

مقاله پژوهشی

القای مرگ سلولی در سلول‌های سرطانی پستان MCF-7 کشت شده در ژل فیبرین توسط
عصاره هیدروالکلی بومادران (*Achillea Santolina*)

الهام حویزی*، پیمان عبدالعلی‌نژاد

گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

*مسئول مکاتبات: e.hoveizi@scu.ac.ir

DOI: 10.22034/ascij.2023.1966271.1420

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۰۴

چکیده

تلاش برای توسعه ترکیبات ضد سرطان به‌طور پیوسته ای ادامه دارد. نتایج برخی از پژوهش‌ها تاکید می‌کنند ترکیبات گیاه بومادران روی چندین رده سلول‌های سرطانی اثرات مهاری دارند. هدف پژوهش حاضر بررسی اثر سمیت عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران بر سلول‌های سرطانی پستان انسان رده MCF-7 در هیدروژل فیبرین است. در این پژوهش تجربی، برای تهیه داربست هیدروژل فیبرینی، محیط M199 حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین و پودر فیبرینوژن با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ترومبین با غلظت ۱۲۰ واحد بر میلی‌لیتر مورد استفاده قرار گرفت. سلول‌های MCF-7 کشت شده در ژل فیبرین به مدت ۲۴ ساعت با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران تیمار شدند. در روزهای تعیین شده پس از تیمار، مورفولوژی، بقا و تکثیر سلولی با رنگ‌آمیزی دپی و آزمون MTT ارزیابی شد. همچنین بررسی ساختار داربست و وضعیت استقرار سلول در ژل با عکسبرداری با میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام گرفت. نتایج این مطالعه نشان دهنده تاثیرات سایتوتوکسیک عصاره بومادران به‌صورت وابسته به دوز و زمان بود. غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بومادران به‌عنوان غلظت IC50 بعد از ۲۴ ساعت تعیین گردید. همچنین مقایسه میانگین بقای سلولی در گروه کنترل و گروه تیمار شده با غلظت IC50 عصاره بومادران در روزهای ۱، ۳ و ۵ تفاوت‌های معنی‌داری ($p < 0/05$) را نشان داد. عصاره هیدروالکلی بومادران می‌تواند به‌صورت وابسته به دوز و زمان، سبب مهار رشد سلول‌های MCF-7 و القاء مرگ سلولی شود.

کلمات کلیدی: بومادران، بقا سلولی، سرطان پستان، داربست هیدروژلی.

مقدمه

تفاوت، ویژگی‌های اختصاصی و متمایزی دارد. تقریباً ۸۵ درصد سرطان‌ها در سلول‌های اپیتلیالی رخ داده و به‌عنوان کارسینوما شناخته می‌شوند. سرطان‌هایی با منشاء سلول‌های مزودرمی (مثل استخوان و ماهیچه) سارکوما و سرطان‌های بافت غده‌ای (مانند

سرطان، گروهی از بیماری‌ها را شامل می‌شود که مشخصه‌ی آنها، رشد سلولی تنظیم نشده، تهاجم و انتشار سلول‌ها از جایگاه اصلی یا مکان اولیه به نقاط دیگر بدن می‌باشد. تاکنون بیش از صد نوع سرطان شناخته شده است و سرطان هر بافت بدن منشاء

یا در بخش فوقانی منشعب، برگ‌ها پوشیده از کرک، دو بار منقسم و تک‌شانه‌ای، پهن، دراز، سرنیزه‌ای یا خطی است. گل به رنگ سفید یا سفید متمایل به زرد یا سفید متمایل به ارغوانی، مجتمع در کاپیتول‌ها یا کپه‌های کوچک به صورت دیهیم شکل بوده و میوه فندقه است (۲۵). همه‌ی قسمت‌های گیاه دارای بوی نافذ و تلخ مزه و دارای گل‌هایی به رنگ زرد با بویی معطر و نافذ است. محل رویش بومادران، ارتفاعات البرز، دماوند، گچسار، کندوان، پلور، ارومیه، تبریز و راسوند می‌باشد (۲۴). در طب سنتی گیاه بومادران برای درمان زخم، جلوگیری از خونریزی، خلط آور، تسکین دهنده تنگی نفس، درمان عفونت، ضد شوره سر، مصارف بهداشتی و درمانی کاربرد داشته و بخش مورد استفاده آن بیشتر سرشاخه‌های آن می‌باشد (۱۳).

یکی از ابزارهای نوین در کشت سلولی استفاده از داربست است که هدف آن تولید ساختارهایست که بتوان ریز محیط‌زیستی واقعی که ماتریکس خارج سلولی از خود نشان می‌دهد را خلق کنند. از این رو، این ساختارها، بایستی ترکیبی از ویژگی‌های بیوفیزیکی، بیومکانیکی و بیوشیمیایی را که فعالیت‌های تکثیر، تمایز و بقا سلول‌ها را هدایت می‌نمایند از خود نشان دهند. فیرین یک ماده زیست تخریب پذیر طبیعی است که قابلیت کاربرد به‌عنوان یک داربست کارآمد در مهندسی بسیاری از بافت‌ها را دارد (۱۱). داربست فیبرینی شبکه‌ای از پروتئین‌ها است که در کنار هم نگهداری شده و از انواع بافت‌های زنده محافظت می‌کنند. این داربست می‌تواند به‌طور طبیعی توسط بدن پس از آسیب تولید شود، با این حال همچنین می‌توان با استفاده از روش‌های مهندسی بافت به عنوان یک جایگزین بافت جهت بهبود سریعتر بافت آسیب دیده آن را طراحی نمود. داربست حاوی مواد زیستی است که به‌طور طبیعی متشکل از

پستان) آدنوکارسینوما نامیده می‌شوند (۹، ۱۰). در بیماری سرطان آپوپتوز فرایندی کلیدی به حساب می‌آید و توانایی فرار سلول‌های سرطانی از آپوپتوز و ادامه‌ی تکثیر یکی از ویژگی‌های اولیه‌ی سلول‌های سرطانی است و بنابراین توانایی القای آپوپتوز در این سلول‌ها یک هدف اصلی و مهم در درمان سرطان است. فرایند آپوپتوز یا مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول به عنوان روشی حفاظت شده و تحت کنترل ژن-هاست که به منظور حذف سلول‌های ناخواسته در موجودات زنده به‌کار می‌رود. این فرآیند از جمله مهم‌ترین فرآیندهای تکوینی بوده که در تنظیم میزان رشد و تکثیر سلول‌ها اهمیت دارد (۱، ۵).

در حال حاضر آپوپتوز، پایه‌ای برای هدف‌های درمانی جدید است که سبب القای مرگ سلول‌های سرطانی یا حساسیت آنها در مقابل عوامل سمیت سلولی شده و تاثیر پرتودرمانی را افزایش می‌دهد لذا این فرآیند به شدت مورد مطالعه محققین حوزه سرطان قرار گرفته است (۱۵). در بسیاری از سرطان‌ها، پروتئین‌های پروآپوپتوتیک دچار جهش و غیرفعال شده در حالی که پروتئین‌های آنتی‌آپوپتوتیک بیش از حد بیان می‌گردند که منجر به رشد نامطلوب تومور، عدم پاسخ‌دهی به استرس‌های سلولی، جهش‌های مضر و آسیب DNA می‌گردد. لذا امروزه بسیاری از داروهای تولید شده در زمینه سرطان سبب تنظیم مرگ سلولی می‌شوند (۱۴). از سوی دیگر، از زمان‌های دور تا به امروز از طب سنتی برای درمان انواع بیماری‌ها از جمله سرطان استفاده شده است. داروهای گیاهی از جمله داروهای مورد استفاده در طب سنتی هستند که بواسطه‌ی اثرات جانبی ناچیز در مقایسه با داروهای شیمیایی مورد توجه محققین علوم پزشکی و دارویی قرار دارند (۱۹، ۶). گیاه بومادران با نام علمی *Achillea santolina* گیاهی است از تیره کاسنی، پایا، به ارتفاع ۱۵ تا ۹۵ سانتیمتر، ساقه ایستاده

۴۸ ساعت انجام گرفت تا زمانی که سلول‌ها حدود ۷۰ تا ۸۰ درصد کف فلاسک (SPL, Korea) را پوشاندند. پاساژ سلولی به این ترتیب انجام گرفت که محیط رویی فلاسک خارج و سطح رویی سلول‌ها با ۲ سی‌سی (Sigma, USA) PBS به منظور خارج سازی سلول‌های مرده باقی مانده شست‌وشو شد، آنگاه به هر فلاسک T25 حدود ۲ میلی لیتر تریپسین (Gibco, USA) اضافه و در انکوباتور برای مدت ۱ الی ۲ دقیقه نگهداری و سپس محتویات فلاسک به فالكون ۱۵ سی‌سی منتقل و با دور ۱۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

کشت سلولی سه‌بعدی: در این پژوهش به منظور کشت سه‌بعدی، سلول‌ها بر روی محیط کشت با داربست هیدروژل فیبرین به ترتیب ذیل کشت انجام شد: شست‌وشوی فلاسک سلولی، تریپسینه کردن سلول‌ها، تهیه رسوب سلولی و ایجاد سوسپانسیون سلول‌های منفرد، بررسی توان زیستی سلول‌ها و شمارش سلولی با لام نئوبار انجام شد. برای کشت سلولی در داربست هیدروژل فیبرینی، محیط M199 (Sigma, USA) حاوی ۱۰ درصد سرم FBS و ادرصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین و پودر فیبرینوژن (Sigma, USA) با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، مورد استفاده قرار گرفت. ابتدا داربست سلولی (محیط M199 حاوی FBS و Pen-Sterep + فیبرینوژن با غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به هر چاهک و سپس سوسپانسیون سلولی اضافه و به آرامی برای جلوگیری از تشکیل حباب، آسپیره شد. در ادامه به ازای ۵۰۰ میکرولیتر داربست و سلول در هر چاهک ۱۵ میکرولیتر ترومبین (Sigma, USA) با غلظت ۱۲۰ u/ml اضافه گردید و بلافاصله به آرامی آسپیره شد و محیط کشت به حالت ژلاتینی درآمد و پلیت کشت سلولی به انکوباتور منتقل شد.

یک شبکه فیبرینی با ارتباطات عرضی می‌باشد که باعث استفاده گسترده از آن در کاربردهای زیست پزشکی شده است، فیبرین متشکل از فیبرینوژن و ترومبین (پروتئین‌های خون) است که در انعقاد خون شرکت می‌کنند، چسب فیبرین و لخته نیز به عنوان یک داربست فیبرینی به حساب آمده و جهت کنترل خونریزی حاصل از جراحی، بهبود سریع‌تر زخم، مهر و موم کردن ارگان‌های توخالی بدن و یا پوشاندن منافذ حاصل از بخیه استاندارد و دارورسانی آهسته و پیوسته به بافت مورد نظر مورد استفاده قرار می‌گیرد (۳، ۴). با توجه به نقش گیاه بومادران و تاثیر مثبت آن بر مقاومت بدن و همچنین نقش ضد توموری ترکیبات گیاهی، به نظر می‌رسد استفاده گیاهان و طب سنتی می‌تواند یکی از راهکارهای مفید در سرکوب سلول‌های سرطانی با عوارض جانبی کمتر باشد. لذا هدف از انجام این پروژه بررسی اثرات سمیت عصاره هیدروالکلی بومادران بر رده‌ی سلول‌های سرطانی سینه MCF-7 کشت داده شده در داربست‌های هیدروژل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه سلول: در این پژوهش، از رده سلول‌های سرطان پستان MCF-7 به عنوان سلول سرطانی استفاده شد. سلول‌ها از انیستیتو پاستور تهران به صورت کشت داده شده در فلاسک T-25 خریداری شد و سپس در انکوباتور (سینا، ایران) نگهداری شد تا زمانی که به تراکم ۸۰-۷۰ درصد رسید، پاساژ انجام شود.

پاساژ سلولی: سلول‌ها در محیط کشت DMEM (Gibco, USA) با ۱۰٪ FBS (Gibco, USA) نگهداری شدند. سلول‌ها روزانه در شرایط استریل با میکروسکوپ معکوس از نظر رشد، تقسیم سلولی، مورفولوژی و همچنین کنترل آلودگی باکتریایی و قارچی مورد بازدید قرار گرفتند، و تعویض محیط هر

چاهک سلولی محلول PBS اضافه و شست‌وشو انجام شد. پس از خروج PBS از چاهک‌های سلولی، به چاهک‌های مربوط غلظت‌های ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران اضافه گردید اما به گروه کنترل فقط محیط کشت کامل اضافه شد. غلظت IC50 بعد از ۲۴ ساعت بررسی و تعیین گردید. سپس این سلول‌ها ۱، ۳ و ۵ روز تحت تیمار با غلظت IC50 قرار گرفتند.

انجام تست MTT: بدین منظور زمانی که سلول‌های مورد نظر در تراکم $10^4 \times 1$ سلول در هر چاهک، در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن و رسیدن به تراکم مطلوب، مایع رویی با غلظت‌های مختلف از تیمار تعویض و همراه با محیط کشت حاوی ۱۰٪ FBS به چاهک‌ها اضافه گردید پس از ۲۴ ساعت تیمار سوپرناتانت رویی خارج و با ۱۰۰ میکرولیتر PBS هر چاهک شست‌وشو داده شد. آنگاه محلول MTT را با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر به نسبت ۱ به ۹ (۹ قسمت محیط کشت و ۱ قسمت محلول MTT) ترکیب کرده سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فوق به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۳ الی ۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد سپس محتویات کشت با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر DMSO به منظور حل کردن کریستال-های فورمازان به هر چاهک اضافه و محتویات هر چاهک به آرامی با سمپلر، پیتاژ شد و به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. در ادامه جذب نوری محلول در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه (Fax Stat, USA) خوانده شد.

رنگ‌آمیزی سلول‌ها با روش گیمسا: رنگ‌آمیزی گیمسا یکی از تکنیک‌هایی است که در کشت سلول برای بررسی مورفولوژی هسته و سیتوپلاسم و نسبت این دو در این پژوهش سلول‌های تحت تیمار با

آماده‌سازی داربست برای عکس‌برداری با میکروسکوپ الکترونی: در این مطالعه، به منظور عکس‌برداری SEM، سلول‌های MCF-7 بر روی داربست هیدروژل فیبرین کشت داده شدند و به همین ترتیب داربست‌های فاقد سلول تهیه و بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، تثبیت داربست جهت عکس‌برداری SEM بدین صورت انجام شد که؛ محیط روی هر چاهک به آرامی خارج شد. هر چاهک پلیت ۲۴‌خانه ۳۰۰ میکرولیتر PBS اضافه کرده و شست‌وشو ۳ مرتبه انجام و به هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر محلول گلو تاردهید ۲/۵ درصد اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲ بار شست‌وشوی هر چاهک با ۳۰۰ میکرولیتر PBS انجام شد. مراحل آب‌گیری با غلظت صعودی الکل (۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۹۰، ۱۰۰، ۱۰۰ درصد) انجام شد. در پلیت را بسته و در فریزر -۲۰ به مدت ۲ ساعت نگهداری و به مدت ۲ ساعت عملیات فریزدرای جهت خشک کردن و دهیدراته کردن هیدروژل فیبرین انجام شد. عکس‌برداری از داربست‌های هیدروژل فیبرینی فاقد و دارای سلول با میکروسکوپ الکترونی (Leo 1455VP, UK) انجام شد.

طرز تهیه تیمار عصاره‌ی بومادران: ۱۰ گرم از پودر خشک عصاره هیدروالکلی بومادران خریداری شده از شرکت سهاجیسا در ۱۰ سی‌سی محیط حل و با استفاده از فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرون، استریل و به عنوان استوک، درون یخچال نگهداری شد و سپس برای استفاده، رقیق سازی شد.

تیمار سلولی: پس از گذشت ۲۴ ساعت از انکوباسیون سلول‌ها در انکوباتور و بررسی مورفولوژی سلول‌ها با میکروسکوپ معکوس، تیمار سلولی بدین ترتیب صورت گرفت که، ابتدا محیط کشت روی سلول‌ها از هر چاهک خارج شد و به هر

نتایج

بررسی مورفولوژی داربست هیدروژل فیبرین و سلول‌های کشت داده شده با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM): نتایج حاصل از بررسی مورفولوژی داربست سه بعدی هیدروژل فیبرین فاقد سلول و سلول‌های MCF-7 کشت داده شده بر این داربست، با استفاده از روس عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی SEM، نشان دهنده خواص مکانیکی مطلوب و تخلخل مناسب داربست تهیه شده (الف و ب) و همچنین بقاء، رشد، تکثیر و چسبندگی مناسب سلول‌ها به داربست و ایجاد مورفولوژی طبیعی سه بعدی و حالت نرمال این سلول‌های است (شکل ۱).

رنگ آمیزی سلول‌های MCF-7 با رنگ گیمسا: به منظور بررسی دقیق‌تر تغییرات مورفولوژیکی ردهی سلولی MCF-7 و تایید نتایج به دست آمده، پس از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های IC50 عصاره هیدروآلکلی بومادران (500 mg/ml)، تعداد $10^4 \times 2/5$ سلول در هر خانه از پلیت کشت داده شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلولی، سلول‌ها را با رنگ گیمسا (غلظت ۰.۴٪) رنگ‌آمیزی نموده و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار دادیم. پس از این رنگ‌آمیزی سلول‌های نمونه شاهد دارای سیتوپلاسم شفاف، هسته‌های درشت و وجود کلونی-های به هم پیوسته سلولی بودند که نشانه مورفولوژی کاملاً طبیعی و سالم بودند آنها بود، درحالی که سلول‌های MCF-7 تحت تیمار، تغییرات مورفولوژیکی شامل: چروکیدگی و فشردگی سیتوپلاسم و هسته سلول‌ها، کاهش حجم سلولی، از دست دادن چسبندگی سلولی و جدا شدن تعدادی از سلول‌ها از کف چاهک و شناور بودن در محیط سلولی را نشان دادند که نشانه‌ی اثر کشندگی غلظت-های اعمالی بر سلول‌ها می‌باشد (شکل ۲).

عصاره و گروه کنترل منفی با رنگ گیمسای ۴ درصد رنگ‌آمیزی شدند و تغییرات مورفولوژی آنها با استفاده از میکروسکوپ اینورت بررسی شد. رنگ‌آمیزی گیمسا به این شرح انجام شد که ۱۰۰-۲۰۰ میکرولیتر متانول (۱۰۰٪) به هر چاهک جهت تثبیت به مدت ۳-۵ دقیقه اضافه شد. چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر PBS شسته شدند؛ مجدداً PBS خارج شد و به هرچاهک ۱۵۰-۱۰۰ میکرولیتر رنگ گیمسا ۴٪ اضافه شد، سلول‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در معرض رنگ ماندند و سپس رنگ خارج گردید. عملیات شست‌وشو با PBS انجام و به مدت ۲ دقیقه روی سلول‌ها ماند و سپس خارج گردید و این عملیات دو مرتبه انجام شد. درنهایت با میکروسکوپ نوری معکوس (Bioered, USA) عکس‌برداری از سلول‌ها انجام شد.

رنگ آمیزی هسته با رنگ DAPI: به منظور رنگ-آمیزی DAPI سلول‌ها در پلیت ۴۸ خانه کشت و تیمار شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت از تیمار سلول‌ها با پارا فرم آلدئید ۴ درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق فیکس شد و پس از شست و شو به مدت ۱ الی ۵ دقیقه در دمای اتاق تحت اثر رنگ DAPI با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر قرار داده شدند در نهایت پس از شست و شو با میکروسکوپ فلوروسنت (Olympus, Japan) بررسی شدند.

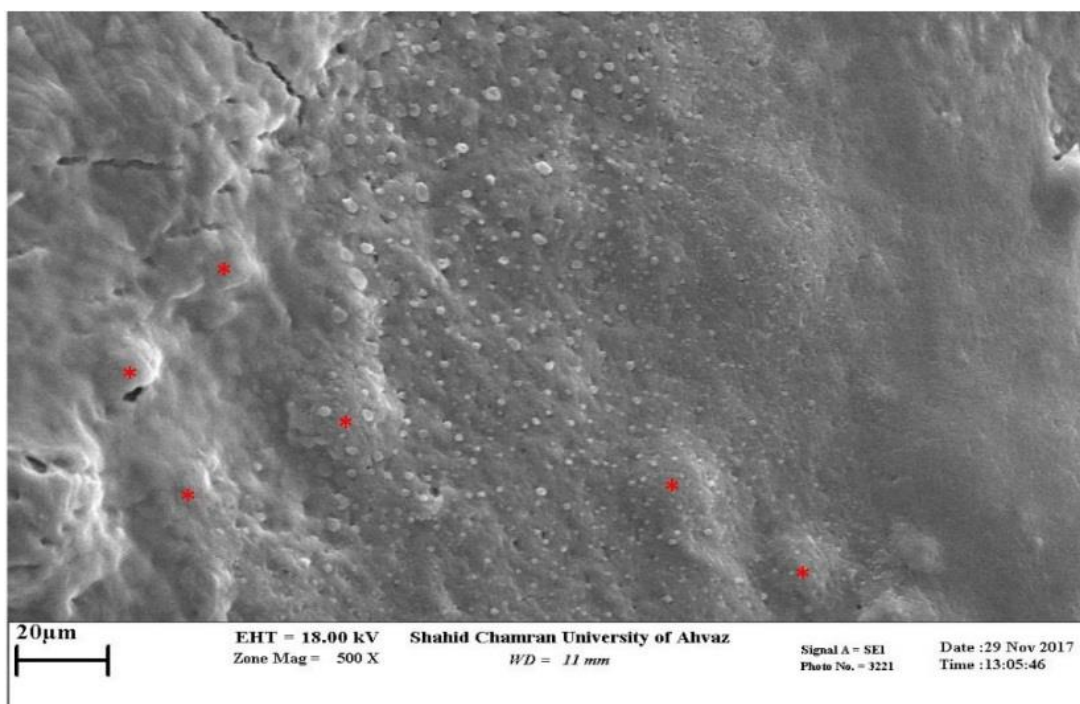
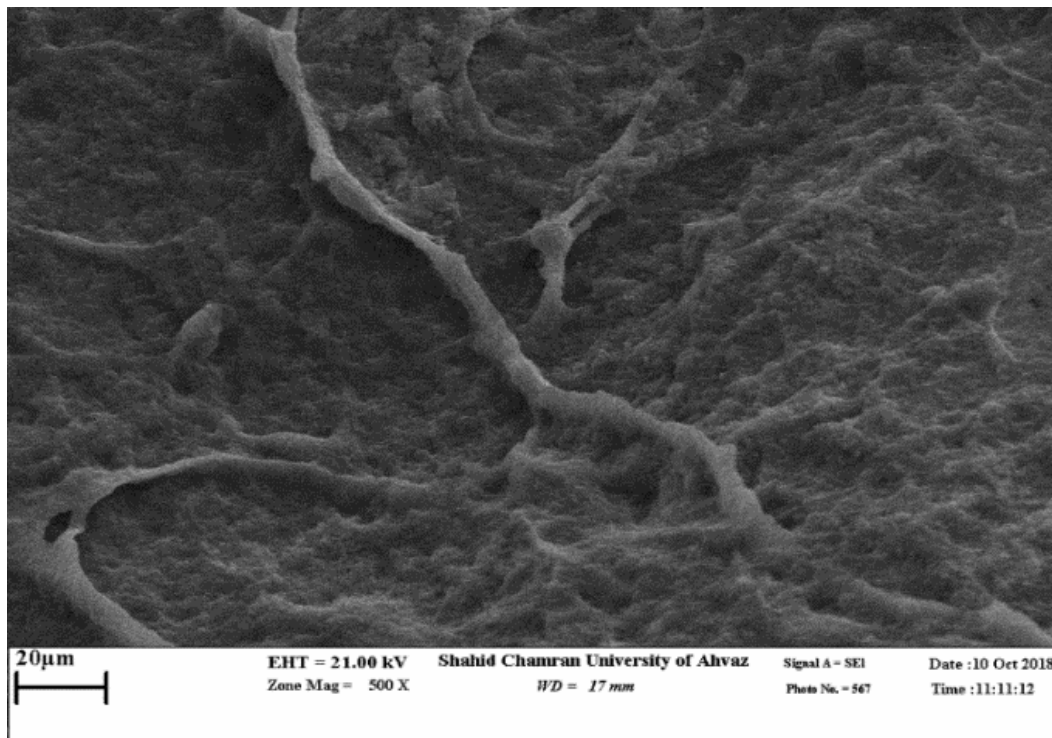
بررسی آماری: داده‌های حاصل، با کمک نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) و آزمون one-way ANOVA و Tukey انجام گردید. رسم نمودار در Excel 2016 انجام گرفت. $P < 0.05$ برای نمونه‌ها به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

به‌دست آمده و بقای سلول‌هایی که تحت تیمار ۲۴ ساعته در سه تکرار ($n = 3$) با غلظت‌های (۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره بومادران قرار گرفتند، به ترتیب به میزان (۸۰، ۹۵، ۹۹، ۷۱، ۵۰، ۴۴ درصد) رسید (شکل ۴). نمودار بیانگر این است که میزان بقای سلول‌های MCF-7 به طور معنی‌داری وابسته به مقادیر غلظت عصاره بومادران اعمال شده بر آنهاست. بر این اساس، (IC_{50}) به دست آمده برای این سلول‌ها، دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید.

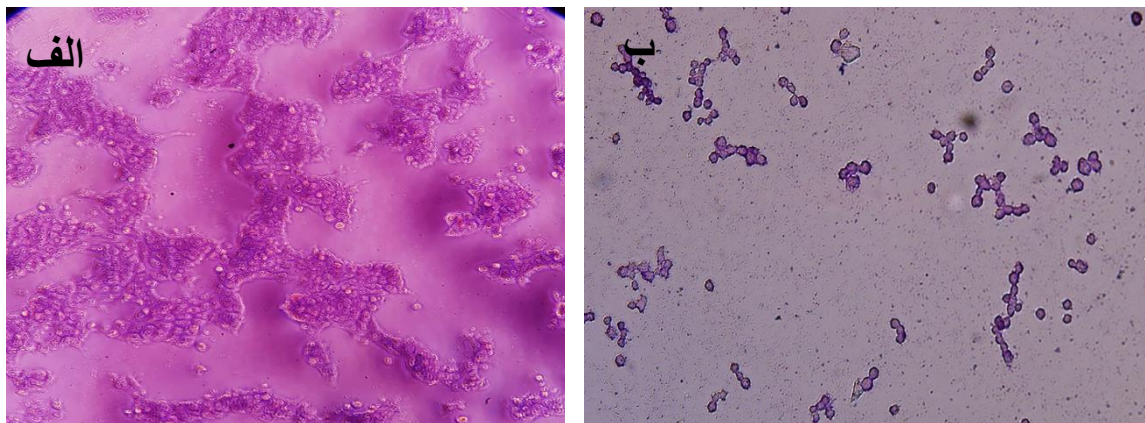
بررسی بقای سلول‌های MCF-7 تیمار شده با بومادران در روزهای مختلف با روش MTT: روش بررسی بقای سلولی با استفاده از تست MTT (با سه بار تکرار) مشخص شد که میانگین جذب نوری و بقای سلول‌های سرطانی MCF-7 تحت تیمار عصاره هیدروالکلی بومادران با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (IC_{50}) پس از گذشت ۱، ۳ و ۵ روز به صورت وابسته به زمان کاهش یافت به نحوی که بعد از گذشت ۲۴ ساعت درصد بقا به ۵۰ درصد رسید، پس از ۳ روز، ۳۷ درصد و در روز ۵، سلول‌های زنده به ۲۵ درصد کاهش یافتند. مشاهده‌ی واکنش‌ها و کاهش شدید درصد سلول‌های زنده در محیط کشت در این روزهای مختلف نشان می‌دهد که عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران، به‌طور معنی‌دار و وابسته به زمان بر سلول‌های سرطانی MCF-7 اثر سیتوتوکسیک دارد (شکل ۵).

رنگ‌آمیزی سلول‌های MCF-7 با رنگ DAPI: به منظور بررسی تغییرات هسته در سلول‌های MCF-7 حاصل از تیمار با غلظت‌های IC_{50} عصاره هیدروالکلی بومادران (۵۰۰ mg/ml)، این سلول‌ها با رنگ DAPI رنگ‌آمیزی شدند. DAPI یک رنگ فلوروسنت است که برای مشاهده هسته سلول به‌کار می‌رود و می‌تواند اتصال قوی و محکمی با ناحیه بازهای A-T در دو رشته DNA برقرار کند. به منظور رنگ‌آمیزی، سلول‌ها پس از کشت در پلیت ۲۴ خانه، تیمار سلول‌ها با غلظت‌های IC_{50} از عصاره بومادران صورت گرفت و پس از طی ۲۴ ساعت، رنگ‌آمیزی DAPI بر روی سلول‌های MCF-7 انجام شد. در گروه‌های سلولی تیمار (ب) تغییراتی مانند چروک خوردن، کوچک و منفرد شدن هسته‌ی سلول‌ها و همچنین متلاشی شدن آن‌ها، کروماتین فشرده و قطعه قطعه شده، دیده شد. این تغییرات از خصوصیات سلول‌های آپوپتوزی می‌باشد و نشان‌دهنده‌ی آغاز روند مرگ سلول‌ها در گروه‌های تیمار می‌باشد. در حالی که در گروه کنترل (الف) که شامل سلول‌های تیمار نشده است، هسته سلول‌ها کاملاً کروی، بزرگ، شفاف و با رنگی روشن، دیده می‌شود، همچنین تجمع سلول‌ها در کنار هم و ایجاد نقاط روشن بزرگ، نشان‌دهنده‌ی کلنی‌های سلول‌های سالم و زنده می‌باشد (شکل ۳).

نتایج آزمون زیست‌پذیری: نتایج آماری حاصل از انجام تست MTT نشان داد که میانگین جذب نوری

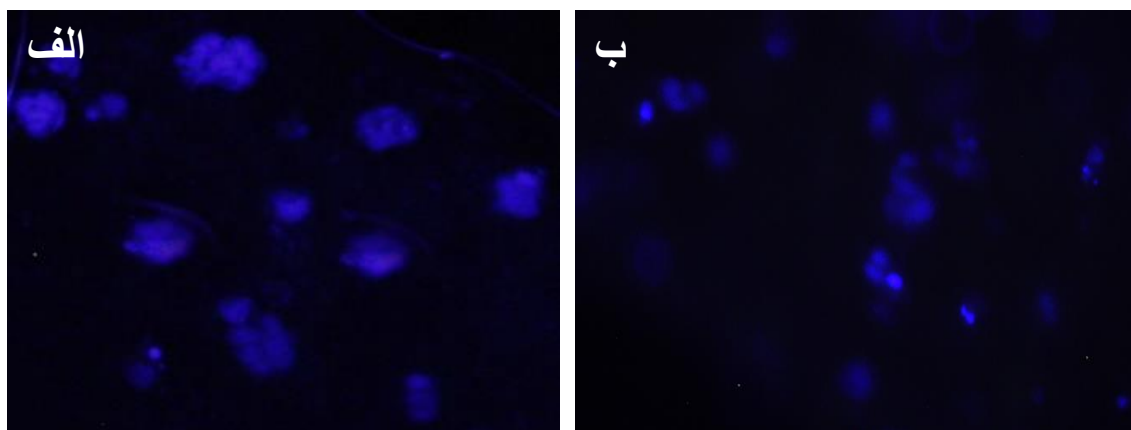


شکل ۱- بررسی مورفولوژی داربست هیدروژل فیبرینی و سلول‌های کشت داده شده با میکروسکوپ الکترونی SEM. تصویر بالا داربست‌های بدون سلول، نشان دهنده تخلخل و ساختار مکانیکی مطلوب داربست. در تصویر پایین مورفولوژی سلول‌ها روی داربست (با ستاره قرمز مشخص شده) قابل مشاهده است. این تصاویر نشان‌دهنده‌ی حضور با مورفولوژی طبیعی سلول‌ها و چسبندگی و ارتباط مناسب آن‌ها با داربست است.



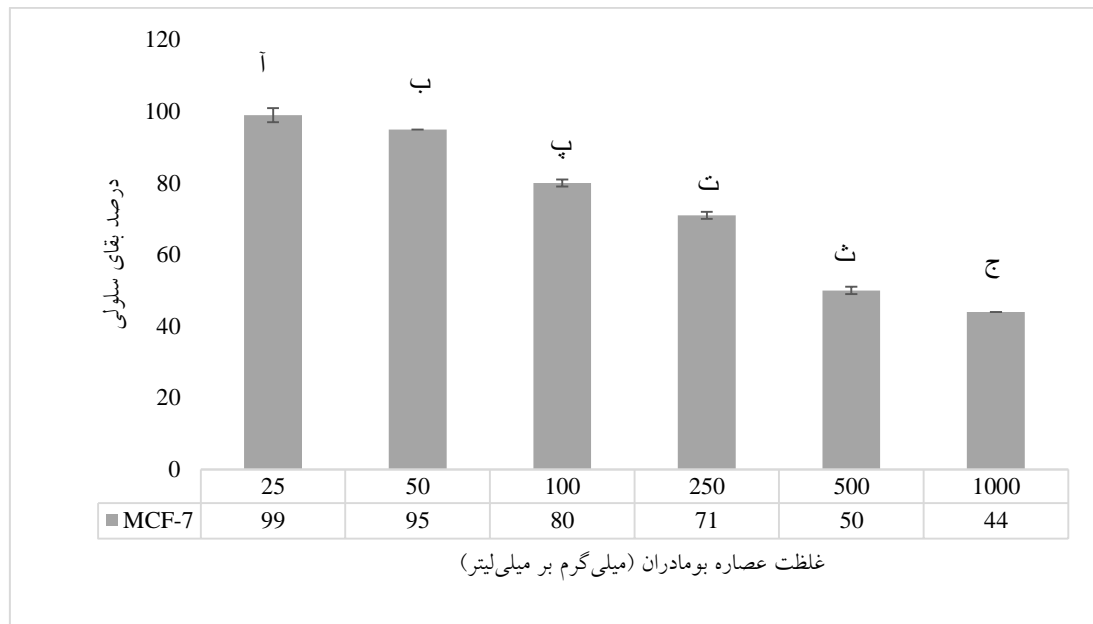
100µm

شکل ۲- بررسی مورفولوژی سلول‌های نمونه کنترل و تیمار شده با غلظت‌های IC_{50} عصاره هیدروالکلی بومادران (۵۰۰ میلی-گرم/میلی‌لیتر) به کمک رنگ‌آمیزی گیمسا (۴٪) در شرایط کشت در هیدروژل سلول‌های MCF-7. الف) گروه کنترل. ب) سلول‌های تیمار شده. براساس تصاویر در گروه‌های تحت تیمار، کاهش تعداد و حجم سلول‌ها و چروکیدگی سیتوپلاسم‌ها و از دست دادن چسبندگی سلولی قابل تشخیص است، در مقابل سلول‌های نمونه شاهد که دارای سیتوپلاسم شفاف، هسته‌های درشت و وجود کلونی‌های به هم پیوسته سلولی و نشانه زنده و سالم بودن و مورفولوژی طبیعی آن‌ها است. این نتایج تایید کننده مرگ سلولی نمونه‌های تیمار شده است.

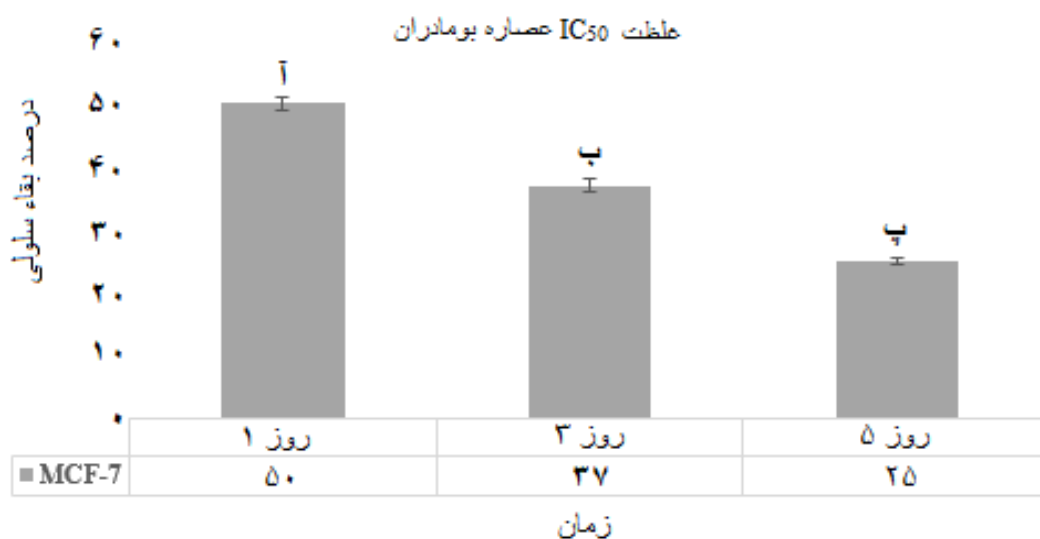


100µm

شکل ۳- بررسی روند تغییرات هسته در سلول‌های MCF-7 کنترل و تیمار با استفاده از رنگ‌آمیزی DAPI. الف) گروه کنترل. ب) سلول‌های تیمار شده با غلظت IC_{50} (۵۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) عصاره بومادران. در گروه سلولی تیمار (ب) تغییراتی مانند چروک خوردن، کوچک و منفرد شدن هسته‌ی سلول‌ها، متلاشی شدن آن‌ها و همچنین کروماتین‌های قطعه‌قطعه و فشرده، دیده می‌شود.



شکل ۴- نمودار اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی بومادران بر زیست‌پذیری سلول‌های MCF-7 در زمان ۲۴ ساعت با سه بار تکرار (n=۳) که نشان می‌دهد زیست‌پذیری این سلول‌ها به صورت معنی‌داری وابسته به غلظت عصاره است. IC₅₀ به دست آمده برای سلول‌های MCF-7 دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره بومادران در نظر گرفته شد.



شکل ۵- درصد بقای سلول‌های MCF-7 که ۱، ۳ و ۵ روز پس‌تیمار شدن با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (IC₅₀) عصاره هیدروالکلی بومادران، به ترتیب مقادیر ۵۰، ۳۷ و ۲۵ درصد را در تست MTT نشان می‌دهد و نمایان‌گر اثر معنی‌دار کشندگی این غلظت از عصاره‌ی گیاه بومادران بر سلول‌هاست، که وابسته به زمان نیز می‌باشد (n = ۳).

بحث

پژوهش اثرات عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران بر سلول‌های سرطانی رده MCF-7 بررسی شد و نتایج نشان داد که عصاره بومادران اثر سیتوتوکسیک بر

سرطان سینه با وجود پیشرفت‌های زیاد در مورد تشخیص زود هنگام و برخی درمان‌ها، همچنان مهمترین عامل مرگ و میر در زنان است (۱۶). در این

فلاونوئیدها دارای اثرات سیتوتوکسیک می‌باشند (۸). در همین راستا نتایج پژوهش زینیوند و همکارانش نشان می‌دهد که ترانس سینامیک اسید که محصول دامیناسیون فنیل آلانین در تمام بافت‌های گیاهی و اولین پیش‌ساز فلاونوئیدها و کومارین‌ها است، دارای اثرات ضد توموری موثری بر سلول‌های MCF-7 می‌باشد (۲۲). همچنین سالم و همکارانش نشان دادند که عصاره گیاهان *santolina* و ترب به دلیل داشتن پلی فنل‌ها، فلاونوئیدها و آنتی‌اکسیدان‌ها بر تکثیر سلول‌های سرطانی آدنوکارسینوم روده بزرگ (Caco2)، سرطان پستان (MCF-7) و سرطان کبد (HepG2) اثر مهاری دارند (۹). البته مطالعات بیشتری در جهت مشخص نمودن مکانیسم مولکولی درگیر در این مشاهدات و همچنین تعیین ماده موثره عصاره گیاه بومادران مورد نیاز است. علاوه بر این، پیشنهاد می‌شود اثرات عصاره هیدروالکلی بومادران بر رده‌های سلولی سرطانی و نرمال دیگر بررسی و مقایسه شود.

نتیجه‌گیری

بر طبق نتایج این تحقیق عصاره هیدروالکلی گیاه بومادران دارای اثر سمیت وابسته به دوز و زمان در سلول‌های سرطانی پستان کشت داده شده بر هیدروژل فیبرینی می‌باشد و غلظت IC50 برای این عصاره ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد که می‌تواند به عنوان گیاه دارویی مناسب و کاندیدی در طب سنتی مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

هزینه تحقیقات از محل اعتبارات پژوهانه معاونت پژوهشی دانشگاه شهیدچمران اهواز تامین گردیده است. نویسندگان این مقاله کمال تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی و فن‌آوری دانشگاه شهید چمران اهواز به‌خاطر حمایت‌های مالی اعلام می‌دارد.

سلول‌های سرطانی MCF-7 داشته، به طوری که این اثرات وابسته به زمان و دوز استعمال شده در آزمایش بوده است. در واقع با افزایش زمان، سمیت عصاره افزایش یافت و در این پژوهش به وسیله آزمون MTT، میزان IC50 برای عصاره، ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. مطالعات قبلی محققان تایید کننده اثرات سیتوتوکسیک گیاهان دارویی متعددی بر رده‌ی سلول‌های MCF-7 بوده‌اند از جمله تاثیر عصاره هیدروالکلی برگ گیاه سدر (۷)، ماده‌ی سیلیبنین عصاره خار مریم (۲۰)، گیاه دارویی چینی آرتیمیزیا آنوا (۱۲)، ماده آلوئه امودین استحصال شده از برگ گیاه آلوئه ورا (۲۳)، و یا عصاره هیدروالکلی گیاه سیاه‌دانه (۱۷)، که همگی تاثیرات سیتوتوکسیک بر سلول‌های MCF-7 داشته‌اند.

در طی سال‌های گذشته مطالعات و تحقیقاتی با جنبه‌های مختلف روی گیاه بومادران انجام شده است از جمله، در پژوهشی که توسط امجد و همکارانش صورت گرفت، اثر عصاره‌های متانولی گیاه بومادران بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس آرنئوس بررسی شد که نتایج کار آنها اثر ضد باکتریایی این گیاه را تایید کرد (۲۱). همچنین خاصیت آنتی-اکسیدانی این گیاه توسط میرزایی و همکاران به اثبات رسید (۲). گزارش موتانا و همکارانش نیز خواص ضد سرطانی فلاونوئیدهای گیاهی استخراج شده توسط عصاره الکی گیاه بومادران را تایید کردند (۱۸).

دلالتی اصفهانی و همکاران با بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره نوعی از گیاه بومادران با نام علمی *Achillea wilhelmsii* بر رده سلول‌های سرطانی کولن انسان (HT-29)، به این نتیجه رسیدند که عصاره متانولی این گیاه به علت داشتن ترکیبات فنولی و به خصوص فلاونوئیدی اثر مهاری بر روی این رده سلول سرطانی دارند. لازم به ذکر است که

8. Galavi H.R., Saravani R., Shahraki A., Ashtiani M., 2016. Anti-proliferative and apoptosis inducing potential of hydroalcoholic *Achillea wilhelmsii* C. Koch extract on human breast adenocarcinoma cell lines MCF-7 and MDA-Mb-468. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 29(6 Suppl):2397-2403.

9. Harbeck N., 2018. Advances in targeting HER2-positive breast cancer. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 30(1):55-59.

10. Hassett M.J., Li H., Burstein H.J., Punglia R.S., 2020. Neoadjuvant treatment strategies for HER2-positive breast cancer: cost-effectiveness and quality of life outcomes. *Breast Cancer Research and Treatment*, 181:43-51.

11. Hoveizi E., Ebrahimi-Barough S., Tavakol S., Nabiuni M., 2015. In vitro comparative survey of cell adhesion and proliferation of human induced pluripotent stem cells on surfaces of polymeric electrospun nanofibrous and solution-cast film scaffolds. *Journal of biomedical materials research Part A*, 103(9): 2952-2958.

12. Jamalzadeh L., Ghafoori H., Aghamaali M., Sariri R., 2017. Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells by a Semi-Synthetic Derivative of Artemisinin: A Caspase-Related Mechanism. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(3):157-165.

13. Khafagy S.M., el Fatatry L.A., Amer M. S., 1965. Preliminary characterization of santolin, bitter principle of *Achillea santolina* L. growing in Egypt. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2(6):403-410.

14. Kim H., Moon J.Y., Mosaddik A., Cho S.K., 2010. Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9): 2435-2442.

15. Kim M.Y., Bo H.H., Choi E.O., Kwon D.H., Kim H.J., Ahn K.I., Ji S.Y., Jeong

منابع

1. Ahn K.I., Choi E.O., Kwon D.H., HwangBo H., Kim M.Y., Kim H.J., Ji S.Y., Hong S.H., Jeong J.W., Park C., Kim N.D., Kim W.J., Choi Y.H., 2017. Induction of apoptosis by ethanol extract of *Citrus unshiu* Markovich peel in human bladder cancer T24 cells through ROS-mediated inactivation of the PI3K/Akt pathway. *BioScience Trends*, 11(5):565-573.

2. Albayrak S., 2013. The Volatile Compounds and Bioactivity of *Achillea sieheana* Stapf. (Asteraceae). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(1): 37-45.

3. Bayat N., Ebrahimi-Barough S., Ardakan M.M., Ai A., Kamyab A., Babaloo H., Ai J., 2016. Differentiation of Human Endometrial Stem Cells into Schwann Cells in Fibrin Hydrogel as 3D Culture. *Molecular Neurobiology*, 53(10):7170-7176.

4. Bayat N., Izadpanah R., Ebrahimi-Barough S., Norouzi Javidan A., Ai A., Mokhtari Ardakan M.M., Saberi H., Ai J., 2018. The Anti-Angiogenic Effect of Atorvastatin in Glioblastoma Spheroids Tumor Cultured in Fibrin Gel: in 3D in Vitro Model. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(9):2553-2560.

5. Chen Y., Lin J.S., 2017. The application of aptamer in apoptosis. *Biochimie*, 132:1-8.

6. Ebrahimi M., Farajpour M., Rahimmalek M., 2012. Inter- and intra-specific genetic diversity of Iranian yarrow species *Achillea santolina* and *Achillea tenuifolia* based on ISSR and RAPD markers. *The Genetics and Molecular Research*, 11(3):2855-2861.

7. Farmani F., Moein M., Amanzadeh A., Kandelous H.M., Ehsanpour Z., Salimi M., 2016. Antiproliferative Evaluation and Apoptosis Induction in MCF- 7 Cells by *Ziziphus spina christi* Leaf Extracts. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(1):315-321.

- apoptosis in MCF-7 and MDA-MB-231 cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 685:108284.
21. Vitalini S., Madeo M., Tava A., Iriti M., Vallone L., Avato P., Cocuzza C.E., Simonetti P., Argentieri M.P., 2016. Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activities of *Achillea moschata* Wulfen, an Endemic Species from the Alps. *Molecules*, 21(7):830.
22. Wang Z., Ge S., Li S., Lin H., Lin S., 2020. Anti-obesity effect of trans-cinnamic acid on HepG2 cells and HFD-fed mice. *Food and Chemical Toxicology*, 137: 111148.
23. Xing J.Y., Song G.P., Deng J.P., Jiang L.Z., Xiong P., Yang B.J., Liu S.S., 2015. Antitumor Effects and Mechanism of Novel Emodin Rhamnoside Derivatives against Human Cancer Cells In Vitro. *PLoS One*, 10(12): e0144781.
24. Yazdanparast R., Ardestani A., Jamshidi S., 2007. Experimental diabetes treated with *Achillea santolina*: effect on pancreatic oxidative parameters. *Journal of Ethnopharmacology*, 112(1):13-18.
25. Zaringhalam J., Akbari A., Tekieh E., Manaheji H., Rezazadeh S., 2010. *Achillea santolina* reduces serum interleukin-6 level and hyperalgesia during complete Freund's adjuvant-induced inflammation in male Wistar rats. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 8(12):1180-1189.
- J.W., Park S.H., Hong S.H., Kim G.Y., Park C., Kim H.S., Moon S.K., Yun S.J., Kim W.J., Choi Y.H., 2018. Induction of Apoptosis by Citrus unshiu Peel in Human Breast Cancer MCF-7 Cells: Involvement of ROS-Dependent Activation of AMPK. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 41(5):713-721.
16. Liu C., Wu F., Liu Y., Meng C., 2015. Catalpol suppresses proliferation and facilitates apoptosis of MCF-7 breast cancer cells through upregulating microRNA-146a and downregulating matrix metalloproteinase-16 expression. *Molecular Medicine Reports*, 12(5):7609-7614.
17. Mirzapur P., Khazaei M.R., Moradi M.T., Khazaei M., 2018. Apoptosis induction in human breast cancer cell lines by synergic effect of raloxifene and resveratrol through increasing proapoptotic genes. *Life Science*, 205:45-53.
18. Mothana R. A., Lindequist U., Gruenert R., Bednarski P.J., 2009. Studies of the in vitro anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary Medicine*, 9:7.
19. Ros B., Le G., McPake B., Fustukian S., 2018. The commercialization of traditional medicine in modern Cambodia. *Health Policy and Planning*, 33(1):9-16.
20. Si L., Fu J., Liu W., Hayashi T., Mizuno K., Hattori S., Fujisaki H., Onodera S., Ikejima T., 2020. Silibinin-induced mitochondria fission leads to mitophagy, which attenuates silibinin-induced

***Achillea Santolina* Hydroalcoholic Extract Induces Cell Death in Breast Cancer MCF-7 Cells Cultured in Fibrin Gel**

Elham Hoveizi* , Peyman Abdolalinejad

Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Abstract

It is a continuing effort to develop new anticancer compounds. Some studies have reported that some compounds of *Achillea Santolina* have inhibitory effects on several cancer cell lines. The present study aims to evaluate the cytotoxic effect of the hydroalcoholic extract of *Achillea Santolina* on MCF-7 human breast cancer cells in fibrin hydrogel. In this experimental study, to prepare the fibrin hydrogel scaffold, an M199 medium containing 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin, fibrinogen powder with a concentration of 3 mg/ml, and thrombin with a concentration of 120 u/ml was used. Cultured MCF-7 cells in fibrin gel were treated with hydroalcoholic extract of *Achillea Santolina* in 25, 50, 100, 250, 500, and 1000 mg/ml concentrations for 24h. Morphology and cellular viability and proliferation were evaluated by DAPI staining and MTT assay at certain days after treatment. Also, the structure of the scaffold and the condition of the cells in the gel were investigated by photographing with a scanning electron microscope. The results of this study showed the cytotoxic effects of *Achillea Santolina* extract in a dose- and time-dependent manner. The concentration of 500 mg/ml of the extract of *A. Santolina* was determined as an IC₅₀ concentration. Also, cell viability in the control group and treated group with extract at IC₅₀ concentrations showed significant ($P < 0.05$) differences on days 1, 3, and 5. The hydroalcoholic extract of *Achillea Santolina* can inhibit MCF-7 cell proliferation and induce cell death in a dose and time-dependent manner.

Keywords: *Achillea Santolina*, Cell viability, Breast Cancer, Hydrogel Scaffold.

