

بررسی فعالیت ضد تکثیری مشتق نیمه سنتزی آرتسوزینین - آرتسونات - بر روی رده سلول سرطان سینه انسانی MCF-7

لیلا جمالزاده، Ph.D Student، حسین غفوری، *Ph.D، ریحانه سریری، Ph.D.

- دانشگاه گیلان، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، رشت، ایران

* پست الکترونیک نویسنده مسئول: h.ghafoori@guilan.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۱۶

چکیده

هدف: هدف مطالعه حاضر بررسی این است که آیا آرتسونات فعالیت ضد تکثیری خود را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی در رده سلولی سرطان سینه انسانی MCF-7 اعمال می‌کند. تعیین اثر اکسیدانسی آرتسونات می‌تواند مکانیسم احتمالی جایگزین برای سمیت سلولی آن را شرح دهد.

مواد و روش‌ها: به منظور بررسی فعالیت سمیت سلولی آرتسونات، سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) تیمار شده و ۲۴ ساعت بعد مورد سنجش MTT قرار گرفتند. همچنین فعالیت آنزیم‌های سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در سلول‌های تیمار شده با دوزهای انتخابی آرتسونات (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) پس از ۲۴ ساعت سنجیده شد. به علاوه از مایع رویی برای ارزیابی میزان تولید نیتریک اکساید با استفاده از متد گریس استفاده شد.

نتایج: آرتسونات به صورت وابسته به دوز باعث مهار رشد سلول‌های MCF-7 شد و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را به طور معنی‌داری افزایش داد. همچنین آرتسونات تولید نیتریک اکساید را به صورت وابسته به دوز مهار نمود. **نتیجه گیری:** نتایج نشان می‌دهد، آرتسونات اثر سمیت سلولی خود را از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی و نیز با مهار تولید نیتریک اکساید در سلول‌های MCF-7 اعمال می‌نماید. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی در سلول‌های تیمار شده با آرتسونات، احتمالاً سیستم دفاع آنتی اکسیدانسی را تغییر داده و موجب اثر ضد تکثیری شده است.

واژگان کلیدی: آرتسونات، فعالیت ضد تکثیری، آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی، MCF-7

مقدمه

آنتی اکسیدانتهی (با مهار رادیکال‌های آزاد DPPH) و نیز خواص ضد میکروبی می‌باشد.

استفاده از داروی ضد مالاریای آرتمیزینین در تحقیقات سرطان از آنجا آغاز شد که برخی محققین پی بردند شاید آرتمیزینین و مشتقات آن بتوانند همان مسیر تخریبی رادیکال‌های آزاد در انگل مالاریا را در سلول‌های سرطانی نیز ایجاد نمایند. در سال‌های اخیر، موارد بسیاری از فعالیت ضد سرطانی آرتمیزینین، بر علیه بسیاری از انواع سرطان‌ها، هم در شرایط *in vitro* و هم *in vivo* گزارش شده است (۱۷). مشخص شده آرتمیزینین و مشتقات آن، پیشرفت سرطان را در مدل‌های آزمایشگاهی بسیاری از جمله رده‌های سلولی سرطانی، مدل‌های حیوانی و حتی کار آزمایشی‌های بالینی مهار می‌کنند (۱۸). اولین بار دو محقق به نام‌های Lai و Singh (۱۹)، نشان دادند که آرتمیزینین می‌تواند موجب القای آپوپتوزیس در سلول‌های سرطانی شود. انستیتو ملی سرطان آمریکا (NCI) نیز فعالیت ضد سرطانی مشتق آرتمیزینین، آرتسونات را با سنجش اثر مهارکنندگی آن‌ها بر روی رشد ۵۵ نوع رده سلولی، آزمایش نموده و نتایج، حاکی از بیشترین تاثیر آرتسونات بر روی لوسمی و سرطان روده و سپس بر روی سرطان‌های پستان، تخمدان، پروستات و سرطان‌های سیستم عصبی مرکزی مانند گلیوبلاستوما بوده است (۲۰). همچنین نتایج مشابهی با استفاده از مدل‌های حیوانی به دست آمد. به عنوان مثال، تجویز آرتمیزینین به موش‌های مبتلا به سرطان فیبروسارکوما و نیز سرطان سینه موجب کاهش رشد و اندازه سلول‌های توموری شد (۲۱ و ۲۲). در حال حاضر نیز ترکیبات آرتمیزینین در فاز I-II کار آزمایشی‌های بالینی بر روی سرطان‌های پستان، روده و شش می‌باشند. شایان ذکر است که تحقیق در مورد آرتمیزینین و سرطان، هنوز در مراحل بسیار اولیه است (۲۳)، به طوری که هنوز مکانیسم پیام رسانی ضد سرطانی آرتمیزینین، به خوبی مشخص نشده است و نیز مکانیسم فعال شدن آرتمیزینین در سلول‌های سرطانی تاکنون مبهم باقی مانده است (۱۲ و ۲۴). اگرچه به نظر می‌رسد مکانیسم عمل ضد سرطانی این ترکیبات، به واسطه پل اندو پراکسیدی موجود در ساختارشان صورت گیرد که در اثر واکنش با آهن فعال شده و تولید رادیکال‌های آزاد می‌نمایند. رادیکال‌های آزاد نیز موجب تخریب لیزوزوم و تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS: Reactive Oxygen Species) می‌شوند و بالاخره ROS، باعث آزادسازی سیتوکروم C، فعال شدن کاسپازهای ۳ و ۹ و نهایتاً آپوپتوزیس می‌شود (۱۲ و ۲۵). همچنین از آنجاکه اکثر سلول‌های سرطانی، غلظت‌های بالایی از ریسپتورهای ترانسفرینی را در سطح خود بیان کرده و جریان یون آهن در آن‌ها نسبت به سلول‌های طبیعی بیشتر است (۲۶)،

یکی از عمده‌ترین علل مرگ و میر انسان در سراسر جهان، بیماری سرطان می‌باشد و در این میان، سرطان سینه، شایع‌ترین سرطان و نیز علت اصلی مرگ در میان زنان سراسر دنیا می‌باشد (۱). بر اساس گزارشات آماری در سال‌های اخیر، در حدود ۲۴/۴۱ درصد سرطان‌ها در بانوان ایرانی، از نوع سرطان سینه بوده است (۲). علی‌رغم پیشرفت‌های فراوان در علم پزشکی مدرن در قرن گذشته، اغلب سرطان‌ها هنوز قابل درمان نمی‌باشند. این امر تا حدودی ناشی از پیچیدگی پاتوژنز سرطان و مشکلات درمان‌های موثر در حال پیشرفت می‌باشد. از سوی دیگر شیمی درمانی، پرتودرمانی و جراحی، که از روش‌های مرسوم در درمان اغلب سرطان‌ها از جمله سرطان سینه می‌باشند، عوارض جانبی نامطلوبی دارند (۳). همچنین اگرچه بسیاری از سرطان‌ها در ابتدا به شیمی درمانی پاسخ می‌دهند، اما اغلب پس از مدتی به آن مقاوم می‌شوند (۴). لذا تلاش برای کشف درمان‌های جدید، همواره ادامه دارد. امروزه داروهای گیاهی به علت عدم عوارض جانبی نسبت به داروهای شیمیایی مورد توجه قرار گرفته اند و اثرات درمانی محصولات طبیعی فراوانی علیه انواع سرطان‌ها، به اثبات رسیده است (۵). متابولیت‌های ثانویه گیاهی، همواره منبع مطلوبی از ترکیبات جدید برای درمان سرطان بوده (۶) و ترپن‌ها، متنوع‌ترین و فراوان‌ترین خانواده از متابولیت‌های ثانویه هستند که طیف وسیعی نیز دارای فعالیت‌های دارویی علیه بیماری‌های انسانی می‌باشند (۷). سزکوئی ترپن‌ها (با سه واحد ترپنی) از ترکیباتی هستند که مقدار قابل توجهی از آن‌ها در گونه‌های گیاهی خانواده آرتمیزینیا وجود دارد (۸ و ۹). از جمله این ترکیبات، آرتمیزینین، یک پراکسید سزکوئی ترپن لاکتون موجود در گیاه دارویی چینی به نام آرتمیزینیا آنوا است (۱۰) که در سال ۱۹۷۲ به صورت خالص از اندام هوایی این گیاه، استخراج و ساختار آن در سال ۱۹۷۵ تعیین شد (۱۱). در حال حاضر، انواع مشتقات نیمه سنتزی آرتمیزینین برای افزایش جذب، پایداری و کاهش سمیت، توسعه یافته اند که در این میان، آرتسونات، به دلیل حلالیت و فعالیت بالا، از توانمندترین این مشتقات می‌باشد (۱۲). آرتمیزینین و مشتقات آن، داروی ضد مالاریای طبیعی و بالقوه هستند که نسبتاً ارزان بوده (۱۳) و نیز مشخص شده علاوه بر فعالیت ضد مالاریایی، فعالیت‌های آنتی اکسیدانتهی، ضد میکروبی (ضد باکتریایی، ضد ویروسی، ضد قارچی) و ضد توموری (ضد التهابی، ضد رگ‌زایی و ضد تکثیری و القای آپوپتوزی) نیز نشان می‌دهند (۱۲، ۱۴ و ۱۵) در تازه‌ترین گزارش، Kim و همکارانش (۱۶) نشان دادند که آرتمیزینین دارای خواص ضد التهابی (با مهار تولید نیتریک اکساید)، خواص

اکسیدانت‌ها در مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌باشد (۳۸). از آنجایی که مشخص شده آرتمیزینین و مشتقات آن دارای فعالیت آنتی اکسیدانتی می‌باشند، بنابراین می‌توانند به‌طور بالقوه اثرات ضد تکثیری نشان دهند (۱۲ و ۱۶). برخی مطالعات نیز حاکی از اثر سمیت سلولی این ترکیبات از طریق تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و افزایش استرس اکسیداتیو می‌باشند. نیتریک اکساید (NO) یکی از انواع رادیکال آزاد می‌باشد (۲۸) که تولید بیش از حد آن در اثر فعالیت آنزیم نیتریک اکساید سنتاز (*iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase*)، در برخی شرایط پاتوفیزیولوژیکی از جمله سرطان، التهاب، دیابت و غیره نقش دارد (۳۹ و ۴۰). به‌علاوه، نقش نیتریک اکساید در تومورزایی بر اساس مطالعاتی که نشان می‌دهند حضور نیتریک اکساید و نیتریک اکساید سنتاز، در سلول‌های سرطانی نسبت به سلول‌های طبیعی، بیشتر است ثابت شده و بدین ترتیب به‌نظر می‌رسد که ارزش تشخیصی در تحقیقات سرطان داشته باشند (۴۱ و ۴۲). یافته‌های حاصل از بررسی‌های بالینی بر روی برخی انواع توموری نشان می‌دهند که نیتریک اکساید و نیتریک اکساید سنتاز، نه تنها در پیش‌گیری بلکه در گزینه‌های درمانی جدید نیز ارزشمند می‌باشند (۴۳-۴۵). گزارش‌های مختلفی نشان می‌دهند که آرتمیزینین و مشتقات آن، نیتریک اکساید را کاهش می‌دهند و مطالعات بسیاری نقش سمیت سلولی آرتسونات را از طریق مهار تولید نیتریک اکساید با جزئیات به اثبات رسانیده‌اند (۴۶-۴۹). این واقعیت که آرتسونات، تولید نیتریک اکساید ناشی از نیتریک اکساید سنتاز را مهار می‌نماید، نشان می‌دهد که نیتریک اکساید ممکن است در عملکرد سمیت سلولی آن نقش داشته باشد. ارتباط بین نیتریک اکساید و سمیت سلولی، ویژه آرتسونات نیست و پیش‌تر برای داروهای ضدسرطانی معتبر، گزارش شده است (۴۶).

اگرچه مطالعات فراوانی حاکی از اثر سمیت سلولی آرتمیزینین و مشتقات آن از طریق تولید استرس اکسیداتیو می‌باشند، اما مطالعاتی که پروفایل آنتی اکسیدانتی آن را در رده سلولی سرطان سینه نشان دهند، بسیار محدودند. لذا در این مطالعه اثر سمیت سلولی و ضد تکثیری آرتسونات، موثرترین مشتق آرتمیزینین، بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 بررسی شد و نیز برای بررسی مکانیسم فعالیت ضد تکثیری آن، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و نیز میزان مهار تولید نیتریک اکساید پس از تیمار با این ترکیب سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و دستگاه‌ها: محیط کشت DMEM/Ham's F12

لذا آرتمیزینین به‌طور اختصاصی بر روی این سلول‌ها اثر نموده و بدین ترتیب، اثرات سمی آرتمیزینین و مشتقات آن خاص سلول‌های سرطانی می‌باشد (۱۷ و ۲۷). داروهای ضد سرطانی کنونی، اکثراً با سمیت و مقاومت دارویی همراه هستند، لذا از چالش‌های عمده در درمان سرطان، توسعه داروهای موثرتری است که برای انواع سرطان‌ها اختصاصی بوده، ولی حداقل اثرات جانبی را بر روی سلول‌های طبیعی پستانداران داشته باشند. آرتمیزینین از داروهای بسیار نادری است که بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی یا مقاومت بالینی در درمان مالاریا استفاده می‌شود و از همه مهم‌تر اینکه اثر سمیت سلولی آن بر روی سلول سرطانی، اختصاصی است (۱۲، ۲۷). طبق تحقیقات پیشین به‌نظر می‌رسد مکانیسمی که آرتسونات به‌واسطه آن اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌ها اعمال می‌کند، از طریق تولید استرس اکسیداتیو باشد (۲۸ و ۲۹). در میان فاکتورهای بی‌شمار، استرس اکسیداتیو که در اثر برهم خوردن تعادل بین سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی بدن و تشکیل رادیکال‌های آزاد روی می‌دهد، نقش مهمی در شروع، ایجاد و پیشرفت سرطان دارد (۳۰). از آنجایی که آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، نقش کلیدی در حفاظت سلول‌ها در برابر استرس اکسیداتیو ایفا می‌کنند، اختلال در تنظیم فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، همچون سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز باعث سرطان می‌شود (۳۱). سوپراکسید دیسموتاز، دسته‌ای از آنزیم‌هاست که دیسموتاسیون رادیکال سوپراکسید را به پراکسید هیدروژن و مولکول اکسیژن کاتالیز می‌کند. سپس برخی دیگر از آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی از جمله پراکسیداز، پراکسید هیدروژن را به آب تبدیل می‌کنند (۳۲). این واکنش‌های پشت سر هم، کاهش استرس اکسیداتیو ناشی از ROS را تضمین می‌کنند (۳۳). همچنین مشخص شده کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی یا تنظیم کاهشی بیان آن‌ها، در انواع سرطان‌ها از جمله سرطان پروستات، سرطان سینه، مثانه، کبد و غیره نقش دارد (۳۴-۳۶). البته عدم تغییر و یا حتی بیان بیشتر فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در برخی سرطان‌ها نیز گزارش شده است (۳۷). بنابراین احتمالاً حفظ سطوح کافی از فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، برای ممانعت از پیشرفت سرطان ضروری می‌باشد. لذا هدف قرار دادن فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، می‌تواند راهکار مهمی برای توسعه عوامل درمانی در درمان سرطان باشد. به‌علاوه، مطالعه اثرات داروهای ضدسرطانی بر روی فعالیت و بیان آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی، درک مکانیسم عملکرد دارو را افزایش می‌دهد (۳۳). از سوی دیگر، تحقیقات نشان داده که بین فعالیت آنتی اکسیدانتی گیاهان و اثرات ضد تکثیری آن‌ها ارتباط مستقیمی وجود دارد. این امر حاکی از عملکرد بالقوه آنتی

میلی گرم بر میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت چهار ساعت در انکوباتور قرار داده شد. سپس محتویات کشت با احتیاط دور ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO)، به منظور حل کردن کریستال‌های نامحلول فورمازان به هر چاهک افزوده گردید. در نهایت پس از ۱۰ دقیقه، جذب نوری محلول، در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه ثبت الایزا خوانده شده و درصد زیستایی سلولی با استفاده از فرمول زیر به دست آمد. لازم به ذکر است هر غلظت از ترکیب در سه چاهک تکرار شده و از سوی دیگر آزمایش، در سه تکرار مجزا صورت گرفت.

درصد زیستایی سلولی = (جذب نوری نمونه تقسیم بر جذب نوری کنترل) × ۱۰۰: درصد زیستایی برای تعیین مقادیر IC₅₀ (غلظت ۵۰ درصد کشنده سلولی - Inhibitory Concentration) به کار می‌رود که عبارتست از غلظت یک ترکیب که باعث مهار ۵۰ درصدی رشد سلول‌های تیمار شده در مقایسه با کنترل می‌شود.

سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی: برای بررسی اثر ترکیب آرتسونات بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز در سلول‌های MCF-7 ابتدا عصاره سلولی تهیه شد. بدین منظور سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۰ میکروگرم بر میلی لیتر) به مدت ۲۴ ساعت تیمار و سپس با استفاده از اسکرابر جدا شدند. پس از سانتریفیوژ به مدت ۷ دقیقه و دور ۱۳۰۰ RPM، رسوب سلولی، دو بار با PBS (Phosphate Buffered Saline) سرد شستشو داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیزکننده به رسوب سلول‌ها اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و دور ۱۰۰۰۰ RPM، سوپرناتانت حاصل، جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین و نیز سنجش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی، مورد استفاده قرار گرفت. اندازه‌گیری پروتئین کل نمونه‌ها با استفاده از روش برادفورد (۵۱) انجام شد. بدین منظور، ۵ میکرولیتر از نمونه با آب مقطر به حجم ۵۰ میکرولیتر رسانده و ۲/۵ میلی لیتر از محلول برادفورد به آن اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. سپس جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و غلظت پروتئین نمونه‌ها از روی منحنی استاندارد پروتئین، با در نظر گرفتن ضریب رقت نمونه و با استفاده از محلول یک میلی گرم در میلی لیتر آلبومین سرم گاوی (BSA: Bovine Serum Albumin) محاسبه شد.

a) **تعیین فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز**

(*SOD: superoxide dismutase*) سنجش فعالیت آنزیم

و سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) از شرکت Gibco (انگلستان) و محلول پنی‌سیلین/ استرپتومایسین از شرکت Biobasic (کانادا)، خریداری شد. پودرهای MTT (3-(4,5dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide، تریپسین/EDTA، آرتسونات و معرف Griess نیز از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شدند. سایر مواد شیمیایی و محلول‌ها همگی از شرکت Merck (آلمان) خریداری شدند. همچنین از دستگاه ثبت الایزا ساخت شرکت BioTek (آمریکا) و دستگاه اسپکتروفوتومتر ساخت شرکت Ultrospec 3000 (کانادا) مدل Pharmacia biotech استفاده شد.

روش‌ها

کشت سلول: رده سلولی MCF-7 پس از خریداری از مرکز ذخایر ژنتیکی ایران (IBRC)، در این مطالعه استفاده شد. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/Ham's F12 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد آنتی بیوتیک (پنی-سیلین/ استرپتومایسین) کشت داده شده و در فلاسک ۲۵ سانتی متر مکعب در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂، نگهداری شدند. سلول‌ها پس از رسیدن به تراکم ۸۰ تا ۹۰ درصد، به کمک محلول تریپسین/EDTA (۰/۲۵) درصد تریپسین و ۰/۰۵ درصد EDTA) از کف سلول‌ها برداشت شده و پس از حداقل ۵ مرتبه پاساژ و رسیدن سلول‌ها به فاز رشدی، برای انجام تست‌ها استفاده شدند.

سنجش سمیت سلولی: تست MTT اثر مهار رشدی آرتسونات بر روی سلول‌های MCF-7، با استفاده از تست MTT سنجش شد (۵۰). این تست، یک روش رنگ سنجی کمی است که اساس آن بر پایه احیای آنزیمی محلول زرد رنگ MTT به وسیله آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی و تشکیل کریستال ارغوانی رنگ و نامحلول در آب فورمازان می‌باشد که تنها در سلول‌های زنده روی می‌دهد. میزان جذب نوری بلورهای فورمازان پس از حل شدن در حلال‌های آلی همچون دی متیل سولفوکساید (*DMSO: Dimethyl sulfoxide*)، به کمک دستگاه ثبت الایزا قابل سنجش است و بیانگر میزان سلول‌های زنده می‌باشد. بدین منظور سلول‌های MCF-7، در تراکم ۱۰^۴×۱۰ سلول در هر چاهک، در پلیت ۹۶ خانه و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. پس از ۲۴ ساعت انکوبه شدن و رسیدن به تراکم مطلوب، سوپرناتانت با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) که در حلال استون حل شدند، تعویض و همراه با محیط کشت کامل به چاهک‌ها اضافه گردید. غلظت نهایی حلال استون در چاهک‌ها کمتر از ۰/۱ درصد محاسبه شد. پس از ۲۴ ساعت تیمار، ۱۰ میکرولیتر محلول MTT (۵)

آمینوآنتی پیرین در دمای اتاق به مدت ۲ دقیقه در یک میلی لیتر محلول واکنش متشکل از ۴۷۰ میکرو لیتر ۴- آمینوآنتی پیرین ۲ میلی مولار و ۴۷۰ میکرو لیتر پراکسید هیدروژن ۱ میلی مولار و ۶۰ میکرو لیتر سوپرناتانت آنزیمی مورد سنجش قرار گرفت و بر علیه سل بلانک که حاوی تمام مواد به جز نمونه آنزیمی بود، خوانده شد. فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD) با دنبال کردن تغییرات جذب در دقیقه (A/min) که در نتیجه اکسیداسیون ۴- آمینو آنتی پیرین می باشد، در طول موج ۵۱۰ نانومتر ثبت شد. همچنین برای محاسبه فعالیت آنزیمی از ضریب خاموشی (1-1cm-6mM/26) استفاده شد. هر واحد از فعالیت آنزیم پراکسیداز عبارت است از مقداری از آنزیم که باعث افزایش جذب ۰/۰۱ در دقیقه در طول موج ۵۱۰ نانومتر تحت شرایط سنجش می شود.

اندازه گیری میزان نیتریک اکساید (NO): غلظت نیتریک به عنوان شاخصی از تولید نیتریک اکساید با روش گریس (Griess) اندازه گیری می شود. در این روش، معرف گریس (۱ درصد سولفانیل آمید، ۰/۱ درصد نفتیل اتیلن آمید دهیدروکلراید در ۲/۵ درصد فسفریک اسید) برای سنجش غلظت نیتریک به نمونه اضافه می شود (۵۵)؛ بدین منظور سلول های MCF-7 پس از ۲۴ ساعت تیمار با غلظت های مختلف آرتسونات (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر)، از انکوباتور خارج شده و سوپرناتانت محیط کشت از پلیت های کشت به ویال های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شد و پس از سانتریفیوژ به مدت ۷ دقیقه و دور ۱۳۰۰ RPM، حدود ۱۰۰ میکرو لیتر از هر نمونه به یک چاهک از پلیت ۹۶ تایی انتقال یافت. سپس حدود ۱۰۰ میکرو لیتر معرف Griess به هر چاهک اضافه شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی قرار داده شد. رنگ ارغوانی تولید شده نسبت مستقیم با میزان تولید NO دارد. میزان جذب این رنگ توسط دستگاه ثبت الایزا و در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. هرچه غلظت نیتریک در نمونه بیشتر باشد، میزان جذب در این طول موج بیشتر خواهد بود. به این ترتیب می توان با روش گریس کاهش یا افزایش نیتریک اکساید را در نمونه ها با کنترل مقایسه نمود. همچنین برای سنجش میزان NO آزاد شده توسط نمونه های تیمار شده، از منحنی استاندارد NO استفاده شد. بدین منظور از نیتریک سدیم (NaNO₂) جهت تهیه غلظت های نیتریک استفاده شد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده ها و رسم نمودارها با استفاده از نرم

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) طبق روش Beauchamp و Fridovich (۵۲) و با کمی تغییرات به کمک دستگاه ثبت الایزا انجام شد. به منظور سنجش فعالیت آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز (SOD)، یک میلی لیتر محلول واکنش شامل بافر فسفات ۵۰ میلی مولار با pH = ۷، EDTA ۰/۱ میلی مولار، متیونین ۱۳ میلی مولار، نیترو بلوتترازولیوم (NBT: Nitro Blue Tetrazolium) ۷۵ میکرومولار، ریبوفلاوین ۰/۲۱ میلی مولار و نیز سوپرناتانت آنزیمی، تهیه و به هر چاهک از یک پلیت ۲۴ خانه منتقل شد. همچنین به منظور مقایسه فعالیت آنزیم SOD در نمونه ها با کنترل، علاوه بر چاهک های نمونه و بلانک از چاهک کنترل نیز استفاده شد که محتوای واکنشی چاهک بلانک و کنترل مشابه چاهک نمونه بوده، با این تفاوت که دو چاهک مذکور فاقد آنزیم می باشند. لازم به ذکر است که محتوای واکنشی چاهک کنترل به همراه نمونه ها در معرض نور قرار گرفت، در حالی که محتوای واکنشی بلانک در تاریکی قرار داده شد. سپس پلیت مذکور به مدت ۵ دقیقه، بر روی یک شیکر و در معرض دو عدد لامپ فلوروسنت (۲۰ وات) قرار داده شد و پس از افزوده شدن محتوی ویال حاوی بلانک به یکی از چاهک های پلیت، جذب نمونه ها با دستگاه ثبت الایزا در طول موج ۵۶۰ نانومتر خوانده شد. این روش بر اساس تبدیل نیترو بلو تترازولیوم به فورمازان در حضور نور و ظهور رنگ می باشد. در صورتی که در محیط واکنش، آنزیم سوپر اکسید دیسموتاز موجود باشد، از انجام این واکنش ممانعت نموده و میزان تشکیل ماده رنگی و در نتیجه ظهور رنگ را کاهش می دهد. در واقع اختلاف جذب نمونه های دارای عصاره آنزیمی و کنترل (فاقد آنزیم)، نشان دهنده ممانعت واکنش تشکیل ماده رنگین فورمازان توسط SOD می باشد. با استفاده از این اختلاف جذب، واحد آنزیمی نمونه ها محاسبه و فعالیت آنزیمی بر حسب واحد آنزیم در هر میلی گرم پروتئین عصاره (محاسبه شده از روش برادفورد) بیان شد. طبق تعریف، یک واحد فعالیت SOD، مقدار فعالیت آنزیمی است که باعث ۵۰ درصد ممانعت از احیای فتوشیمیایی نیترو بلو تترازولیوم به فورمازان تحت شرایط سنجش می شود.

(b) **سنجش فعالیت آنزیم پراکسیداز (POD):**

peroxidase برای اندازه گیری فعالیت آنزیم پراکسیداز از سوسترای ۴-آمینوآنتی پیرین در حضور پراکسید هیدروژن با روش اسپکتوفتومتری استفاده شد (۵۳ و ۵۴). اکسیداسیون ۴-

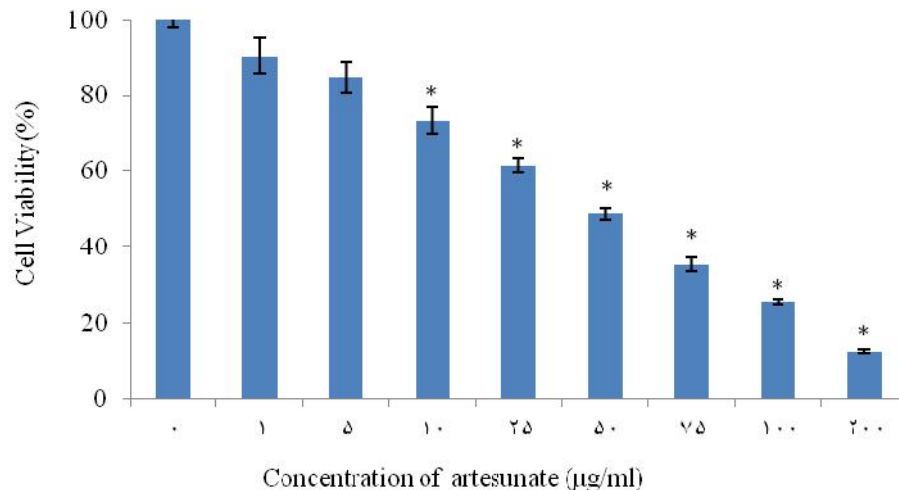
نشان داده شده، تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت، باعث مهار معنی‌دار رشد سلول‌ها به صورت وابسته به دوز در مقایسه با گروه کنترل شد ($p < 0.05$) بدین ترتیب با افزایش غلظت آرتسونات، درصد زیستایی به‌طور معناداری کاهش یافت. همچنین مقادیر IC_{50} آرتسونات پس از ۲۴ ساعت $1/73 \pm 43/78$ میکروگرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. بدین ترتیب نتایج ما نشان داد که آرتسونات رشد و تکثیر سلول‌های MCF-7 را به صورت وابسته به دوز مهار نمود.

افزارهای SPSS و Excel انجام شد. پس از انجام تست نرمالیت (Kolmogorov-Smirnov = K.S) از روش آماری آنالیز واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و Post Hoc (تست Dunnett برای مقایسه گروه‌ها با کنترل استفاده شد. همچنین ($p < 0.05$) معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمامی آزمایش‌ها با حداقل سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار بیان شدند.

نتایج

آرتسونات به صورت وابسته به دوز باعث مهار رشد سلول‌های سرطان سینه شد.

بررسی سمیت سلولی آرتسونات بر روی رده سلولی MCF-7، با استفاده از تست MTT انجام شد. همان‌طور که در نمودار ۱



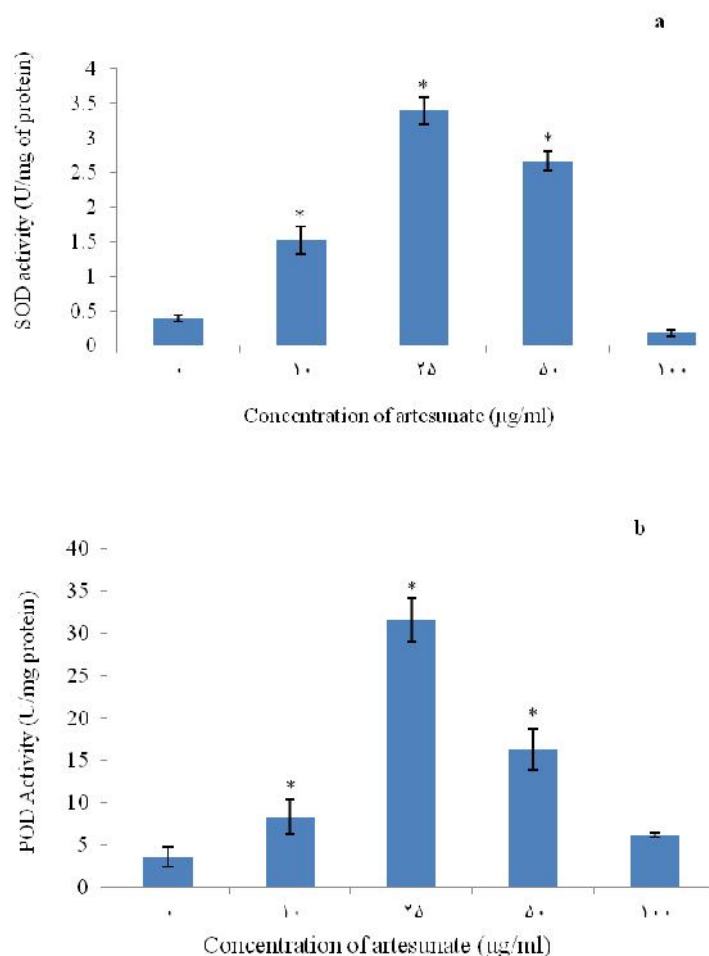
نمودار ۱: فعالیت ضد تکثیری آرتسونات بر روی سلول‌های MCF-7 پس از ۲۴ تیمار سلول‌ها با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) درصد زیستایی سلول‌ها با استفاده از تست MTT انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار سه آزمایش مستقل با حداقل سه تکرار بیان شده اند. $p < 0.05$ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانسی سوپراکسید دیسموتاز

و پراکسیداز در سلول‌های سرطان سینه پس از تیمار با آرتسونات افزایش یافت.

(a) فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز: سنجش فعالیت آنزیمی عصاره‌های سلولی استخراج شده از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظت‌های مختلف آرتسونات نشان داد که فعالیت آنزیم سوپراکسید دیسموتاز در غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل، به‌طور

میزان پروتئین کل در سلول‌های سرطان سینه پس از تیمار با آرتسونات به صورت وابسته به دوز کاهش یافت. نتایج حاصل از تست سنجش پروتئین برادفورد نشان داد که غلظت پروتئین در عصاره سلولی استخراج شده، پس از تیمار با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به صورت وابسته به دوز کاهش یافت (نمودار ۲). همچنین برای تعیین غلظت پروتئین از منحنی استاندارد استفاده شد (نمودار ۳).

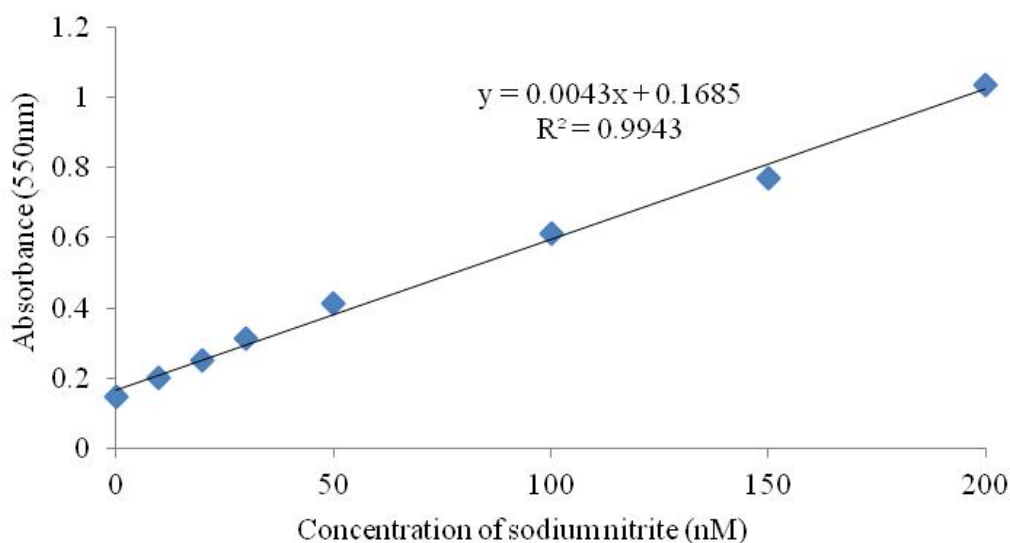


نمودار ۴: اثر آرتسونات بر روی فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی. پس از ۲۴ تیمار سلول‌های MCF-7 با غلظت‌های مختلف انتخابی آرتسونات (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، فعالیت آنزیم‌های (a) سوپراکسید دیسموتاز و (b) پراکسیداز سنجش شد. هر تست با حداقل سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین واحد آنزیمی در هر میلی‌گرم پروتئین \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. * $p < 0.05$ ، نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

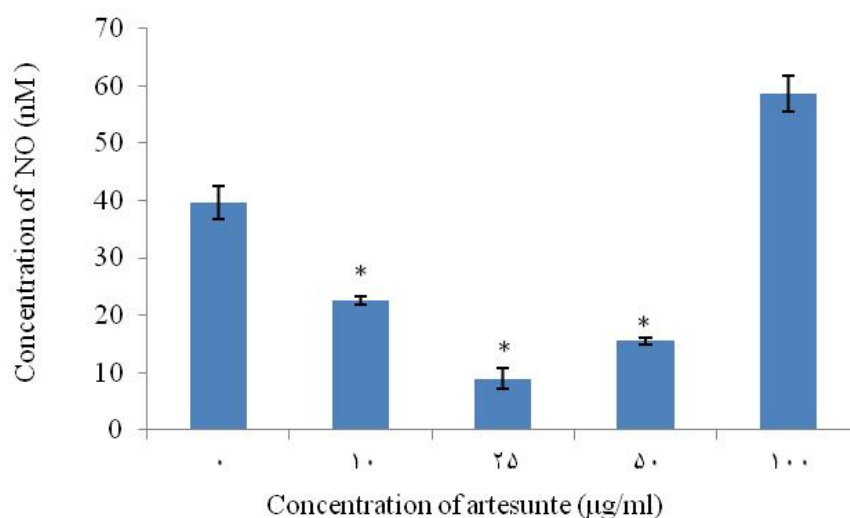
مهار نمود. غلظت نیتریک اکساید (NO) با استفاده از متد گریس و با کمک منحنی استاندارد NO، محاسبه شد (نمودار ۵). اثر غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی سلول‌های MCF-7 به مدت ۲۴ ساعت، کاهش وابسته به دوز در تولید نیتریک اکساید (NO) را نشان داد (نمودار ۶). به طوری که میزان نیتریک اکساید (NO) از $2/91 \pm 39/65$ نانو مولار در گروه کنترل به $1/76 \pm 8/95$ نانو مولار در غلظت ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کاهش یافت ($p < 0.05$). به عبارت دیگر با توجه به این نتایج می‌توان دریافت که آرتسونات موجب مهار معنی‌دار تولید نیتریک اکساید در سلول‌های MCF-7 شد.

(b) فعالیت آنزیم پراکسیداز: نتایج نشان داد که آرتسونات فعالیت آنزیم پراکسیداز را در غلظت‌های ۱۰، ۲۵ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در مقایسه با گروه کنترل، به طور معنی‌داری افزایش داد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در غلظت موثر ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، $2/53 \pm 31/61$ U/mg محاسبه شد که در مقایسه با گروه کنترل ($1/21 \pm 3/59$ U/mg) افزایش قابل توجهی نشان می‌دهد. همچنین غلظت‌های ۱۰ و ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با مقادیر $2/43$ U/mg و $1/26 \pm 8/31 \pm 1/98$ U/mg بیشترین فعالیت آنزیم پراکسیداز را بعد از دوز ۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (نمودار ۴b).

آرتسونات تولید نیتریک اکساید را در سلول‌های سرطانی



نمودار ۵: منحنی استاندارد نیتریک اکساید (NO) که با استفاده از غلظت‌های مختلف نیتريت سدیم (۰، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانو مولار) رسم شد.



نمودار ۶: اثر آرتسونات بر مهار تولید نیتریک اکساید در سلول‌های MCF-7. میزان مهار تولید نیتریک اکساید (NO) در سوپرناتانت حاصل از سلول‌های MCF-7 تیمار شده با غلظت‌های مختلف آرتسونات (۰، ۱۰، ۲۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی‌لیتر) به مدت ۲۴ ساعت که با استفاده از متد گریس و به کمک منحنی استاندارد نیتریک اکساید (NO) محاسبه شد. هر تست با حداقل سه تکرار انجام و داده‌ها به صورت میانگین تولید نیتريت سدیم بر حسب نانومولار \pm انحراف معیار بیان شده‌اند. * $p < 0.05$ نشان دهنده تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل می‌باشد.

سلولی سرطان سینه انسانی MCF-7 بررسی شد. بر طبق یافته‌های حاصل، آرتسونات اثر مهار رشدی معناداری بر روی این سلول‌ها نشان داد و نیز فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانتی عمده شامل سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز را که میزان فعالیت آن‌ها در سرطان‌های مختلف تغییر می‌یابد، افزایش داد. به نظر می‌رسد کاهش بیان و یا کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی

بحث

در این تحقیق فعالیت ضد تکثیر یکی از موثرترین مشتقات نیمه سنتزی ترکیب گیاهی آرتمیزینین، آرتسونات، بر روی رده

میزان پروتئین در عصاره سلولی استخراج شده، با افزایش غلظت آرتسونات کاهش یافت. از آنجاکه آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، سوپراکسید را به آب و H_2O_2 تبدیل می‌کند، درحالی‌که پراکسیداز، با تبدیل H_2O_2 به آب از صدمه ناشی از استرس اکسیداتیو ممانعت می‌کند. لذا تجمع H_2O_2 موجب صدمه پروتئین می‌شود. H_2O_2 نه تنها نوعی ROS می‌باشد، بلکه یک مولکول پیام رسان مهم نیز محسوب می‌شود (۶۰). از سوی دیگر به نظر می‌رسد مکانیسم عمل آرتمیزینین به دلیل عملکردهای متنوع آن مسیره‌های پیام رسانی متعددی را شامل شود (۴۶). به‌عنوان مثال طبق گزارش‌ها فراوان یکی از مکانیسم‌های عمده عمل آرتمیزینین از طریق تولید ROS می‌باشد (۱۲). لذا کاهش میزان پروتئین که بعد از تیمار با آرتسونات روی داده، احتمالاً ناشی از افزایش ROS می‌باشد که باعث صدمه اکسیداتیو پروتئین و نهایتاً کاهش میزان آن شده است. ترکیبات ضد سرطانی که فعالیت آنتی اکسیداتیو دارند، ممکن است اثرات سودمند خود را به‌واسطه متعادل ساختن سطوح ROS اعمال نمایند، به طوری‌که نه تنها از تکثیر سلول‌های سرطانی ممانعت نمایند، بلکه امکان وقوع آپوپتوزیس را نیز فراهم کنند (۶۱). در مطالعه‌ای مشابه با تحقیق حاضر مشخص شد که مشتق نیمه سنتزی یک آلکالوئید ضد سرطانی از طریق تولید ROS و افزایش استرس اکسیداتیو، اثر سمیت سلولی بر روی رده سلولی سرطان سینه MCF-7 اعمال می‌نماید. همچنین در این مطالعه فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو از جمله سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز پس از تیمار با این ترکیب افزایش یافت. آن‌ها فرض کردند این افزایش در فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو می‌تواند به‌عنوان پاسخی برای افزایش استرس اکسیداتیو در سلول‌های تیمار شده باشد (۶۲). بدین ترتیب می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که آرتسونات احتمالاً با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو، موجب مهار رشد و نیز مرگ سلول‌های سرطان سینه شده و بدین ترتیب اثر سمیت سلولی و ضد سرطانی خود را اعمال نموده است.

از سوی دیگر بر اساس یافته‌های این مطالعه، آرتسونات موجب مهار وابسته به دوز نیتریک اکساید در سلول‌های MCF-7 شد. این یافته با مطالعات مشابه بسیاری که اثر آرتمیزینین و مشتقات آن را بر روی مهار تولید نیتریک اکساید سنجیده اند، کاملاً موافق می‌باشد. از جمله در مطالعه مشابهی، تولید نیتریک اکساید در سلول‌های سرطان سینه MCF-7 در پاسخ به غلظت‌های مختلف نوعی عصاره گیاهی به‌صورت وابسته به دوز و زمان به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و مهار تکثیر سلول‌ها به‌واسطه این کاهش توجیه شد (۶۳). همچنین مشخص شده آرتمیزینین تولید نیتریک اکساید را در رده سلولی ماکروفاژ

اکسیداتیو تا حدودی مسئول سرطان‌زایی می‌باشد (۳۴-۳۶). در نتیجه تنظیم بالای بیان آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو یا افزایش فعالیت آن‌ها به‌عنوان یک راه‌کار موثر برای پیشگیری و یا درمان سرطان مطرح شده است. به‌عنوان مثال بیان بیش از حد آنزیم سوپراکسید دیسموتاز، باعث مهار رشد انواع سلول‌های سرطان سینه شد (۵۶). همچنین تحقیقات بسیاری حاکی از تاثیر محصولات گیاهی در مهار سلول‌های سرطانی به‌واسطه افزایش بیان یا فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو می‌باشند. به‌عنوان مثال نوعی ایزوفلاونوئید ضد سرطان، با افزایش بیان آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو در رده سلولی سرطان پروستات باعث مهار موثر این سلول‌ها شد (۵۷) و در مطالعه‌ای دیگر، نوعی عصاره گیاهی با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز و در نتیجه تغییر سیستم دفاع آنتی اکسیداتیو باعث مهار رشد سلول‌های سرطان سینه MCF-7 شد (۵۸). آرتمیزینین، یک سزکوئی‌ترین لاکتون موجود در گیاهی دارویی به‌نام آرتمیزیا آنوا می‌باشد که امروزه انواع مشتقات نیمه سنتزی آن از جمله آرتسونات به‌عنوان داروی ضد مالاریا به‌کار می‌روند. همچنین مشخص شده این ترکیبات علاوه بر فعالیت ضد مالاریایی، فعالیت‌های ضد تکثیری و ضد سرطانی نیز نشان می‌دهند. در مطالعه‌ای که توسط Zhang و همکاران (۲۸) در سال ۲۰۱۰ صورت گرفت مشخص شد که آرتمیزینین و مشتقات آن، سطوح پروتئینی آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو همچون سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را افزایش دادند که این یافته با ارتباط مقادیر غلظت‌های مهارتی (IC50) این ترکیبات با بیان mRNA ژن‌های دخیل در پاسخ استرس اکسیداتیو، موافق است. همچنین به‌نظر می‌رسد عملکرد آرتمیزینین با بیان آنزیم‌های استرس اکسیداتیو از جمله سوپراکسید دیسموتاز تعدیل شد (۵۹). با این وجود اگرچه فعالیت آنتی اکسیداتیو آرتمیزینین ثابت شده (۱۶) و نیز اثر آن بر روی بیان آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو مختلف بررسی شده (۲۸)، اما برای اثبات فعالیت آنتی اکسیداتیو آن تاکنون مطالعه‌ای صورت نگرفته تا میزان فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو عمده را پس از تیمار با آرتمیزینین یا مشتقات آن از جمله آرتسونات در سلول سرطان سینه مورد سنجش قرار دهد. لذا در این تحقیق به‌منظور بررسی مکانیسم مهار رشدی آرتسونات، فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو در سلول سرطانی سینه مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج تحقیق ما نشان داد که آرتسونات فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیداتیو سوپراکسید دیسموتاز و پراکسیداز را در سلول سرطان سینه MCF-7 به‌طور معنی‌داری افزایش داد. اگرچه در این مطالعه دوز موثر آرتسونات (غلظت پایین‌تر از IC50) بیشترین اثر افزایشی را نشان داد. همچنین

2. Taghavi A, Fazeli Z, Vahedi M, Baghestani AR, et al. Increased trend of breast cancer mortality in Iran. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(1): 367-70.
3. Edward Chu, Alan C Sartorelli. *Cancer chemotherapy*. Katzung BG, Masters SB, Trevor AJ. *Basic & clinical pharmacology*. 9th edn. New York: MC Grow Hill; 2004; 898-9330.
4. Mika A. Sovak and David R. Spriggs. *Cancer chemotherapy: Clinical evidence for drug resistance*. Teicher BA. *Cancer drug resistance*. New Jersey: Humana Press. 2006; 543-558.
5. Mann J. *Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future*. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(2): 143-8.
6. Nobili S, Lippi D, Witort E, Donnini M, et al. *Natural compounds for cancer treatment and prevention*. *Pharmacological Research*. 2009; 59(6): 365-78.
7. Paduch R, Kandefers-Szersze M, Trytek M, Fiedurek J. *Terpenes: substances useful in human healthcare*. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2007; 55(5): 315-27.
8. Zhang S, Won Y-K, Ong C-N, Shen H-M. *Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms*. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. 2005; 5(3): 239-49.
9. Ghantous A, Gali-Muhtasib H, Vuorela H, Saliba NA, et al. *What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? Drug discovery today*. 2010; 15(15): 668-78.
10. Tan W, Lu J, Huang M, Li Y, et al. *Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs*. *Chin Med*. 2011; 6(1): 27.
11. Liao F. *Discovery of artemisinin (Qinghaosu)*. *Molecules*. 2009; 14(12): 5362-6.
12. Crespo-Ortiz MP, Wei MQ. *Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug*. *BioMed Research International*. 2012; 2012(247597): 1-18.
13. Klayman DL. *Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China*. *Science*. 1985; 228(4703): 1049-55.
14. Efferth T. *Willmar Schwabe Award 2006: antiplasmodial and antitumor activity of artemisinin-from bench to bedside*. *Planta medica*. 2007; 73(4): 299-309.
15. Ferreira JF, 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(5): 3135-70.

موشی RAW.264.7 (۴۶) و نیز فعال شدن فاکتور رونویسی NF- κ B (Nuclear Factor kappaB) و در نتیجه نیتریک اکساید سنتاز را در رده سلولی آستروسیتوما (T67) مهار می‌کند (۴۷). نهایتاً تمامی این یافته‌ها با نتایج حاصل از مطالعه ای که حاکی از مکانیسم عمل ضد مالاریایی آرتمیزینین از طریق مهار تولید نیتریک اکساید می‌باشد، موافق می‌باشند (۴۹). بدین ترتیب به نظر می‌رسد در این تحقیق نیز سمیت سلولی آرتسونات بر روی سلول‌های سرطان سینه MCF-7، ناشی از مهار نیتریک اکساید باشد. همچنین در این مورد نیز دوز موثر آرتسونات بیشترین اثر مهارکنندگی را نشان داد. در نتیجه پیام‌رسانی نیتریک اکساید نیز در بروز فعالیت سمیت سلولی آرتسونات نقش داشته است. اگرچه احتمالاً سایر مسیرهای پیام‌رسانی نیز در اثر مهار آرتسونات بر روی سلول‌ها نقش دارند که موجب بروز عملکردهای متعدد آرتسونات شده‌اند.

نتیجه گیری

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، به نظر می‌رسد آرتسونات فعالیت ضد تکثیری خود را با افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی در رده سلولی سرطان سینه انسانی MCF-7 اعمال نموده است. افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و پراکسیداز در سلول‌های تیمار شده با آرتسونات، احتمالاً سیستم دفاع آنتی اکسیدانتی را تغییر داده و بدین ترتیب موجب اثرات ضد تکثیری شده است. همچنین آرتسونات با مهار تولید نیتریک اکساید، اثرات سمیت سلولی بر روی سلول‌های سرطانی سینه داشته است. بدین ترتیب با تایید اثر آنتی اکسیدانتی آرتسونات مکانیسمی دیگر برای سمیت سلولی آن بیان شد. روی هم رفته می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که آرتسونات می‌تواند تکثیر سلول‌های سرطان سینه MCF-7 را به‌واسطه افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی و کاهش تولید نیتریک اکساید، مهار نموده و بدین ترتیب اثرات سمیت سلولی بروز دهد.

تشکر و قدردانی

حمایت مالی این پژوهش توسط دانشگاه گیلان انجام شده است که بدین‌وسیله مراتب قدردانی و سپاس از دانشگاه گیلان به‌عمل می‌آید.

منابع

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. *Cancer statistics, 2014*. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014; 64(1): 9-29.

16. Kim W-S, Choi WJ, Lee S, Kim WJ, et al. Anti-inflammatory, Antioxidant and Antimicrobial Effects of Artemisinin Extracts from *Artemisia annua* L. *The Korean Journal of Physiology & Pharmacology*. 2015; 19(1): 21-7.
17. Nakase I, Lai H, Singh NP, Sasaki T. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation. *International journal of pharmaceutics*. 2008; 354(1): 28-33.
18. Krishna S, Bustamante L, Haynes RK, Staines HM. Artemisinins: their growing importance in medicine. *Trends in pharmacological sciences*. 2008; 29(10): 520-7.
19. Singh NP, Lai HC. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells. *Anticancer Research*. 2004; 24(4): 2277-80.
20. Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, Miyachi H, et al. The anti-malarial artesunate is also active against cancer. *International journal of oncology*. 2001; 18(4): 767-73.
21. Moore JC, Lai H, Li J-R, Ren R-L, et al. Oral administration of dihydroartemisinin and ferrous sulfate retarded implanted fibrosarcoma growth in the rat. *Cancer letters*. 1995; 98(1): 83-7.
22. Lai H, Singh NP. Oral artemisinin prevents and delays the development of 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene (DMBA)-induced breast cancer in the rat. *Cancer letters*. 2006; 231(1): 43-8.
23. La Pensée L, Sabbani S, Sharma R, Bhamra I, et al. Artemisinin-Polypyrrole Conjugates :Synthesis, DNA Binding Studies and Preliminary Antiproliferative Evaluation. *ChemMedChem*. 2013; 8(5): 709-18.
24. Oneill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin—the debate continues. *Molecules*. 2010; 15(3): 1705-21.
25. Mercer AE, Maggs JL, Sun X-M, Cohen GM, et al. Evidence for the involvement of carbon-centered radicals in the induction of apoptotic cell death by artemisinin compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(13): 9372-82.
26. May Jr WS, Cuatrecasas P. Transferrin receptor: its biological significance. *The Journal of membrane biology*. 1985; 88(3): 205-15.
27. Lai H, Singh NP. Selective cancer cell cytotoxicity from exposure to dihydroartemisinin and holotransferrin. *Cancer letters*. 1995; 91(1): 41-46.
28. Zhang S, Chen H, Gerhard GS. Heme synthesis increases artemisinin-induced radical formation and cytotoxicity that can be suppressed by superoxide scavengers. *Chemico-biological interactions*. 2010; 186(1): 30-5.
29. Efferth T, Briehl MM, Tome ME. Role of antioxidant genes for the activity of artesunate against tumor cells. *International journal of oncology*. 2003; 23(4): 1231-5.
30. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2004; 44: 239-67.
31. Khan MA, Tania M, Zhang D-z, Chen H-c. Antioxidant enzymes and cancer. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2010; 22(2): 87-92.
32. Weydert CJ, Cullen JJ. Measurement of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in cultured cells and tissue. *Nature protocols*. 2010; 5(1): 51-66.
33. Khan MA, Chen H-c, Wan X-x, Tania M, et al. Regulatory effects of resveratrol on antioxidant enzymes: a mechanism of growth inhibition and apoptosis induction in cancer cells. *Molecules and cells*. 2013; 35(3): 219-25.
34. Arsova-Sarafinovska Z, Eken A, Matevska N, Erdem O, et al. Increased oxidative/nitrosative stress and decreased antioxidant enzyme activities in prostate cancer. *Clinical biochemistry*. 2009; 42(12): 1228-35.
35. Jeon SH, Park J-H, Chang S-G. Expression of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase) in human bladder cancer. *Korean Journal of Urology*. 2007; 48(9): 921-6.
36. Kasapovi J, Peji S, Todorovi A, Stojilkovi V, et al. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages. *Cell biochemistry and function*. 2008; 26(6): 723-30.
37. Ho JC-m, Zheng S, Comhair SA, Farver C, et al. Differential expression of manganese superoxide dismutase and catalase in lung cancer. *Cancer Research*. 2001; 61(23): 8578-85.
38. Li W-Y, Chan S-W, Guo D-J, Yu PH-F. Correlation between antioxidative power and anticancer activity in herbs from traditional Chinese medicine formulae with anticancer therapeutic effect. *Pharmaceutical Biology*. 2007; 45(7): 541-6.
39. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet*. 1994; 343(8907): 1199-206.
40. Lechner M, Lirk P, Rieder J, editors. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Seminars in cancer biology*. 2005; 15(4): 277-289.
41. Tanaka H, Kijima H, Tokunaga T, Tajima T, et al. Frequent expression of inducible nitric oxide synthase in esophageal squamous cell carcinomas.

- International journal of oncology. 1999; 14(6): 1069-142.
42. Franco L, Doria D, Bertazzoni E, Benini A, et al. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in pancreatic cancer. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2004; 73(1): 51-8.
43. Wang L, Shi GG, Yao JC, Gong W, et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2005; 8(1): 18-28.
44. Hirst DG, Robson T. Nitrosative stress in cancer therapy. *Front Biosci*. 2007; 12: 3406-18.
45. Coulter J, McCarthy H, Xiang J, Roedel W, et al. Nitric oxide—a novel therapeutic for cancer. *Nitric Oxide*. 2008; 19(2): 192-8.
46. Konkimalla VB, Blunder M, Korn B, Soomro SA, et al. Effect of artemisinins and other endoperoxides on nitric oxide-related signaling pathway in RAW 264.7 mouse macrophage cells. *Nitric Oxide*. 2008; 19(2): 184-91.
47. Aldieri E, Atragne D, Bergandi L, Riganti C, et al. Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF-kB activation. *FEBS letters*. 2003; 552(2): 141-4.
48. Wang J-x, Hou L-f, Yang Y, Tang W, et al. SM905, an artemisinin derivative, inhibited NO and pro-inflammatory cytokine production by suppressing MAPK and NF- B pathways in RAW 264.7 macrophages. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2009; 30(10): 1428-35.
49. Severina IS, Pyatakova NV, Bussygina OG, Mikhailitsyn FS, et al. Inhibition of nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase by the antimalarial drug, artemisinin. *European journal of pharmacology*. 2002; 438(1): 69-73.
50. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983; 65(1): 55-63.
51. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 1976; 72(1): 248-54.
52. Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical biochemistry*. 1971; 44(1): 276-87.
53. Sariri R, Jafarian V, Sajedi RH, Khajeh K. Inhibition of horseradish peroxidase by thiol type inhibitors: mercaptoethanol and mercaptoacetic acid. *Journal of molecular liquids*. 2006; 128(1): 175-7.
54. Damirchi A, Kiani M, Jafarian V, Sariri R. Response of salivary peroxidase to exercise intensity. *European journal of applied physiology*. 2010; 108(6): 1233-7.
55. Miranda KM, Espey MG, Wink DA. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide*. 2001; 5(1): 62-71.
56. Weydert CJ, Waugh TA, Ritchie JM, Iyer KS, et al. Overexpression of manganese or copper-zinc superoxide dismutase inhibits breast cancer growth. *Free Radical Biology and Medicine*. 2006; 41(2): 226-37.
57. Park CE, Yun H, Lee E-B, Min B-I, et al. The antioxidant effects of genistein are associated with AMP-activated protein kinase activation and PTEN induction in prostate cancer cells. *Journal of medicinal food*. 2010; 13(4): 815-20.
58. Abraham NN, Kanthimathi M, Abdul-Aziz A. Piper betle shows antioxidant activities, inhibits MCF-7 cell proliferation and increases activities of catalase and superoxide dismutase. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012; 12(1): 220.
59. Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, Gebhart E, et al. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines. *Molecular Pharmacology*. 2003; 64(2): 382-94.
60. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E, Pelicci PG. Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals? *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007; 8(9): 722-8.
61. MM A, AE M, AE R. Inhibition of human MCF-7 breast cancer growth by free radicals enhancement of polycondensed thienopyrimidine derivatives. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2011; 4(1): 118-22.
62. Timur M, Akbas SH, Ozben T. The effect of Topotecan on oxidative stress in MCF-7 human breast cancer cell line. *Acta biochimica polonica-english edition-*. 2005; 52(4): 897.
63. Rezakhani L, Rashidi Z, Mirzapour P, Khazaei M. Antiproliferatory Effects of Crab Shell Extract on Breast Cancer Cell Line (MCF7). *Journal of breast cancer*. 2014; 17(3): 219-25.

Evaluation of anti-proliferative activity of a semi-synthetic derivative of artemisinin- artesunate in MCF-7 human breast cancer cell line

Jamalzadeh L, Ph.D Student, Ghafoori H, Ph.D. *, Sariri R, Ph.D.

- Department of Biology, University of Guilan, Rasht, Iran

* Email corresponding author: h.ghafoori@gmail.ac.ir

Received: 7 Jul. 2015

Accepted: 13 Oct. 2015

Abstract

Aim: The present study aims to investigate if artesunate exerts its anti-proliferative activity by increasing antioxidant enzymes activity in MCF-7 human breast cancer cell line. Determining the oxidant effect of artesunate may elucidate a possible alternative mechanism for its cytotoxicity.

Material and methods: For evaluating cytotoxic activity of artesunate, MCF-7 cells were treated with different concentrations (0, 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 and 200 µg/ml) of artesunate and subjected to MTT assay after 24 hours. Also, the enzymatic activities of superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD) were measured in MCF-7 cells treated with selected doses of artesunate (0, 10, 25, 50 and 100 µg/ml) after 24h. In addition, the cell culture supernatants were used to assess the amount of nitric oxide (NO) production using the Griess method.

Results: Artesunate inhibited the growth of MCF-7 cells, dose-dependently and also significantly increased the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD), and peroxidase (POD). Furthermore, it suppressed NO production, dose-dependently.

Conclusion: To conclude, it seems that artesunate exert its cytotoxic activity by increasing the activity of antioxidant enzymes and through inhibition of NO production in MCF-7 cells. The increased activities of antioxidant enzymes in the treated cells could alter the antioxidant defense system, potentially contributing towards the anti-proliferative effect.

Keywords: Artesunate, anti-proliferative activity, antioxidant enzymes, MCF-7