پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، صفحات ۱۲۴ تا ۱۳۱

مقاله اصلی
(Original Article)

بررسی تأثیر سمیت گیاه *Artemisia absinthium* L. رویش یافته در دو ارتفاع مختلف، بر رده سلول سرطان سینه انسانی MCF7

بابک گردانیان[۱]، ماندانا بهبهانی*[۲]، ژیرایر کاراپتیان[۱]، محمد فضیلتی[۳]

[۱] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه
[۲] گروه بیوتکنولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه اصفهان.
[۳] گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور استان اصفهان

چکیده

سابقه و هدف: *با توجه به مقاومت سلول‌های سرطانی به داروهای شیمیایی و گزارشات گوناگون از تأثیر گیاه Artemisia در درمان بیمای‌های مختلف، به منظور تعیین تأثیر محل رویش گیاه (ارتفاع زیاد و ارتفاع کم) بر سمیت اندام‌های مختلف، این پژوهش انجام شد. در این تحقیق اثر سمیت عصاره متانولی گل، برگ، ساقه و ریشه A.absinthium جمع آوری شده از دو ارتفاع مختلف، بر رده سلول سرطان سینه انسانی MCF-7 و سلول نرمال HEK293 مورد ارزیابی قرار گرفت.*

روش بررسی: *این تحقیق به روش تجربی در شرایط in vitro صورت گرفت. رده سلول سرطان سینه MCF-7 و سلول نرمال HEK293 به ترتیب در محیط کشت RPMI-1640 و DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی کشت داده شدند. نمونه‌های خشک شده گیاهان توسط حلال متانولی عصاره‌گیری شدند و اثر سمیت سلولی هر چهار اندام بر سلول‌های سرطانی و نرمال در غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به روش MTT مورد ارزیابی قرار گرفت.*

یافته‌ها: *سمیت سلولی عصاره متانولی اندام‌های مختلف A.absinthium ارتفاع بالا نسبت به ارتفاع کم، ۲۰٪ تا ۳۰٪ بیشتر بود. عصاره‌های حاصل از گل و ریشه A.absinthium ارتفاع بالا به ترتیب با IC_{50} ۲۲۱ و بیشتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر، بیشترین و کمترین اثر سمیت را بر سلول سرطان سینه رده MCF7 نشان‌دادند. سمیت سلولی A.absinthium بر سلول نرمال HEK293 ۲۰٪ تا ۳۰٪ کمتر از سلول سرطانی بدست آمد.*

نتیجه‌گیری: *به نظر می‌رسد گیاه A.absinthium رویش یافته در ارتفاع بالا، تأثیر بیشتری بر سمیت سلولی دارد.*

واژگان کلیدی: *افسنتین، تست MTT، MCF7، HEK293.*

مقدمه

سرطان سینه یکی از شایع ترین نوع سرطان‌ها در بین بانوان است، بر اساس گزارشات آماری در سال‌های اخیر در حدود ۲۴/۴۱٪ سرطان‌ها در بانوان ایرانی از نوع سرطان سینه بوده است (۱). جراحی و درمان‌های مکمل مانند درمان دارویی، هورمونی، شیمی درمانی و رادیوتراپی از روش‌های درمان سرطان سینه می‌باشند (۲). یکی از بزرگترین محدودیت‌های داروهای ضدسرطان، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو است که می‌تواند ناشی از مقاومت ذاتی تومور نسبت به دارو باشد یا در طول شیمی درمانی کسب شود و به گونه‌ای عمل می‌کند که سلول‌های مقاوم از بین سلول‌های هتروژن انتخاب می‌شوند، در نتیجه با افزایش سلول‌های مقاوم روند

آدرس نویسنده مسئول: اصفهان، گروه بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان، ماندانا بهبهانی
(**e-mail:** ma.behbahani@ast.ui.ac.ir)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۲/۱۶
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۷/۱۶

درمان مشکلتر می‌شود (۲). امروزه داروهای گیاهی به علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳). بالغ بر ۳۵۰۰ سال است که از گیاهان در درمان سرطان استفاده می‌شود(۴). آلکالوئیدهای کاتارانتوس رزئوس و وینکا آلبا یکی از بهترین ترکیبات گیاهی مورد استفاده در شیمی درمانی سرطان هستند (۲). داروهای مهمی ازجمله وین‌کریستین، وین‌بلاستین، وین‌دزین، پودوفیلوتوکسین، ۱۰-هیدروکسی-کامپتوتسین، تاکسول و فیلانتوزید برای درمان سرطان کشف شده‌اند (۳).

Artemisia با نام فارسی درمنه از جمله گیاهان دارویی و متعلق به خانواده بزرگ Asteraceae است، بیش از ۳۴ گونه از این جنس در ایران گزارش شده است، گونه‌های متنوع آن از پست‌ترین نقاط ایران از حاشیه دریای خزر تا ارتفاعات ۴۰۰۰ متری رویش دارند (۵). *Artemisia absinthium* از جمله گونه‌های مهم این جنس است که با عنوان افسنتین و wormwood شناخته می‌شود (۶). افسنتین گیاهی پایا از منطقه ایرانی-تورانی و خزری می‌باشد که در اروپا، ترکیه، ایران، آسیای مرکزی، سیبری و افغانستان پراکندگی دارد (۵). *A.absinthium* در طب سنتی برای تسکین دردهای مزمن، یرقان، نقرس، برونشیت، مالاریا، سیاه سرفه، زخم‌های لثه و دهان، سوزش معده و قلب، درد عصبی، التهاب، سرخک، تب و راش مورده استفاده قرار می‌گرفته است (۹-۷). امروزه نیز در درمان رماتیسم، رفلکس‌مری، دردهای قلبی، دیابت ملیتوس (۱۲-۱۰)، مالاریا (۱۳و۱۴)، هپاتیت (۱۵)، عفونت‌های قارچی (۱۰)، باکتریایی (۱۶)، ویروسی (از جمله هرپس سیمپلکس) (۱۷) لیشمانیوز (۲۰-۱۸) و تنگی نفس (۲۱) کاربرد دارد.

مطالعات فیتوشیمیایی حضور فلاونوئیدها، استروئیدها، ترپنوئیدها، ساپونین‌ها، تانن‌ها و روغن‌های فرار را در گونه‌های مختلف درمنه و از جمله افسنتین نشان می‌دهند (۵ و ۲۲).

مطالعات زیادی بر روی اثرات ضد سرطانی عصاره‌های الکلی و آبی این گیاه بر سلول‌های سرطانی و نرمال صورت گرفته است (۱۰). آرتمیزینین (۲۳)کامفر، پاراسیمن و لینالول از ترکیبات موجود در *A.absinthium* می‌باشند (۲۴). در این تحقیق اثر سیتوتوکسیک عصاره متانولی گیاه *A.absinthium* جمع‌آوری شده از دو ارتفاع مختلف بر رده سلول سرطان سینه انسانی MCF7 و سلول نرمال HEK293 به صورت تجربی در شرایط *in vitro* مورد بررسی قرار گرفت. آزمایشات در شهریور ماه ۱۳۹۰ در آزمایشگاه کشت سلولی گروه بیوتکنولوژی دانشکده علوم وفناوری‌های نوین دانشگاه اصفهان انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره گیاهی

گیاه *A.absinthium* در شهریور ماه ۱۳۹۰ از شهر سیلوانا واقع در ۴۰ کیلومتری غرب ارومیه از دو ارتفاع ۱۷۰۰ و۲۷۰۰ متری از سطح دریا جمع‌آوری و پس از شستشو، در سایه خشک گردیدند (گیاهان چند ساله مورد برداشت قرار گرفتند) سپس برای شناسایی به باغ گیاه شناسی تهران منتقل شدند. قسمت‌های مختلف گیاه از جمله، گل، برگ، ساقه و ریشه به صورت جداگانه آسیاب و پودر شدند. ۵۰ گرم ازپودر اندام‌های مختلف گیاه به صورت جداگانه با حلال متانولی به مدت ۷۲ ساعت بر روی شیکر با دور ۱۸۰rpm و دمای ۲۵°C قرار گرفتند، عصاره‌های بدست آمده توسط دستگاه روتاری (Stero glass, Italy) در شرایط خلاء و در دمای ۴۰°C تغلیظ و در نهایت به وسیله دستگاه لیوفیلیز (Zirbus, Germany) خشک شدند. عصاره‌های حاصل در کمترین مقدار دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شدند و با رقیق کردن آن‌ها در محیط کشت غلظت‌های ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه شد (۱۰).

کشت و نگهداری سلول‌ها

رده سلول سرطانی MCF-7 و سلول نرمال HEK293 از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران تهیه و به ترتیب در محیط کشت RPMI-1640 (Gibco) و DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS)، محلول پنیسیلین (100U/ml)- استرپتومایسین (100 µg/ml) و ۲ mM L –گلوتامین کشت داده شدند. سپس در انکوباتور Co_2 ۵٪ (N-Biotek) نگهداری و هر ۳ روز یکبار محیط کشت آن‌ها تعویض گردید (۱۰).

بررسی سمیت سلولی با استفاده از روش MTT

بررسی اثر سیتوتوکسیتی عصاره‌ها با روش رنگ سنجی، با استفاده از 3- (4, 5-dimethylthiazol-2yl)-2 , 5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) انجام شد (۲۵). این روش بر اساس فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی سلول‌های زنده استوار است، که محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش رنگ فورمازان تبدیل می‌کند، که پس از حل کردن در DMSO می‌توان آن‌ها را در دستگاه الایزا ریدر مورد سنجش قرار داد (۲۶). مقدار ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی در هر چاهک از پلیت ۹۶ چاهکی، به گونه‌ای که هر میلی لیتر از محیط کشت دارای ۳×۱۰^{۴} سلول باشد ریخته شد، سپس مقدار ۲۰ µl از غلظت‌های مختلف عصاره‌ها به چاهک‌های مورد نظر از پلیت اضافه گردید، به

گونه‌ای که حجم نهایی هر چاهک به ۲۰۰ µl رسید. دوکسوروبیسین به عنوان کنترل مثبت (کنترل مثبت برای مشخص شدن حساسیت یا عدم حساسیت سلول‌ها به ماده سمیت سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد) و محیط کشت حاوی ۰/۵ درصد DMSO بدون هیچ گونه عصاره‌ای به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند (کنترل منفی به منظور بررسی اثر حلال عصاره‌ها یعنی DMSO بر سلول‌ها استفاده می‌شود). پلیت به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور ۵٪ Co_2 و دمای ۳۷°C انکوبه گردید. سپس ۲۰ میکرولتر محلول MTT (۵mg/ml) به هر چاهک از پلیت اضافه شد و به مدت ۲ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت، مقدار ۱۰۰µl DMSO به منظور حل کردن کریستال‌های فورمازان جایگزین محلول قبلی شد و جذب در طول موج ۵۶۰ nm توسط دستگاه الایزاریدر(Awareness) خوانده شد. برای هر غلظت عصاره ۳ تکرار تعیین گردید. درصد بقاء سلولی در گروه کنترل منفی ۱۰۰ در نظر گرفته شد و از فرمول زیر بدست آمد. غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش که درصد حیات سلولی را به نصف کاهش می‌دهد به عنوان IC_{50} لحاظ شد.

$$\text{درصد بقاء سلولی} = \frac{OD_{\text{سلولهای تیمار شده}} - OD_{\text{بلانک}}}{OD_{\text{کنترل منفی}} - OD_{\text{بلانک}}} \times 100$$

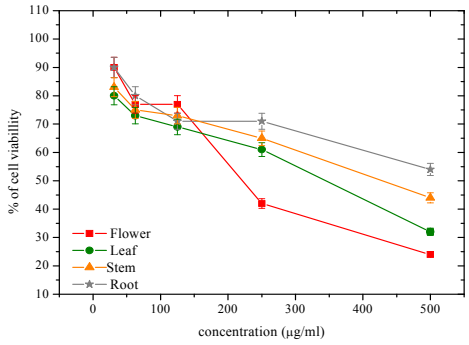
آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گردید و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (one way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت. سطح معنی دار بودن اختلافات $P < 0.05$ لحاظ شد و آزمون Post Hoc تست LSD استفاده گردید.

یافته‌ها

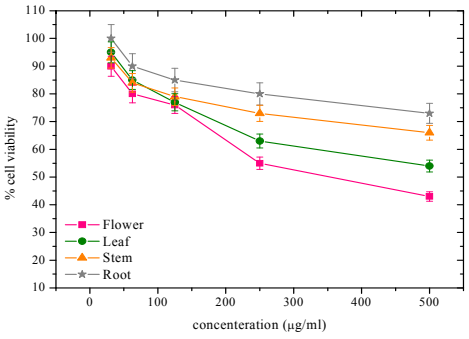
اثر سمیت سلولی عصاره متانولی ۴ اندام (گل، برگ، ساقه و ریشه) گیاه *A.absinthium* جمع‌آوری شده از هر دو ارتفاع در ۵ غلظت ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بر سلول سرطانی و نرمال مورد بررسی قرار گرفت (نمودارهای ۱ تا ۴) و جدول(۱). نتایج حاصل نشان داد سلول‌ها به کنترل مثبت حساس بوده و کنترل منفی نیز در غلظت مورد استفاده (۰/۵ درصد) هیچ گونه سمیت سلولی ندارد.

اثر سیتوتوکسیتی عصاره متانولی قسمت‌های مختلف گیاه، بر رده سلول سرطانی MCF-7

اثر سمیت سلولی عصاره متانولی ۴ اندام گیاه *A.absinthium* جمع‌آوری شده از هر دو ارتفاع بر سلول سرطانی مورد بررسی قرار گرفت (نمودار ۱و۲) و IC_{50} آن‌ها محاسبه گردید (جدول ۱).



نمودار۱. میزان سمیت *A.absinthium* منطقه مرتفع بر سلول MCF7 بر حسب غلظت‌ها و اندام‌های مختلف. Error bar بیانگر Mean±SD است (n=3).



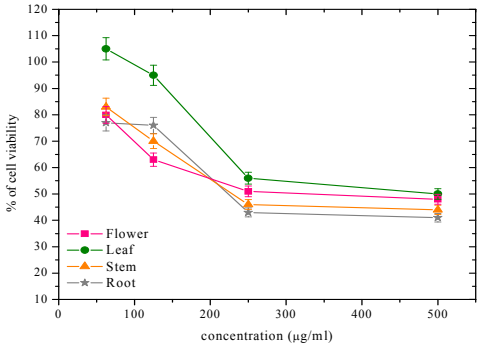
نمودار۲. میزان سمیت *A.absinthium* منطقه کم ارتفاع بر سلول MCF7 بر حسب غلظت‌ها و اندام‌های مختلف. Error bar بیانگر Mean±SD است (n=3).

نتایج حاصل از اثر عصاره‌ها بر سلول MCF7 نشان داد، با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد بقاء سلولی کاهش می‌یابد به طوری که کمترین بقاء سلولی در غلظت ۵۰۰ µg/ml مشاهده شد. بیشترین سمیت سلولی در *A.absinthium* هر دو ارتفاع به ترتیب در گل، برگ، ساقه و ریشه مشاهده شد. سمیت سلولی *A.absinthium* ارتفاع بالا برای همه قسمت‌های گیاه بیشتر از *A.absinthium* ارتفاع پایین بدست‌آمد. IC_{50} عصاره‌های *A.absinthium* ارتفاع بالا در گل، برگ، ساقه و ریشه به ترتیب ۲۲۱، ۳۴۳، ۴۳۰ µg/ml و ۵۰۰< و در نمونه ارتفاع پایین در گل ۳۵۲ µg/ml و در برگ، ساقه و ریشه ۵۰۰ µg/ml< محاسبه گردید.

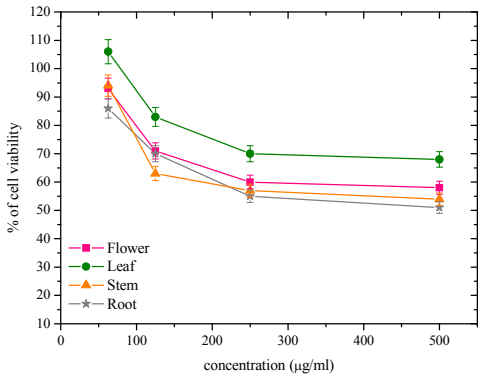
اثر سیتوتوکسیتی عصاره متانولی قسمت‌های مختلف گیاه، بر رده سلول نرمال HEK293

نتایج حاصل از اثر سایتوتوکسیک عصاره‌ها بر سلول نرمال HEK293 مشخص نمود، میزان سمیت عصاره‌ها ۲۰ تا ۳۰ درصد کمتر از سلول‌های سرطانی می‌باشد (جدول ۱).

بیشترین سمیت سلولی در *A.absinthium* هر دو ارتفاع به ترتیب در ریشه، ساقه، گل و برگ مشاهده گردید (نمودار۳و۴). نتایج نشان داد، برخلاف مرحله قبل ریشه دارای سمیت بیشتری بر روی سلول نرمال می‌باشد. اثر سیتوتوکسیتی در *A.absinthium* ارتفاع بالا بیشتر از *A.absinthium* ارتفاع پایین بدست آمد. IC_{50} گیاه ارتفاع بالا برای ریشه، ساقه، گل و برگ به ترتیب µg/ml ۲۲۲، ۲۲۸، ۳۳۰، ۴۹۹ و برای گیاه ارتفاع پایین در هر چهار اندام µg/ml ۵۰۰ < محاسبه شد.



نمودار۳. میزان سمیت *A.absinthium* منطقه مرتفع بر سلول HEK293 بر حسب غلظت‌ها و اندام‌های مختلف. Error bar بیانگر Mean±SD است (n=3).



نمودار۴. میزان سمیت *A.absinthium* منطقه ارتفاع کم بر سلول HEK293 بر حسب غلظت‌ها و اندام‌های مختلف. Error bar بیانگر Mean±SD است (n=3).

جدول ۱- IC_{50} عصاره *A.absinthium* بر حسب اندام‌های مختلف به تفکیک ارتفاع رویش.

IC_{50} (µg/ml)	ارتفاع(متر)	گل	برگ	ساقه	ریشه
MCF7	۲۷۰۰	۲۲۱	۳۴۳	۴۳۰	>۵۰۰
	۱۷۰۰	۳۵۲	>۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰
HEK293	۲۷۰۰	۳۳۰	۴۹۹	۲۲۸	۲۲۲
	۱۷۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰	>۵۰۰

بحث

نتایج حاصل نشان می‌دهد عصاره متانولی قسمت‌های مختلف *A.absinthium* دارای خاصیت سایتوتوکسیک بر سلول MCF7 می‌باشند. نتایج مشابهی در ارتباط باخاصیت ضدسرطانی عصاره *A.absinthum* و *Artemisia afra* بر هر سه رده سلولی MCF-7 (Human breast adenocarcinoma)، HT-29 (human colonic adenocarcinoma) و Hela گزارش شده است (۱۰). طبق مطالعات منتشر شده در دهه اخیر ترپنوئیدها و فلاونوئیدهای موجود در *Artemisia annua* دارای سمیت بر چندین رده سلول سرطانی انسان هستند. آرتمیزینین یکی از سسکوئی‌ترپن‌هایی است که در گونه‌های مختلف این گیاه وجود دارد و فعالیت ضدسرطانی آن *in vitro* و *in vivo* ثابت شده است (۱۳و۱۵). اثر آرتمیزینین موجود در این گیاه بر سلول‌های سرطانی مورد بررسی قرار گرفته است و پاسخ پلئوتروپیک آن در سلول‌های سرطانی شامل مهار رشد سلول، آپوپتوزیس، ممانعت از آنژیوژنز (رگزایی)، ممانعت از مهاجرت سلولی و کاهش پاسخ گیرنده-های هسته‌ای می‌باشد (۱۹و۲۷). طبق نتایج این تحقیق بیشترین سمیت سلولی *A.absinthium* به ترتیب در گل، برگ، ساقه و ریشه مشاهده شد. عبدول منان و همکاران در سال ۲۰۱۰ بیشترین مقدار آرتمیزینین را به ترتیب در گل، برگ، ساقه و ریشه *A.absinthium* گزارش کردند (۲۳). زهی و همکاران در سال ۲۰۱۰ سسکوئی‌ترپنی به نام (Z)-7-acetoxy-methyl-11-methyl-3-methylene-dodeca-1,6,10-triene (AMDT) را در ریشه *A.annua* گزارش کردند که باعث مهار تکثیر سلولی و القای آپپتوزیس در سلول‌های سرطان ریه (95-D)، تخمدان (HO8910)، کبد (QGY) و Hela می‌شود (۲۸). کوئرسیتین، ایزورامنتین، کامفر و لینالول که در اندام‌های هوایی *A.absinthium* وجود دارند از دیگر ترکیبات این گیاه می‌باشند. کوئرسیتین باعث مهار رشد بسیاری از سلول‌های سرطانی از جمله MCF7 می‌گردد، ایزورامنتین رشد بسیاری از سلول‌های سرطانی از جمله

MDA-MB-435, SKMEL-5, DU-145, MCF7, DLD و LLC را مهار می‌کند (۲۹). لینالول دارای اثر سیتوتوکسیتی بر سلول‌های MCF7 است (۳۰) و با مهار کمپلکس میتوکندریایی I وII و افزایش گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) به همراه کاهش سطح ATP و GSH، باعث توقف رشد رده سلولی هپاتوسلولار HepG2 می‌گردد (۳۱). کریوفیلن در برخی گونه‌های *Artemisia* از جمله *A.annua* وجود دارد و دارای سیتوتوکسیتی بر سلول‌های HT-116، RAW و MCF7 به ترتیب با IC_{50} µg/ml ۶۲/۵، ۳۵/۲ و ۱۰۰< می‌باشد (۳۲). محققان نشان داده‌اند که ترکیبات ترپنی مهمترین نقش را در سیتوتوکسیتی گونه‌های *Artemisia* دارند (۲۴) وجود سسکوئی‌ترپن‌ها در *Artemisia princeps* فعالیت ضدسرطانی را در سلول‌های انسانی از جمله Hela ثابت کرده است (۳۳و۳۴).

الفا-پینن، بتا-پینن، جرماکرینD، لیمونن و میرسن موجود در *Artemisia* عامل احتمالی مهار رشد رده سلول‌های سرطان سینه انسانی، کبد و ملانوما می‌باشند (۳۵). اکروت و همکاران در سال ۲۰۱۱، آلفا-پینن، بتا-پینن و لیمونن را عامل احتمالی مهار سلول‌های HT29 توسط عصاره متانولی و اتانولی *A.campestris* گزارش کرده‌اند (۳۵). آنجل و همکاران در سال ۲۰۰۹ ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از جمله پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها را از عوامل مؤثر در توان سیتوتوکسیتی *A.campesteris* دانسته‌اند، پلی‌فنل‌ها باعث محافظت سلول‌ها در مقابل گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) می‌شوند (۳۶). دوموراری و همکاران در سال ۲۰۰۹ ، افزایش آنزیم‌های سوپراکسیددیسموتاز، کاتالاز و گلوتاتیون‌پراکسیداز در خون موش‌های دارای Ehrlich ascites carcinoma (EAC) را در اثر عصاره *A.nilagirica* تأیید نموده و آن را عامل احتمالی کاهش حجم تومور دانسته‌اند (۳۷). زنگ و همکاران در سال ۱۹۹۴ فعالیت سیتوتوکسیتی ۹ ترپنوئید و فلاونوئید artemisinin, deoxyartemisinin, artemisinic acid, arteannuin-B, stigmasterol, friedelin, friedelan-3 beta-ol, artemetin, and quercetagetin 6,7,3',4'-tetramethyl ether موجود در *A.annua* را بر چندین رده سلولی مورد آزمایش قرار دادند، آن‌ها فعالیت سیتوتوکسیتی artemisinin و quercetagetin 6,7,3',4'- tetramethyl ether را بر رده‌های سلولی P-388 ، A549، HT29، MCF7 و KB تأیید کرده‌اند (۳۸).

لی و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر مهاری فلاونوئید 5,6,3',5'- tetramethoxy 7,4'-hydroxyflavone (p7F) استخراج شده از *A.absinthium* را بر روی دو عامل TNF-α و عامل هسته‌ای kappa B در شرایط *in vivo* و *in vitro* مشخص کرده‌اند (۳۹). آرتزونیت (Artesunate) یکی از مهمترین مشتقات آرتمیزینین است، آرتزونیت تأثیر آنتی‌آنژیوژنیک داشته و علاوه بر اثر ضدسرطانی تولید فاکتور رگزاییVEGF را نیز در سلول‌های K569 مهار می‌کند (۴۰). از دیگر مشتقات آرتمیزینین دی‌هیدروآرتمیزینین است که فعالیت ضدسرطانی و ضدمالاریایی بسیار بالایی دارد (۱۳).

برخی از ترکیبات فرار *A.absinthium* در برگ شامل سابینن، بتا-میرسن، سیمن، آلفا-فلندرن، درگل لینالول، پینن، سابینن، در ساقه لینالیل ایزو والریک، سابینن، میرسن (۴۱) و در ریشه منتان، پینانن و توجان می‌باشند (۴۲و۴۳) که بسته به نوع رویشگاه درصد این ترکیبات در گیاه متفاوت خواهد بود (۲۱). عوامل محیطی می‌تواند باعث تغییر در مواد مؤثره گیاه از جمله آلکالوئیدها، گلیکوزیدها، استروئیدها و روغن‌های فرار شود. ارتفاع از سطح دریا با برخی از ترکیبات گیاه رابطه مثبت و با برخی رابطه منفی نشان می‌دهد، هایدر و همکاران در سال ۲۰۰۹ ثابت کردند، درصد اسانس بدست آمده از Basser *Artemisia roxburghiana* var جمع‌آوری شده از چند ارتفاع مختلف رابطه منفی معنی‌داری را بین ارتفاع و درصد اسانس گیاه نشان می‌دهد، به طوری که بیشترین مقدار اسانس در ارتفاع ۱۲۱ متری و کمترین مقدار آن در ارتفاع ۲۰۲۵ متری گزارش شده است (۴۴). در بررسی که توسط کریمی و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی برگ گیاه *Atropa belladonna* L. (شاهبیزک) صورت گرفته، اثر معنی‌دار ارتفاع، فصل و تأثیر متقابل این دو بر تغییرات میزان برخی از آلکالوئیدها دراین گیاه تأیید شده است، به صورتی که در فصل بهار و پاییز با افزایش ارتفاع مقدار آلکالوئیدها کاهش و در فصل تابستان با افزایش ارتفاع مقدارآلکالوئیدها افزایش می‌یابد (۴۵). در *Rosmarinus offisinalis* L. درصد بتا-کاریوفیلن و بتا- پینن با افزایش ارتفاع بیشتر می‌شود، ولی مقدار برنئول با ارتفاع رابطه عکس دارد (۴۶). بررسی صورت گرفته بر روی *Thimus cotschyanus* Boiss. نشان داده، درصد ترکیبات دارویی لینالول، آلفا-تریپینن، بتا-تریپینن و تیمول با افزایش ارتفاع گیاه از سطح دریا افزایش معنی‌داری دارد (۴۷). کائول در سال ۲۰۱۰ ثابت کرد عوامل محیطی نقش مهمتری نسبت به عوامل ژنتیکی در میزان Artemisinin گیاه دارند (۴۸). در بررسی که بر روی دو کلون از *A.annua* انجام شده، مشخص گردیده است میزان آرتمیزینین در گروهی که در ارتفاع بالا (۲۰۰۰-۱۵۰۰ متر) و دمای پایین (۱۸°C-۱۰/۵) رشد کرده-اند نسبت به گروهی که در ارتفاع پایین (۵-۴ متر) و دمای

بالا (۲۶/۲-۳۲/۸°C) رشد کرده‌اند بیشتر است، به گونه‌ای که در ارتفاع پایین (μg/g DW) ۲۵۹۲/۲ و ۳۲۱۳/۰۱ و در ارتفاع بالا به ترتیب (μg/g DW) ۱۱۲۰۲/۸ و ۱۰۸۴۵/۳ گزارش شده است (۴۹). در این تحقیق طبق روش‌های متداول غلظت‌های زیر ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از عصاره‌ها بر روی هر دو رده سلول نرمال و سرطانی مود بررسی قرار گرفتند، نتایج به دست آمده در مورد توان سیتوتوکسی *A.absinthium* با میزان تجمع آرتمیزینین و دیگر ترکیبات ضدسرطانی در اندام‌های مختلف این گیاه همخوانی دارد، به گونه‌ای که به ترتیب گل، برگ، ساقه و ریشه بیشترین توان سیتوتوکسیتی را بر سلول سرطانی نشان می‌دهند. شدت تابش و دما به علت تغییرات ارتفاع تحت تأثیر قرار می‌گیرد، که خود عامل مهمی در تشکیل متابولیت‌های ثانویه درگیاهان می‌باشد.

به نظر می‌رسد محل رویش گیاه از جمله ارتفاع از سطح دریا بر مقدار سمیت گیاه *A.absinthium* نقش دارد. در این پژوهش فقط نقش ارتفاع از سطح دریا مورد بررسی قرار گرفت و دیگر شرایط اکولوژیکی با توجه به اینکه گیاهان از یک منطقه جمع‌آوری شده بودند کمتر مورد توجه قرار گرفتند، لذا بررسی نقش مناطق رویشی مختلف بر سمیت سلولی گیاه توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

ازجناب آقای دکتر مظفریان کـه در شناسـایی و جنـاب آقـای سجاد نـوری کـه در جمـع‌آوری گیاهـان مـا را یـاری نمودنـد صمیمانه سپاسگزاریم.

REFERENCES

1. Mousavi M, Davanlo M, Haj sadeghi N. State Registration of cancer cases reported in 1384, Ministry of Health, Medical Education, Center for Disease Management, Department of Cancer.1-56. [In Persian]

2. Katzung BG, Masters SB, Terevor AJ, Editors. Basic and clinical pharmacology. New York: Norwalk; 1997. p.409-25.

3. Hoffman E, Editors. Cancer and the search for selective biochemical inhibitors. London: Boca Raton; 1999. p.95-97.

4. Mans DRA, Schwartsmann G. Anticancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anticancer compound. Oncologist 2000; 5: 185-98.

5. Jafari M, Aleni A, Malekpur B. Investigation of some ecological properties of *Artemisia Sieberi* in hotbeds of Ardabil province. J Environmental Studies 2006; 32: 15-20. [In Persian]

6. Mozafarian V, editor. Flor of Iran. 1st ed. Tehran: Research Institute of Forests and Rangelands. 2008. p.199-260. [In Persian]

7. Haung L, Liv JF, Liv LX. Antipyretic and antinflamatory effect of *Artemisia annua*. Rev Med 1993; 18: 44-48.

8. Sengul M, Ercisli S, Yildiz H, Gungor N, Kavaza A, Çetin B. Antioxidant, antimicrobial activity and total phenolic content within the aerial parts of *Artemisia absinthum*, *Artemisia santonicum* and *Saponaria officinalis*. Iran J Pharm Res 2009; 10: 24-31.

9. Gambelunghe C, Melai P. Absinthe: Enjoying a new popularity among young people? Forensic Sci Inter 2002; 130: 183-86.

10. Feridberg R. An investigation into the antimicrobial and anticancer activities of *Geranium incanum*, *Artemisia afra* and *Artemisia absinthium* [Dissertation]. South Africa: Faculty of Health Sciences, Nelson Mandela Metropolitan University; 2009. p.1-245.

11. Eddouks M, Maghrani M, Lemhadri A, Quahidi M.L, Jouad H. Ethnopharmacological survey of medicinal plants used for the treatment of diabetes mellitus, hypertension and cardiac diseases in the south-east region of Morocco (Tafilalet). J Ethnopharm 2002; 82: 97-103.

12. Cetto A, Heinrich M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. J Ethnopharm 2005; 99: 325-48.

13. Chen HH, Zhou HJ, Fang X. Inhibition of human cancer cell line growth and human umbilical vein endothelial cell angiogenesis by artemisinin derivatives *in vitro*. Pharm Res 2003; 48: 231-36.

14. Van der Kooy F, Verpoorte R, Marion Meyer J. Metabolic quality control of claimed anti-malarial *Artemisia afra* herbal remedy and *A.afra* and *A.annua* plant extracts. South African J Botany 2008; 74: 186-89.

15. Amart N, Upur H, Blazecovic B. *In vivo* hepatoprotective activity of aqueous extract of *Artemisia absinthium* L. against chemically and immunologically induced liver injuries in mice. Ethnopharmacology 2010; 31: 478-84.

16. Poiata A , Tuchilus C, Ivanescu B, Ionescu A, Lazar MI. Antibacterial activity of some *Artemisia* species extract. Rev Med Chir Soc Med Nat Lasi 2009; 113: 911-14.

17. Omer B, Krebs S, Omer H, Noor TO. Steroid-sparing effect of wormwood (*Artemisia absinthium*) in Crohn's disease: a double-blind placebo-controlled study. Phytomedicine 2007; 14: 87-95.

18. Bora K.S, Sharma A, Neruprotective effect of *Artemisia absinthium* L. on focal ischemia and reperfusion-induced cerebral injury. Pharm Biol 2010; 129: 403-409.

19. Asghar MN, Khan IU, Bano N. *In vitro* antioxidant and radical scavenging capacites of *citrullus colocinthes* (L) and *Artemisia absinthium* extract using prometasine hidrochloride radical cotion and contemporary assays. Food Sci Tec Int 2011; 17: 484-94.

20. Lachenmeier DW. Wormwood (*Artemisia absinthium*) a curious plant with both neurotoxic and neuroprotective properties. Ethnopharmacology 2010; 131: 224-27.

21. Nin S, Arfaioli P, Bosetto M. Quantitative determination of some essential oil components of selected *Artemisia absinthium* plants. Essen oil Res 1999; 3: 271-77.

22. Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T , Heyerick A. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with *Artemisinin* against malaria and cancer. Molecules 2010; 15: 3135-70.

23. Mannan A, Ahmed I, Arshad W, Asim FM, Qureshi AR, Hussain I and Mirza B. Survey of artemisinin production by diverse *Artemisia* species in northern Pakistan. Malaria Journal 2010; 9: 310.

24. Nezhadali A. Parsa M. Study of volatile compounds in *Artemisia absinthium* from Iran using HS/SPME/GC/MS. Adv Appl Sci Res 2010; 1: 174-79.

25. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immuno Meth 1983; 65: 55-63.

26. Carmichale J, De Graff WG, Gazdar AF, Mina JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium basedsemiautomated colorimetric assay: assessment of chemo sensitivity testing. Cancer Res 1987; 47: 936-42.

27. Rombauts K, Heyerick A. *Artemisia annua*. CAM-Cancer 2011; 5.

28. Zahi D, Supaibulwatana K, Zhong J. Inhibition of tumor cell proliferation and induction of apoptosis in human lung carcinoma 95-D cells by a new sesquiterpene from hairy root cultures of *Artemisia annua*. Phytomedicine 2010; 17: 856-61.

29. Haghi G, Safaei A, Safai Ghomi J. Idntification and determination of flafonoid in leaf, dried aqueous and dried hidroalcoholic extract of *Artemisia absinthium* by HPLC. Iran J Pharm Res 2004; 2: 89-90. [In Persian]

30. Ravizza R, Gariboldi MB, Molteni R, Monti E. Linaloole a plant derived monoterpene alcohol, reverses doxorubicin resistance in human breast adenocarcinoma cells. Oncology Reports 2008; 20: 625-30.

31. Usta J, Kreydiyyeh S, Knio K, Barnabe P, Bou-Moughlabay Y, Dagher S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. Chem Biol Interact 2009; 180: 39-46.

32. Hadri H, Gomez del Rio MA, Sanz J, Coloma AG, Idaomar M, Ozonas BR, et al. Cytotoxic activity of α-humulene and transcaryophyllene from *Salvia officinalis* in animal and human tumor cells. An R Acad Nac Farm 2010; 76: 343-56.

33. Vasiragu JS, Chang sok So, Young doo Won, Sastry G. *Artemisia princeps* var orientalis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells. Anticancer Res 2007; 27: 3891-98.

34. Bang MH, Han MW, Song MC, Cho JG, Chung HG, Jeong T, et al. Cytotoxic and apoptosis- inducing sesquiterpenoid isolated from the aerial parts of *Artemisia princeps* PAMPANINI (Sajabalssuk). Chem Pharm Bull 2008; 56; 1168-72.

35. Akrout A, Gonzalez LA, Hajer El J. Antioxidant and antitumor activities of *Artemisia campestris* and *Thymelaea hirsuta* from southern Tunisia. Food Chem Tox 2011; 49; 342-47.

36. D'Angel S, Morana A, Salvatore A, Zappia V, Galletti P. Protective effect of polyphenols from Glycyrrhiza glabra against oxidative stress in Caco-2 cells. J Med Food 2009; 12; 1326–33.

37. Devmurari VP, Jivani N P. Anticancer evaluation of *Artemisia nilagirica*. J Pharm Tech Res 2010; 2: 1603-608.

38. Zheng GQ. Cytotoxic terpenoids and flavonoids from *Artemisia annua*. Planta Med 1994; 60: 54-57.

39. Lee HG, Kim H, Oh WK Tetramethoxy hydroxyflavone p7F down-regulates inflammatory mediators via the inhibition of nuclear factor kappa B. Ann NY Acad Sci 2004; 1030: 555-56.

40. Zhou HJ, Wang WQ, Wu G D, Lee JLA. Artesunate inhibits angiogenesis and down regulates vascular endothelial growth factor expression in chronic myeloid leukemia K562 cells. Vascul Pharmacol 2007; 47: 131–38.

41. Luminita BM, Researches on the secretory tissue structure, composition of volatile oil and chorology on some species of Artemisia in Romania [Dissertation]. Bucharest, Romania: Faculty of horticulture, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine – Bucharest; 2011. p.1-7.

42. Rezaeinodehi A, Khangholi S. Chemical composition of essential oil of *Artemisia absinthium* growing wild in Iran. Pak J Biol Sci 2008; 11: 946-49.

43. Blagojevica P, RadulovIca N. Chemical composition of the essential oils of Serbian wild- growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. Agric Food Chem 2006; 54: 4780-89.

44. Haider F, Kumar N, Banerigee S, Naqvi A, Baggi G. Effect of altitude on the essential oil constituents of *Artemisia roxburghiana* Besser Var. Purpurascens (Jacq.) Hook J Essential Oil Res 2009; 21: 127-33.

45. Karimi F, Amini Eshkevari T, Zeinali A. Differences of total alkaloid, atropine and scopolamine contents in leaves of *Atropa belladonna* L. from Vaz area - north of Iran in relation to some environmental and phenological factors. Iran J Plant Biology 2010; 1: 77-88.

46. Sotomayor JA, Martínez C, Monino MI, Lax V, Quilez M, Jordan MJ. Effect of altitude on *Rosmarinus officinalis* L. essential oil in Murcia (SPAIN). Inter Soc Hortil Sci 2009; 826: 309-16.

47. Habibi H, Mazaheri D, Majnoun Hoseini N, Chaeichi MR, Fakhre Tabatabai M, Bigdeli M. Effect of altitude on essential oil and component in wild thym (*Thymus kotschianus* Boiss) taleghan region. Pajouhesh and Sazandegi 2007; 19: 2-10. [In Persian]

48. Kaul MK. Height altitude botanicals in integrative medicine-case studies from North West Himalaya. Indian J Trad Knowl 2010; 9: 18-25.

49. Thu BT, Minh TV, Lim BP, Keng Cl. Effects of environmental factors on growth and artemisinin Content of *Artemisia annua* L. University of Sains Malaysia,1-7.