum) مي‌باشند. عصاره ديكلرومتاني يوپاتوريوم داراي LC_{50} معادل 502 ميكرومولار است. جنس‌هاي نظير باكاريس (Baccharis) و گونه‌هايي ديگر يوپاتوريوم همچون يوپاتوريوم بوني‌ئي فوليوم (E.buniiffolium) به ترتيب با LC_{50} معادل 217 و 154 ميكرومولار اثر سميت سلولي بيشتري نسبت به جنس بومادران نشان داده اند(3و8).

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 olants using the brine shrimp microwell cytotoxicity assay. ***Int J. Pharmacogn.*** 1996; 34(4): 249-250.
3. Bremer K. ***Astraceae; cladistics and clasification*** oregone. Timber press, 1994.
4. Huber morath A. ***Achillea In: Flora Iranica.*** (K.H. Rechinger ed). No. 158, Ackademiche 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 monteverde, costa Rica. ***Planta Med.*** 1999; 65: 468- 469.

www.SID.ir
[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]
PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com

Archive of SID

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.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2024-03-29]

www.SID.ir

PDF created with pdfFactory trial version www.pdffactory.com