دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هجدهم، شماره ۵، صفحه ۹۲۹– ۹۲۲ (آذر و دی ۱۳۹۴)

ISMJ 2015; 18(5): 922-929

بررسی مقایسه‌ای سمیت سلولی و خاصیت ضد سرطانی با آزمون کشندگی میگوی آب شور و سلول‌های سرطان لوسمی خونی و سرطان پستان توسط دو گونه دافنه

منیژه میان‌آبادی [۱]، اسماعیل پناهی‌کوخدان [۱*]، عزیزاله جعفری‌کوخدان [۲]،هیبت‌الله صادقی منصورخانی [۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه گلستان، گرگان، ایران
[۲] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران
[۳] مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی یاسوج، یاسوج، ایران

(دریافت مقاله: ۹۳/۷/۱۲– پذیرش مقاله: ۹۳/۸/۲۵)

چکیده

زمینه: امروزه از ترکیبات خالص گیاهان علیه میکروب‌ها و سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه اندازه‌گیری و مقایسه سمیت سلولی و خاصیت ضد سرطانی دو گونه دافنه، بتولین و بتولینیک اسید با استفاده از آزمون‌های کشندگی میگوی آب شور ***Artemia urmiana*** و دفع رنگ تریپان بلو بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت طرح آزمایشی انجام گرفت. تعداد 10^6 سلول از سلول‌های سرطانی رده **K562** و**MCF-7** در سه تکرار در ظروف کشت سلولی حاوی محیط کشت ریخته و به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند و با رقت‌های مختلف از عصاره گیاهی و مواد خالص برای ۲۴ ساعت تیمار گردیدند. میزان تکثیر و بقای سلولی با تست دفع رنگ تریپان بلو تعیین گردید. تفریخ لارو با استفاده از سیست خریداری شده از پژوهشکده آرتمیای ارومیه، دانشگاه ارومیه برای ارزیابی سمیت سلولی انجام گرفت. لاروهای زنده میگو در مجاورت غلظت‌های مختلف عصاره قرار گرفتند و تعداد لاروهای زنده و مرده پس از ۲۴ ساعت شمارش شدند و بر اساس این داده‌ها میزان کشندگی ۵۰ درصد هر عصاره تیمار ارزیابی شد.داده ها با آنالیز واریانس و پروبیت تجزیه وتحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان مهار کنندگی ۵۰ درصد تکثیر ترکیب بتولین و بتولینیک اسید به‌ترتیب در سلول‌های سرطانی رده **K562** (۱/۲۱±۸/ ۵ نانو مولار و ۰/۶۷±۱۲/۲ نانو مولار)، رده **MCF-7** (۱/۱۱±۱۸/۰۴ نانو مولار و ۰/۳۷±۲۱/۴۷ نانو مولار) اندازه‌گیری شد. عصاره هیدرواتانولی دافنه ماکروناتا و دافنه الوئیده اثر کشندگی قوی بر میگوی آب شور داشتند به طوری که دوز کشندگی ۵۰ درصد آن‌ها به‌ترتیب ۰/۱۶±۲/۰۱ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی‌لیتر و ۰/۸۸±۲/۳۷ میلی‌گرم وزن خشک بر میلی‌لیتر بود. در هر دو آزمایش، میزان تأثیر مواد گیاهی رابطه مستقیمی با غلظت آن‌ها داشت. ($P<0/05$).

نتیجه‌گیری: مطابق نتایج، در بین چهار نوع تیمار اعمال شده بتولین و دافنه ماکروناتا مؤثرین‌ترین مواد گیاهی می‌باشند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که گیاه دافنه ماکروناتا حاوی ترکیبات سمی و ضد سرطان بیشتری از دافنه الوئیده است.

واژگان کلیدی: دافنه الوئیده، دافنه ماکروناتا، بتولین، بتولینیک اسید، سمیت سلولی

*گرگان، دانشگاه گلستان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

Email: esmaeel_panahi@yahoo.com

مقدمه

توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه با ساختارهای متنوع، طی میلیون‌ها سال در گیاهان تکامل پیدا کرده است. انسان از زمان‌های بسیار دور از گیاهان در درمان بیماری‌های مختلف استفاده نموده است. از خواص دارویی گیاهان در بین اقوام محلی مختلف، برای تولید داروهای اولیه استفاده می‌شود (۱ و ۲). برخی ترکیبات گیاهی مانند ویتامین‌ها، پلی‌فنل‌ها، آلکالوئیدها، تانن‌ها، ساپونین‌ها، آنزیم‌ها و مواد معدنی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۳ و ۴).

خاصیت ضد توموری گیاه وینکا یا پروانش که آلکالوئیدهای وینکا از آن تهیه می‌شود گزارش شده است (۵). بسیاری از فراورده‌های گیاهی فعالیت قوی ضدسرطانی در برابر سلول‌های سرطانی دارند. به منظور دستیابی و یافتن داروهای جدید ضد سرطانی از منابع گیاهی نیاز به انجام آزمایش‌های غربالگری با استفاده از عصاره‌های خام گیاهی می‌باشد. یکی از معتبرترین روش غربالگری آزمون سمیت میگوی آب شور می‌باشد که در آن گونه‌ای‌آبزی از سخت پوستان متعلق به خانواده آرتمیده به‌نام آرتمیا اورمیانا استفاده شده است (۶ و ۷). سمیت تعداد زیادی از گیاهان مختلف با این روش مورد ارزیابی قرار گرفته است که از جمله می‌توان به زنجبیل (*Z. cassumunar*)، کتان (*L. usitatissimum*)، گزنه (*U. dioica*) و اسپند (*P. harmala*) اشاره کرد (۸). بررسی‌های سال‌های اخیر در مورد داروهای ضدسرطان باعث کشف بسیاری از مواد به طور مصنوعی یا طبیعی شده است. به وضوح می‌توان گفت که بهترین داروهای ضدسرطان، از گیاهان به دست آمده و اکثراً شامل موادی با مولکول‌های درشت و پیچیده است که سنتز قریب به اتفاق آن‌ها را مشکل می‌سازد. از سال ۱۹۵۷ تحقیقات گسترده‌ای برای تعیین فرآورده‌های گیاهی که از نظر فعالیت ضدتوموری فعال هستند به‌وسیله (انستیتو ملی سرطان ایالات متحده امریکا)[1] آغاز شده است. روش‌های بررسی سمیت سلولی پر هزینه است و نیاز به نظم، تجهیزات ویژه، پرسنل تمام وقت و سرم حیوانی دارد. در حالی که آزمون میگوی آب شور با داشتن مزایایی از جمله؛ شباهت آرتمیا با سلول‌های پستانداران، سریع، ساده و ارزان بودن، حساس بودن، استفاده از مقادیر کم مواد جهت انجام آزمایش‌ها، نتایج آماری به دلیل تعداد زیاد لاروها، به واقعیت نزدیک‌تر است. به این دلایل انستیتو ملی سرطان تست آرتمیا را نسبت به روش‌های دیگر برای غربالگری اولیه ترکیبات سیتوتوکسیک ترجیح می‌دهد.

در میان خانواده‌های مختلف گیاهان داروئی، خانواده تیمه لئاسه (Thymelaeaceae) به‌عنوان تیره حاوی ترکیبات داروئی مؤثر حائز اهمیت زیادی است. گونه‌های مختلف این تیره از زمان‌های گذشته برای درمان بیماری‌های روماتیسمی، درد مفاصل، بیماری‌های پوستی، برخی از سرطان‌ها و غیره مورد استفاده قرار می‌گرفت (۹). برای مثال از پوست و میوه گونه دافنه مازریوم (*D. mezereum*) در طب سنتی برای درمان زخم‌ها، روماتیسم و از پوست آن برای درمان اگزما، حساسیت ودردهای عصبی استفاده می‌شد (۱۰).

لوسمی میلوئیدی مزمن یکی از شناخته شده‌ترین انواع لوسمی است. بعد از گذشت چند سال، بیماری به سرعت پیشرفت می‌کند و به لوسمی حاد تبدیل می‌شود. لوسمی میلوئیدی مزمن ۳ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان در زنان و مردان را شامل می‌شود (۱۱ و ۱۲). در حالی که سرطان پستان اولین سرطان شایع

[1] National Cancer Institute (NCI)

در زنان ۴۰ تا ۴۴ ساله می‌باشد و مسئول ۲۰ درصد از تمام مرگ‌های ناشی از سرطان است. با توجه به آمارهای جهانی رو به رشد انواع سرطان‌ها، تلاش در جهت یافتن داروهایی با پتانسیل بالا که آثار سوء کمتری دارند به‌نظر ضروری است (۵).

با توجه با اثرات ضد تکثیر سلول سرطانی عصاره گیاه دافنه ماکروناتا، هدف مطالعه خاصیت ضد سرطانی دو گونه دافنه، ترکیبات گیاهی بتولین و بتولینیک اسید علیه رده‌های سلول‌های K562 (لوسمی انسان) و MCF-7 (سلول‌های سرطان پستان انسان) بود.

میزان سمی بودن عصاره گیاهی و ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید با کمک آزمون کشندگی میگوی آب شور تأیید گردید.

مواد و روش‌ها

گیاه دافنه الوئیده (Daphne oleoides) و دافنه ماکروناتا (Daphne mucronata) از استان کهگیلویه و بویراحمد جمع‌آوری شد. گیاهان به دور از نور مستقیم خورشید خشک و نگهداری شدند.

سپس برگ‌ها از ساقه جدا وآسیاب شدند ودر دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا هنگام نیاز نگهداری شد (۱۳). ۵۰ گرم از گیاه دافنه الوئیده و دافنه ماکروناتا در ۸۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت خیسانده و در دمای اتاق انکوبه شد. پس از این زمان، عصاره با استفاده از کاغذ فیلتر واتمن صاف شد و این عمل ۲ بار تکرار شد و به عصاره قبلی اضافه شد و کل عصاره توسط دستگاه روتاری آواپریتور و سپس فریز درایر خشک گردید. پودر حاصل در آب مقطر استریل حل شد و توسط فیلتر ۰/۲ میکرون صاف و تا زمان نیاز فریز شد (۱۴).

در این مطالعه تجربی سلول‌های رده MCF-7، K562 از بانک سلولی ایران خریداری شد و سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با سرم جنین گاوی (FBS) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و (پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) در انکوباتور با شرایط CO_2 ۵ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت ۹۵ درصد کشت داده شد (۱۵). پس از ۴۸ ساعت محیط کشت تعویض و سلول‌ها پاساژ گردید.

برای انجام آزمایشات، پاساژ ۴ یا ۵ سلول‌ها پس از کشت سلولی و رسیدن به فاز تصاعدی رشد به‌کار گرفته شد. تعداد ۱۰۶ سلول از هر رده در ظروف کشت سلول ریخته شد و بعد از گذشت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰ ماکروگرم برمیلی‌لیتر عصاره خشک گیاه برای دو گونه دافنه و غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۲/۵، ۱۵ ماکروگرم بر میلی‌لیتر از ترکیبات خالص برای مدت ۲۴ ساعت تیمار شدند (۱۶). برای تعیین درصد سلول‌های زنده از رنگ تریپان بلو و لام نئوبار استفاده شد. در این روش میزان ۱۰ میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول به کنار لامل روی لام نئوبار قرار داده شد و هم حجم این سلول‌ها محلول رنگ تریپان بلو روی سلول‌ها ریخته شد و پس از ۳-۲ دقیقه سلول‌ها در زیر میکروسکوپ فاز معکوس دیده شدند.

آرتمیا سخت پوستی است که به طور وسیع در مطالعات سم شناسی آزمایشگاهی و آزمون‌های زیست‌سنجی استفاده می‌شود. اندازه کوچک آرتمیا و تکثیر سریع و هم چنین قابلیت استفاده از سیست‌های خشک آرتمیا، این موجود را برای مطالعات آزمایشگاهی مناسب ساخته است (۱۷). یکی از این مطالعات آزمایشگاهی آزمون سمیت میگوی آب شور است که روشی بسیار مفید برای تشخیص ترکیبات فعال زیستی از عصاره‌های خام گیاهی می‌باشد (۱۸ و ۱۹).

سیست‌های آرتمیا از مرکز تحقیقات آرتمیا در ارومیه، خریداری شد و در آزمایشگاه، تفریخ سیست‌ها با استفاده از بشرهای با حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر انجام شد. در طی انجام آزمایش نور مناسب، آب با شوری ۲/۸ درصد و در دمای ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. لاروهای فعال با استفاده از خاصیت فوتوتروپیک آن‌ها از لاروهای غیرفعال و پوسته‌ها که برای لارو سمی می‌باشند جدا شدند. برای تعیین ۵۰ درصد میزان کشندگی (LC50) در ۲۴ ساعت تیمار با آرتمیا اورمیانا، از هر یک از عصاره‌های گیاهی و ترکیبات خالص در ده رقت ۵۰، ۱۰۰، ،۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای عصاره‌های گیاهی و غلظت‌های ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید در لوله آزمایش تهیه شد و ۰/۵ میلی‌لیتراز هر رقَت به پلیت‌های ۵ سانتی‌متری اضافه شد و سپس حجم آن با آب مصنوعی دریا به ۵ میلی‌لیتر رسانیده و به هر پلیت ۱۰ لارو آرتمیا اضافه شد. در پلیت‌های کنترل منفی، فقط آب دریای مصنوعی و برای کنترل مثبت از تیمول ۲ درصد استفاده گردید. بعد از ۲۴ ساعت تعداد لاروهای مرده در پلیت‌ها بررسی شده و با شمارش لاروهای زنده مانده، میزان سمیت عصاره‌های مورد آزمایش تعیین شدند (۲۰).

درصد مرگ و میر به کمک فرمول مربوطه محاسبه شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS (SPSS Inc، Chicago، Il، USA) ویرایش ۲۱ و مینی تب ویرایش ۱۶ و روش آماری پروبیت آنالیز تجزیه و تحلیل شدند (۲۱). لازم به ذکر است که هر آزمایش در ۳ تکرار انجام گرفت و در طول مدت بررسی در صورتی که در گروه کنترل مرگ ومیر بیش از ۱۰ درصد رخ می‌داد، آزمایش تکرار می‌شد (۲۱).

یافته‌ها

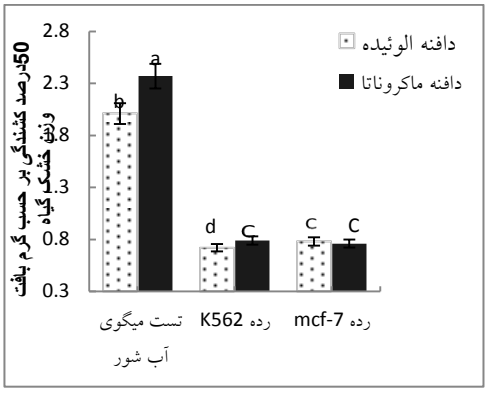
بر اساس نتایج حاصله میانگین و انحراف معیار ۵۰ درصد مهار تکثیر سلولی (جدول ۱)، عصاره‌های دو گونه دافنه، بتولین و بتولینیک اسید نسبت به استاندارد تیمول تفاوت معنی‌داری را نشان دادند (P<۰/۰۵).

جدول ۱) مقایسه میانگین و انحراف معیار ۵۰ درصد میزان مهار تکثیر سلولی عصاره دو گونه دافنه، ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید با استفاده از تست دفع رنگ تریپان بلو در دو رده سلول سرطانی MCF-7،K562

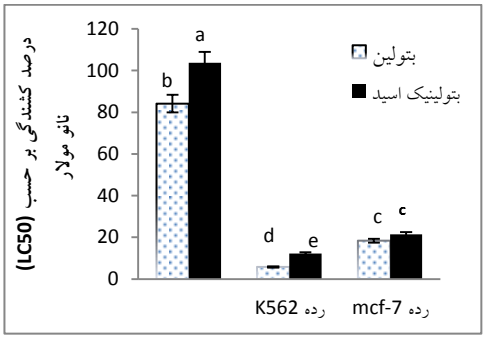
تیمار رده‌های سلولی	میانگین± انحراف معیار رده K562	میانگین± انحراف معیار رده MCF-7	خطای استاندارد
دافنه الوئیده	۰/۷۲±۰/۲۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۷۹±۰/۲۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۱۲
دافنه ماکروناتا	۰/۷۹±۰/۶۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۷۶±۰/۷۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۳۳
بتولین	۵/۸±۱/۲۱ نانو مولار	۱۸/۴±۱/۰۶ نانو مولار	۰/۲۳
بتولینیک اسید	۱۲/۲±۰/۶۷ نانو مولار	۲۱/۴۷±۰/۹۱ نانو مولار	۰/۹۲

جدول ۲) مقایسه میانگین و انحراف معیار ۵۰ درصد میزان کشندگی عصاره دو گونه دافنه، ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید با استفاده از تست میگوی آب شور

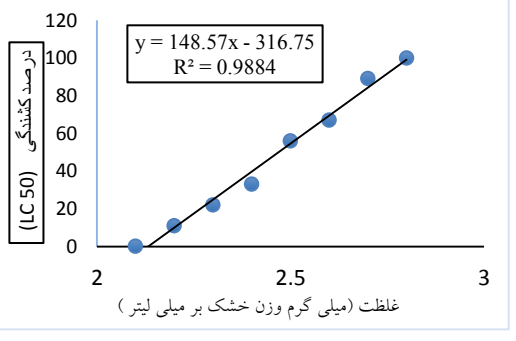
تیمار رده‌های سلولی	میانگین ± انحراف معیار میگوی آب شور	خطای استاندارد
دافنه الوئیده	۲/۰۱±۰/۱۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۱/۸۱
دافنه ماکروناتا	۲ /۳۷±۰/۸۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر	۰/۷۶
بتولین	۸۴ /۱±۲/۳۴ نانو مولار	۲/۲۷
بتولینیک اسید	۱۰۳/۷±۳/۹۱ نانو مولار	۳/۳۱



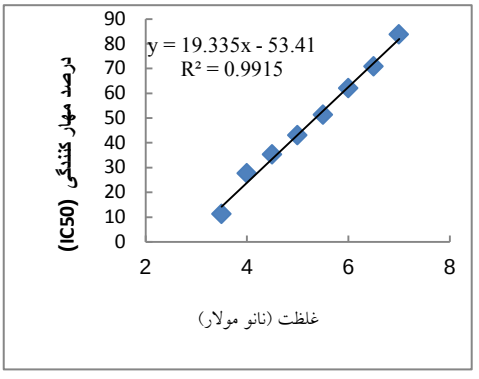
نمودار ۱) مقایسه تأثیر تیمارهای عصاره گیاهی (دافنه الوئیده و دافنه ماکروناتا) بر سلول‌های سرطانی K562، MCF-7 و آرتمیا ارومیانا با استفاده از آزمون رنگ تریپان بلو و تست میگوی آب شور. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف استاندارد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۲) مقایسه تأثیر تیمارهای عصاره گیاهی (بتولین و بتولینیک اسید) بر سلول‌های سرطانی K562، MCF-7 و آرتمیا ارومیانا با استفاده از آزمون رنگ تریپان بلو و تست میگوی آب شور. هر ستون نشان‌دهنده میانگین داده‌ها ± انحراف استاندارد. ستون‌ها دارای حداقل یک حرف مشترک با آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند.



نمودار ۳) LC_{50} عصاره هیدروالکلی دافنه ماکروناتا با استفاده از تست میگوی آب شور



نمودار ۴) غلظت مهار کننده بتولین با استفاده از آزمون دفع رنگ تریپان بلو

بیشترین سمیت به ترتیب مربوط به ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید بود (نمودار ۱ و ۲). همچنین نتایج حاصل از (LC50) تیمارهای مختلف تست میگوی آب شور و تست دفع رنگ تریپان بلودر مقایسه با هم تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دادند (P<۰/۰۵). نتایج مطالعه نشان داد که بین میزان کشندگی و افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی و ترکیبات خالص رابطه مستقیم وجود دارد (نمودار ۳ و ۴).

بحث

امروزه روش‌های درمانی مختلف به منظور از بین بردن کلون‌های بدخیم در لوسمی بکار گرفته می‌شوند. شیمی درمانی، مهم‌ترین درمان جهت ریشه کن کردن سریع لوسمی و القای بهبودی کامل می‌باشد اما امروزه به دلیل عوارض جانبی شدید داروهای شیمی درمانی به نوعی دیگر از درمان توجه شده است (۲۲). مرکز ملی سرطان آمریکا فعالیت قابل توجه‌ای را در زمینه بررسی گروه وسیعی از گیاهان دارویی، آغاز کرده است. ازگیاهان دارای خاصیت آنتی نئوپلازی می‌توان به گیاه تاکسوس بریفولیا (T. berfolia) و گیاه پروانش (P. sadabahar) که وین‌بلاستین و وین‌کریستین از آن تهیه می‌شوند) اشاره نمود. بسیاری از ترکیبات

تری‌ترپنوئیدهای خالص شده از گیاهان خانواده تیمه لئاسه (جنیدیماکرین، بتولین، بتولینیک اسید و لوپئول) دارای خاصیت آنتی لوسمی هستند (۲۳).

برای بررسی پتانسیل بیولوژیکی ترکیبات سیتوتوکسیک روش‌های متفاوتی وجود دارند. یکی از این روش‌ها استفاده از لارو میگوی آب شور می‌باشد. آزمون برای غربالگری سمیت انواعی از عصاره‌های گیاهی، فلزات سنگین، افزودنی‌های مواد غذایی و یا ترکیبات دارویی به کار رفته (۱۹ و ۲۴). از کاربردهای دیگر آزمون آرتمیا اورمیانا بررسی پتانسیل گیاهانی است که می‌توان از آن‌ها در درمان بیماری‌های مختلف بهره جست (۲۵). یکی دیگر از مزایای این روش آنست که اگر مواد فعال با هر مکانیسمی تشخیص داده شوند، تنها عواملی قابل ردیابی هستند که توانایی ورود به سلول را داشته باشند یا بتوانند دیواره سلولی را تخریب نمایند (۱۹). لازم به ذکر است که در مطالعات قبلی، عصاره متانولی گیاهان این تیره سمیت سلولی خود را در رده‌های سلول سرطانی نشان داده‌اند (۴). در مقایسه نتایج IC50 حاصل از تست دفع رنگ تریپان بلودر سلول‌های سرطانی رده و تست میگوی آب شور مشاهده شده که مقادیر ۵۰ درصد کشندگی در سلول‌های سرطانی K562 و MCF-7 خیلی کمتر نسبت به میگوی آب شور بوده است.

مطالعات ما نشان داد که عصاره دو گونه دافنه و ترکیبات بتولین و بتولینیک اسیددارای پتانسیل بیولوژیکی مناسب می‌باشند. با توجه به تأثیر مهاری عصاره دافنه ماکروناتا (۲۸-۲۶)، بتولین وبتولینیک اسید بر اثرات ضد سرطانی در in vivo و بر علیه چندین رده سلول سرطانی در invivo و عدم اثرات جانبی احتمالی این ترکیبات از جمله سمیت آن و همچنین بالا بودن پتانسیل بیولوژیکی آن، بررسی گسترده‌تر و دقیق‌تر فعالیت ضدسرطانی روی رده MCF-7 و K562 انجام گرفت و با هم مقایسه شد.

در مجموع در دو آزمون غربالگری که به منظور بررسی اثرات سمیت حاد و تعیین LC50 و بررسی اثرات ضد توموری و تعیین IC50 دوگونه دافنه، ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید صورت گرفت، این عصاره‌های گیاهی و ترکیبات خالص ضمن داشتن اثرات کشندگی لارو میگوی آب شور قابل ملاحظه، در دوزها کمتر دارای فعالیت ضد توموری و ضدتکثیری مناسب و وابسته به دوز بودند، به طوری که با افزایش غلظت فعالیت ضدتوموری افزایش پیدا می‌کرد. بنابراین روش غربالگری مورد استفاده در این مطالعه، که نوعی روش برون تنی محسوب می‌شود، در کنار نتایج قبلی به‌دست آمده از سایر روش‌های غربالگری، بار دیگر بر فعالیت ضد توموری ترکیبات بتولین و بتولینیک اسید صحه می‌گذارد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که عصاره گیاهان دافنه الوئیده و دافنه ماکروناتا جمع‌آوری شده در استان کهگیلویه و بویراحمد دارای اثر سمیت سلولی بوده و این امر ارتباط مستقیمی با میزان آلکالوئیدها و ترپنوئیدهای موجود در عصاره این گیاهان به‌ویژه مقداربتولین و بتولینیک اسید است که این ترکیبات باتوجه به کشندگی ۵۰ درصد پائین می‌توانند به عنوان مواد ضد سرطان بسیار مؤثر مطرح باشند.

References:

1.Mou X. Cancer prevention by astaxanthin, a natural carotenoid. J Kyoto Prefect Univ Med 2005; 114: 21-9.
2.Saleem TM, Chetty CM, Ramkanth SV, et al.

Hepatoprotective herbs–a review. Int J Res Pharm Sci 2010; 1: 1-5.
3.Heber D. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of diseases. J Postgrad Med 2004; 50: 145–9.
4.Khalighi-Sigaroodi F, Ahvazi M, Hadjiakhoondi A, et al. Cytotoxicity and Antioxidant activity of plant species of Leguminose family. Iran J Pharm Res 2012; 11: 295-302.
5.Valley AW, Balmer CM. Pharmacotherapy a pathophysiologic approach. 7th ed. New York: The McGraw-Hill, 2011, p: 2085-348.
6.Ghavamizadeh M, Mohammadi J, Mirzaei A, et al. Cytotoxicity of Dorema auchri, Achillea millefolium and Artemisia aucheri by Artemia urmiana brine shrimp lethality test(BSLT). Yasuj Univ Med Sci J 2013; 18: 389-99.
7.Mirzaei A, Mirzaei N. Comparison of the Artemia Salim and Artemia urmiana. Res J Biol Sci 2013; 8; 11-6.
8.Sokmen A. Antiviral and cytotoxicity activities of extracts from the cell cultures and respective parts of some Turkish medicinal plants. Turk J. Biol 2001; 25: 343-50.
9.Kasai R, Lee K, Huang H. Antitumor agent 40, Genkawaphnin a potent anti-leukemic diterpene from Daphne genkawa. Phytochem 1981; 20: 2592-5.
10.Sadeghirizi A, Yazdanparast R. Plasma membrane homing of tissue nonspecific alkaline phosphatase under the influence of 3-hydrogenkwadaphnin, an antiproliferative agent from Dendrostellera lessertii. Acta Biochim Pol 2007; 54: 323-9.
11.Kemnitzer W, Drewe J, Jiang S, et al. Discovery of 4-aryl 4H-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell-and caspase-based high throughput screening assay. 4 structure-activity relationships of fused rings at the 7, 8-positions. J Med Chem 2007; 50: 2858-64.
12.Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000; 96: 3343-56.
13.Hedayati M, Yazdanparast R, Fasihi H, et al. Anti-tumor activity of Daphne mucronata extract and its effects on TNF-α-receptors and TNF- α release in cultured human monocytes. Pharm Biol 2003; 41:194-8.
14.Pourmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Anti oxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr J Chem Biotechnol 2006; 5:1142-5.
15.Panahi Kokhdan E, Mianabadi M, Sadeghi H, et al. The effects of two species of Daphne, betulin and betulinic acid on alkaline phosphatase activity in two human cancer cell line, K562 and MCF-7. Armaghane-danesh 2014; 18: 900-9.(Persian)
16.Mianabadi M, Yazdanparast R. The effect of Gnidilatimonoein from Daphne mucronata, on the adhesive property of human platelets. Iran Biomed J 2004; 8 :143-7.
17.Sarabia R, Varo I, Amat F, et al. Comparative toxicokinetics of cadmium in Artemia. Arch Environ Contam Toxicol 2006; 50; 111-20.
18.Krishnaraju AV, Rao TV, Sundararaju D, et al. Biological screening of medicinal plants collected from Eastern Ghats of India using Artemia salina (brine shrimp test). Int J Appl Sci Eng 2006; 4: 115-25.
19.Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, et al. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Med 1982; 45: 31-4.
20.Anwar MM, Kalpana MA, Bhadra B, et al. Antihyperglycemic activity and brine shrimp lethality studies on methanol extract of Cajanus cajan (L.) Millsp. leaves and roots. Adv Nat Appl Sci 2010; 4:311-6.
21.Sumitra C, Yogesh B. Brine shrimp cytotoxicity of Caesalpinia pulcherrima aerial parts, antimicrobial activity and characterisation of isolated active fractions. Nat Prod Res 2011; 25: 1955-64.
22.Willie AH. Cell death: the significance of apoptosis. Int Rev Cytol 1980; 68: 251-306.
23.Reddy KP, Singh AB, Puri A, et al. Synthesis of novel triterpenoid (lupeol) derivatives and their in vivo antihyperglycemic and antidyslipidemic activity. Bioorg Med Chem Lett 2009; 19: 4463-6.
24.Rice-Evans C. Flavonoids and isoflavones: absorption, metabolism and bioactivity. Free Rad Biol Med 2004; 36: 827-38.
25.Ashidi JS, Houghton PJ, Hylands PJ, et al. Ethnobotanical survey and cytotoxicity testing of plants of South-western Nigeria used to treat cancer, with isolation of cytotoxic constituents from Cajanus cajan Millsp. leaves. J Ethnopharmacol 2010; 128: 501-12.
26.Mianabadi M, Yazdanparast R. The anti-metastatic potency of Gnidilatimonoein, from Daphne mucronata, compared to two glycosylation inhibitors: castanospermine and tunicamycin. DARU J Pharm Sci 2004, 12: 44-8.
27.Hedayati M, Yazdanparast R, Zarif Yeganeh M, et al. A new diterpene extracted from Daphne mucronata, effects on human K562 and CCRF-CEM cell lines. J Cancer Ther 2011; 2: 71-5.
28.Nouri K, Yazdanparast R, Sarafnejad A. Guanosine supplementation reduces the antiproliferative and apoptotic effects of the IMPDH inhibitor gnidilatimonoein in K562 cells. Cell Biol Int 2011; 35: 1001-8.

ISMJ 2015; 18(5): 922-929

Original Article

Comparison of Cytotoxicity and anti-cancer activity, by Artemia urmiana Brine Shrimp Lethality Test(BSLT) and Cancer Cell leukemia and Breast Cancer by two species of Daphne

M. Mianabadi [1], E. Panahi kokhdan [1*], A. jafari kokhdan [2], H. Sadeghi Mansourkhani [3]

[1] ***Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Gorgan, Iran***

[2] ***Department of biology, Faculty of Science, Yasuj University, yasuj, Iran***

[3] ***Cellular and Molecular Research Center, Yasuj University of Medical Science, Yasuj, Iran***

(Received 4 Oct, 2014 Accepted 16 Nov, 2014)

Abstract

Background: Nowadays, toxic compounds derived from plants used against microbes and cancer cells. The aim of this study was to evaluate cytotoxicity and anticancer activity of two species of Daphne, Betulin and Betulinic acid by *Artemia urmiana* Brine Shrimp Lethality Test (BSLT) and trypan blue exclusion method.

Material and Methods: This study was conducted as the experimental design. 10^6 cells of K562, MCF-7 cancerous cell line in triplicate were poured into the cultured dishes containing medium and incubated for 24 hour. Cells were treated with various concentration of the plant extract and plant compound for for 24 hour. Cell viability was assessed using trypan blue dye exclusion method. Cytotoxicity evaluation was performed using larvae hatched cysts were purchased from Artemia Research Center, Urmia University. Live shrimp larvae were treated with different concentrations of extract and the numbers of live and dead larvae were counted after 24 hours. lethal concentration %50 (LC50) of any extracts on live larvae based on the data w Was obtained. The data were analyzed using the Varience and Probit analysis.

Results: inhibition proliferation 50% of Betulin, and Betulinic acid in treated cells line K562 (5.8±1.2 1nM, 12.2±0.67 nM, respectively) and MCF-7 (18.04±1.11 nM, 21.47±0.37 nM) were measured. Hydro ethanol extracts of *Daphne mucronata* and *Daphne oleoides* exhibited potent brine shrimp lethality with lethal dose 50 % of them was 2.01±0.16 mgDW/ml, 2.37±0.88mgDW/ml respectively. In both tests, the effect of plant material was directly related to their concentration.

Conclusion: According to the results, *Daphne mucronata* and Betulin were the most effective herbal substance. Thus, we can conclude that *Daphne mucronata* contains anticancer and toxic compounds.

Key words: Cytotoxicity, Betulin, Betulinic acid, Daphne oleoides, Daphne mucronata

[*] *Address for correspondence*: Department of Biology, Faculty of Science, Golestan University, Golestan, Iran, Email: esmaeel_panahi@yahoo.com