

## فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: [www.jmp.ir](http://www.jmp.ir)

مقاله تحقیقاتی

بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی عصاره درمنه ترکمنی *Artemisia turcomanica* بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS) و برهم کنش آن بر بیان ژنهای *Cyclin D1* و *Cyclin E* نوشین فتحی<sup>۱</sup>، فرزانه تفویضی<sup>۱\*</sup>، امیر میرزایی<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> گروه زیست شناسی، واحد پرند، دانشگاه آزاد اسلامی، پرند، ایران<sup>۲</sup> گروه زیست شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

## چکیده

## اطلاعات مقاله

گل واژگان:

درمنه ترکمنی

آپوپتوز

سرطان معده

سمیت سلولی

**مقدمه:** استفاده از گیاهان دارویی در طب سنتی از دیرباز حایز اهمیت بوده است و بسیاری از این گیاهان دارویی دارای اثرات آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد میکروبی و ضد سرطانی می باشند. **هدف:** هدف از این مطالعه بررسی اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*) بر روی رده سلولی سرطان معده (AGS) و اثر آن بر بیان ژنهای *Cyclin D1* و *Cyclin E* می باشد. روش **بررسی:** ابتدا عصاره الکلی گیاه درمنه تهیه شد و اثرات ضد میکروبی آن مورد مطالعه قرار گرفت. اثرات کشندگی عصاره گیاه بر روی رده سلولی AGS، بعد از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت توسط روش MTT بررسی شد. در ادامه، با استفاده از روش رنگ آمیزی آنکسین FITC-V و PI، میزان مرگ آپوپتوتیک سلولی تعیین شد. در انتها ارزیابی بیان ژنهای *Cyclin D1* و *Cyclin E* با استفاده از روش Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** نتایج نشان داد که عصاره گیاه، اثرات ضد میکروبی چشمگیری بر روی باکتری اشرشیا کلی دارد. نتایج MTT بیانگر آن بود که عصاره گیاه دارای سمیت سلولی می باشد و بیشترین اثرات آن در ۲۴ ساعت پس از تیمار دیده شد. همچنین عصاره گیاه قادر به القا آپوپتوز در هر سه زمان در رده سلولی AGS می باشد. به طوری که بیشترین میزان آپوپتوز و کمترین میزان نکروز سلولی در مدت زمان ۴۸ ساعت مشاهده شد. همچنین، بیان ژنهای *Cyclin D1* و *Cyclin E* بعد از تیمار سلولها با عصاره کاهش یافت. **نتیجه گیری:** نتایج نشان داد که عصاره گیاه درمنه دارای اثرات سیتوتوکسیک و آپوپتوتیک بر روی رده سلولی AGS می باشد، به طوری که با انجام مطالعات بیشتر می توان از عصاره این گیاه به عنوان یک محصول بیولوژیک ضد سرطانی در درمان سرطان بهره برد.

مخففها: MIC، Minimum inhibitory concentration، MTT، Microculture Tetrazolium Test، DPPH، 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl  
\* نویسنده مسؤول: [f.tafvizi@rkiau.ac.ir](mailto:f.tafvizi@rkiau.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۲۴ آذر ۱۳۹۷؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۵ اسفند ۱۳۹۷؛ تاریخ پذیرش: ۲۷ اسفند ۱۳۹۷

doi: [10.29252/jmp.19.74.163](https://doi.org/10.29252/jmp.19.74.163)© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

## ۱. مقدمه

از هزاران سال پیش تاکنون اولین منبع بیولوژیک جهت یافتن دارو برای درمان بیماری‌ها گیاهان دارویی بودند. تاکنون حدود ۴۰۰,۰۰۰ گونه گیاهی شناخته شده است این در حالی است که از حدود یک درصد آنها (حدود ۵۰۰۰ گونه گیاهی) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱، ۲]. امروزه برای کشف داروها جهت درمان بیماری‌های نوظهور از گیاهان دارویی استفاده می‌شود و این در حالی است که تحقیقات در جهت یافتن داروهای جایگزین برای درمان بیماری‌های شناخته شده که دارو برای درمان آن در دسترس بوده ولی دارای عوارض جانبی زیاد و یا اثربخشی کم و مشکلات دیگر درمانی هستند، ادامه دارد [۳]. یکی از گیاهان دارای خواص دارویی، جنس آرتمیزیا (درمنه) می‌باشد. بیش از ۲۰۰۰ گونه از جنس آرتمیزیا در سرتاسر جهان وجود دارد و بسیاری از گونه‌های جنس آرتمیزیا جهت اهداف درمانی به عنوان مثال التیام‌دهنده درد، تسکین سرفه، ضد حساسیت، درمان مالاریا استفاده می‌شوند [۴]. در میان ۲۰۰۰ گونه آرتمیزیا، ۳۴ گونه در ایران وجود دارد که یکی از گونه‌های آن، درمنه ترکمنی (*Artemisia turcomanica*) است که متعلق به خانواده آستراسه (*Asteraceae*) است و این گیاه دارای محتوای بالای فلاونوئید، ترپنوئید و همچنین ماده شیمیایی به نام تانن است که در درمان سرطان‌ها نقش بسزایی دارند [۵].

سرطان اصطلاحی است که به مجموعه بیماری‌هایی اطلاق می‌شود که از تکثیر مهارنشده سلول‌ها پدید می‌آیند. احتمال بروز سرطان در سنین مختلف وجود دارد ولی با افزایش سن احتمال ابتلا به سرطان زیادتر می‌شود [۶]. بر طبق گزارش انجمن بهداشت آمریکا، ۷/۶ میلیون نفر بر اثر سرطان در سال ۲۰۱۷ دچار مرگ شده‌اند [۷]. یکی از سرطان‌های شایع در دنیا، سرطان معده است بطوریکه، این سرطان چهارمین عامل پیشتاز سرطان و همچنین سومین

عامل پیشتاز موارد مرگ می‌باشد [۸]. در سال ۲۰۱۶، این بیماری در ۹۵۰ هزار نفر در سراسر جهان مشاهده شد و باعث مرگ ۷۲۳ هزار نفر شد [۹]. امروزه درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی می‌باشد که اغلب موارد سلول‌های سالم نیز از بین می‌روند که این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود [۱۰]. در سال‌های اخیر، به علت افزایش شیوع مرگ و میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیوتراپی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود که یکی از این روش‌ها استفاده از عصاره‌های گیاهی است [۱۱].

سایکلین D<sub>1</sub> یک انکوپروتئین تنظیم‌کننده چرخه سلولی، هنگام ورود از مرحله G<sub>1</sub> به مرحله S است. Cyclin D<sub>1</sub> پروتئینی ۴۵ کیلو دالتونی است و بوسیله ژن CCND<sub>1</sub> واقع بر کروموزوم 11q13 کد می‌شود. در طول مراحل مختلف چرخه سلولی، سایکلین D<sub>1</sub> بخشی از سیستم مولکولی است که در تنظیم عبور چرخه سلولی از مرحله G<sub>1</sub> به S نقش دارد. سایکلین‌ها فعالیت آنزیمی ندارند اما باید به کینازها متصل باشند تا کیناز فعال شد [۱۲]. سایکلین E نیز پروتئینی است که در چرخه سلولی به CDK<sub>2</sub> متصل شده و مسئول گذر چرخه از مرحله G<sub>1</sub> به مرحله S می‌باشد. به طوری که این پروتئین بعد از تولید مجموعه‌هایی را با CDK<sub>4</sub> و CDK<sub>6</sub> تشکیل داده و سبب فسفوریلاسیون پروتئین RB می‌شود. با فسفریله شدن RB، مهار فعالیت رونویسی E<sub>2</sub>F برداشته شده و سلول وارد مرحله S می‌شود [۱۳]. سایکلین D<sub>1</sub> به عنوان یک پروتئین کلیدی و تنظیم‌کننده مثبت بر پیشرفت منظم چرخه سلولی است. بروز بیش از حد آن، سبب کوتاه شدن مرحله G<sub>1</sub> و وابستگی کمتر سلول به عوامل رشد می‌شود. چنین شرایطی منجر به از دست رفتن کنترل طبیعی چرخه سلولی و به طبع آن تکثیر سلول کنترل نشده می‌شود. بنابراین با مهار ژن

روش رنگ سنجی MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. غلظت‌های ۳۹، ۷۸، ۱۵۶، ۳۱۲، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره در فاصله زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی AGS تیمار شد. بعد از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و رنگ MTT (Microculture Tetrazolium Test) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت تحت شرایط  $CO_2$  ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگه داشته شدند. سپس رنگ MTT، خارج شد و کریستال‌های فورمازان تولید شده بوسیله سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شد. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه قرائت‌گر الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika, هلند) در طول موج ۵۷۰ نانومتر قرائت شد و میزان کشندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد [۱۶]:

$$100 \times (\text{جذب نوری سلول‌های کنترل بر جذب نوری سلول‌های تیمار شده}) = \text{میزان بقای سلولی}$$

۳.۲. بررسی میزان آپوپتوز با استفاده از کیت Annexin V-FITC به منظور بررسی میزان القای آپوپتوز در سلول‌های AGS تیمار شده با عصاره، از روش Apoptosis (PI) AnnexinV/propidium iodide (detection kit, Roch, Germany) و دستگاه فلوسیتومتری بر اساس دستورالعمل مربوطه استفاده شد. سلول‌های سرطانی AGS ( $10^5 \times 1$  سلول/چاهک) با غلظت  $IC_{50}$  عصاره به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شده و سلول‌های تیمار نشده AGS به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت میزان سلول‌های نکروز/آپوپتوز شده توسط دستگاه فلوسایتمتری مورد مطالعه قرار گرفتند [۱۷].

#### ۴.۲. بررسی چرخه سلولی

بررسی چرخه سلولی، توسط روش فلوسیتومتری و رنگ‌آمیزی propidium iodid DNA انجام گرفت تا

سایکلین D<sub>1</sub> می‌توان از پیشرفت سرطان جلوگیری کرد [۱۴]. تاکنون مطالعات مختلفی جهت بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی صورت گرفته است. در سال ۲۰۱۱، تقی‌زاده و همکاران به بررسی اثر ضدتکثیری عصاره گونه‌های مختلف جنس درمنه در ایران بر روی رده‌های سلول سرطانی معده، رحم و سینه پرداختند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گونه‌های مختلف جنس درمنه خاصیت ضدتکثیری از خود نشان می‌دهند [۱۵].

با توجه به اینکه تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی بر روی سرطان معده انجام نگرفته است، هدف از این مطالعه بررسی اثرات سیتوتوکسیک عصاره این گیاه بر روی سرطان معده و آنالیز بیان ژن‌های سیکلین D<sub>1</sub> و E می‌باشد.

#### ۲. مواد و روش‌ها

##### ۱.۲. جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

گیاه درمنه ترکمنی با شماره هرباریومی IBRC P1006115 از بانک گیاهی مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه شد. برای تهیه عصاره، اندام هوایی گیاه در جریان هوا قرار داده شد و سپس در سایه کاملاً خشک شد. برگ‌ها توسط دستگاه آسیاب برقی کاملاً پودر شدند و درون ظرف‌های شیشه‌ای نگهداری شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره‌گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین ترتیب که ۵۰ گرم از پودر برگ گیاه به ۵۰۰ میلی‌لیتر حلال متانول اضافه شد. عصاره‌گیری به مدت ۱۲ ساعت صورت گرفت و در پایان حلال بوسیله دستگاه روتاری اوپوراتور (Rv10 digital, آلمان) حذف شد.

##### ۲.۲. کشت سلول و بررسی سمیت سلولی

به منظور بررسی اثرات کشندگی سلولی عصاره درمنه ترکمنی بر روی رده سلولی سرطانی معده (AGS)، از

۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت [۱۹]. در این پژوهش از روش SYBER green و ژن  $\beta$ -actin به عنوان (housekeeping gene (reference gene جهت بررسی بیان ژن‌ها استفاده شد.

#### ۶.۲. بررسی خاصیت ضد میکروبی

به منظور بررسی خواص ضدباکتریایی عصاره گیاه درمنه ترکمنی از روش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) استفاده شد. باکتری‌های مورد مطالعه به شرح زیر بودند که از بانک میکروبی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند:

*Escherichia coli* ATCC 25922

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923

*Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

*Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883

*Bacillus cereus* ATCC 14579

*Salmonella typhimurium* ATCC 14028

آزمایش کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) بر اساس استاندارد CLSI به روش رقیق سازی در میکروپلیت انجام گرفت. آزمون MIC به صورت سه بار تکرار با استفاده از روش میکرودايلوشن در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای انجام شد [۲۰]. عصاره درمنه ترکمنی ابتدا در بالاترین غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای آزمایش فراهم شد و سپس رقت‌های متوالی در محدوده غلظت از ۳/۹ - ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر (۳/۹، ۷/۸، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰) تهیه شدند.

سپس پلیت‌های ۹۶ چاهکی به کمک توزیع ۹۵ میکرولیتر از محیط مولر هیتتون براث و ۵ میکرولیتر از تلقیح میکروبی به داخل هر یک از چاهک‌ها فراهم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از عصاره گیاه درمنه با غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم به چاهک اول هر میکروارگانسیم اضافه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی دیگر عصاره به داخل ۶ چاهک بعدی انتقال داده شد. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرولیتر محیط مولر هیتتون براث و ۵ میکرولیتر از تلقیح

نسبت سلول‌ها در فازهای مختلف اندازه‌گیری شود. تعداد  $2 \times 10^5$  سلول در هر چاهک پلیت شش خانه‌ای کاشته شده و با غلظت IC<sub>50</sub> عصاره به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تیمار شدند. سلول‌ها در دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و دوبار با PBS شستشو داده شدند. رسوب سلولی با یک میلی‌لیتر از P1/RNase A آغشته شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از آن توسط دستگاه فلوسیتومتری مورد بررسی قرار گرفت [۱۸].

#### ۵.۲. بررسی بیان ژن‌های *Cyclin D1* و *Cyclin E* به کمک روش Real - Time PCR

میزان بیان ژن‌های *Cyclin E* و *Cyclin D1* با استفاده از روش Real Time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول‌های تیمار شده و نشده با استفاده از کیت استخراج RNA (کیژن، آمریکا) طبق دستورالعمل آن استخراج شد و غلظت آن بوسیله دستگاه فتونانومتر (IMPLEN GmbH، آلمان) اندازه‌گیری شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل باکیت Revert Aid<sup>TM</sup> First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، لیتوانی) انجام گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ میکرولیتر بافر واکنش ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۰/۵ میکرولیتر آغازگر الیگو dT، دو میکرولیتر مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، یک میکرولیتر مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، یک میکرولیتر آنزیم رونوشت بردار معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) بود. برنامه دمایی - زمانی به صورت ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (غیرفعال شدن رونوشت بردار معکوس) و

## ۳. نتایج

میکروبی در هر ردیف به منزله کنترل منفی مورد استفاده قرار گرفت.

## ۷.۲. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی به روش DPPH

تست بررسی فعالیت جذب رادیکال‌های آزاد با استفاده از سوسپانسیون متانولی عصاره با استفاده از ترکیب DPPH (1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl) انجام شد، به طوری که محلول ۰/۱ میلی‌مولار از DPPH در متانول تهیه شد و ۱ میلی‌لیتر از آن را به ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون عصاره مورد نظر در غلظت‌های ۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه شد. سوسپانسیون حاصله در دمای اتاق ۳۰ دقیقه انکوبه شد و در نهایت جذب آن در طول موج ۵۱۷ nm در اسپکتروفتومتر خوانده شد. درصد جذب رادیکال آزاد توسط فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{DPPH scavenging effect (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

به طوری که  $A_0$  جذب نمونه کنترل،  $A_1$  جذب نمونه مورد نظر بود [۲۱].

## ۸.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

محاسبه آماری این مطالعه با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 انجام شد و نتایج با آنالیز واریانس یک طرفه (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفت و تفاوت بیان ژن‌های هدف، بین نمونه‌های کنترل و تیمار شده محاسبه شد. اطلاعات به صورت  $\text{mean} \pm \text{standard deviation}$  (SD) نمایش داده شده‌اند و  $P < 0/05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد. آنالیز داده‌های Real Time PCR بر اساس مقایسه چرخه آستانه انجام شد. در این مطالعه، اختلاف چرخه‌های آستانه به دست آمده از نمونه‌های مورد آزمایش (سلول‌های تیمار شده با عصاره) و نمونه‌های کنترل (سلول‌های تیمار نشده با عصاره) محاسبه و نسبت ژن هدف به ژن مرجع ( $\beta$ -actin) از طریق  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه شد.

۱.۳. بررسی درصد زیستایی رده سلولی AGS تحت تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره درمنه ترکمنی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت

درصد زیستایی حاصل از تیمار سلول‌های AGS با غلظت‌های مختلف  $\mu\text{g/ml}$  ۵۰۰۰، ۲۵۰۰، ۱۲۵۰، ۶۲۵، ۳۱۲، ۱۵۶، ۷۸، ۳۹ از عصاره گیاه درمنه ترکمنی در شکل ۱ (الف، ب، ج) نشان داده شده است. در هر سه زمان، با افزایش غلظت عصاره درمنه ترکمنی، کاهش درصد زیستایی مشاهده شد و بیشترین کاهش درصد زیستایی در زمان ۲۴ ساعت نسبت به دو زمان دیگر دیده شد. به طوری که، میزان  $\text{IC}_{50}$  مربوط به گیاه درمنه ترکمنی در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب  $0/64 \pm 120/39$ ،  $0/48 \pm 432$  و  $0/32 \pm 712/97$  میکروگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد.

## ۲.۳. نتایج القا آپوپتوز

نتایج حاصل از فلوسایتومتری در شکل ۲ نمایش داده است. در هر سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، القا آپوپتوز یا مرگ سلولی در مقایسه با گروه کنترل دیده شد. بیشترین القا آپوپتوز و کمترین نکروز مشاهده شده در زمان ۴۸ ساعت نسبت به زمان‌های دیگر دیده شد. مقایسه آپوپتوز القاء شده نسبت به نکروز نشان داد که افزایش معنی‌داری در القاء آپوپتوز نسبت به نکروز در زمان ۴۸ ساعت دیده شد (شکل ۲ و جدول ۱) ( $P < 0/01$ ).

## ۳.۳. ارزیابی چرخه سلولی

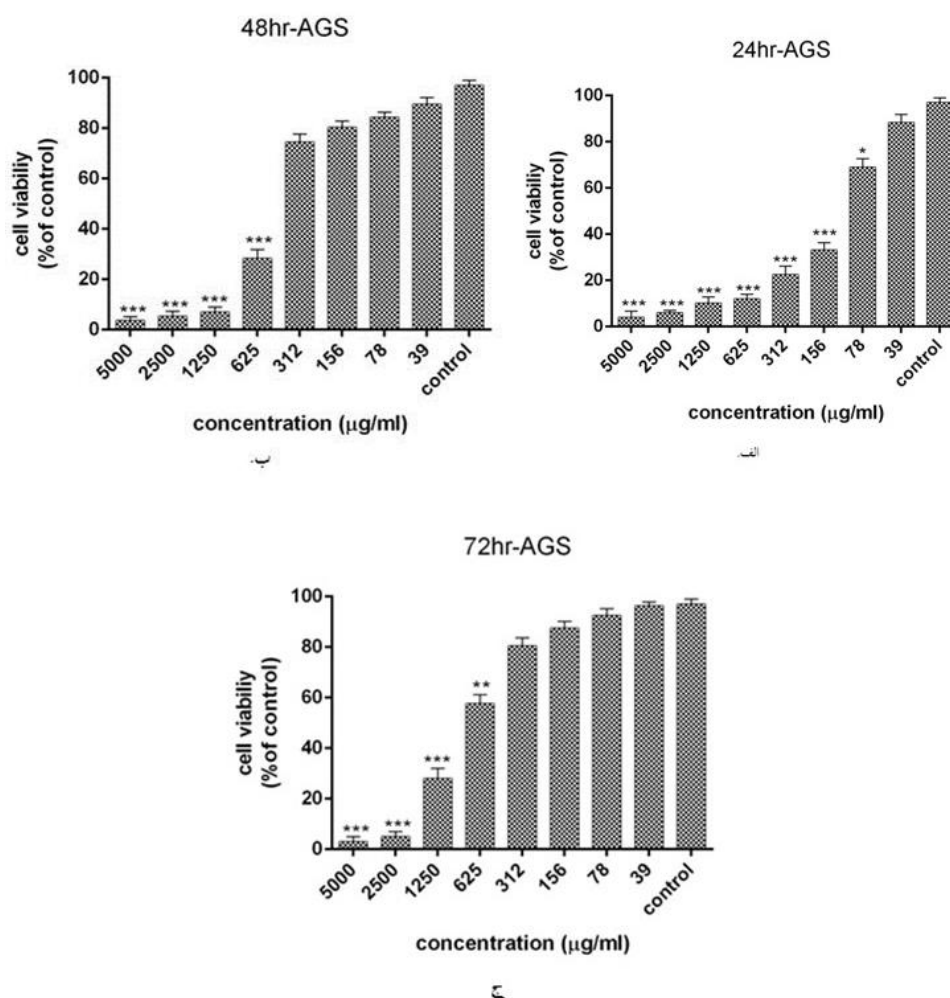
نتایج نشان داد که عصاره گیاه درمنه ترکمنی سبب تجمع سلول‌ها در مرحله sub G1 و مانع از ورود سلول‌ها به مراحل S و G2 شد. به این معنی که افزایش معنی‌دار درصد تجمع سلول‌ها در فاز sub G1 و کاهش درصد تجمع سلولی در فازهای S و G2 نسبت به گروه کنترل دیده شد. به طوری

گرفته شد. منحنی ذوب و منحنی تکثیر ژنهای Cyclin D1، Cyclin E و  $\beta$ -actin در شکل ۴ و ۵ نمایش داده شده است. کاهش بیان هر دو ژن در زمانهای ۲۴ و ۴۸ ساعت نسبت به گروه کنترل معنی دار بود، ولی کاهش بیان در ۷۲ ساعت نسبت به گروه کنترل معنی دار نبود (شکل ۶).

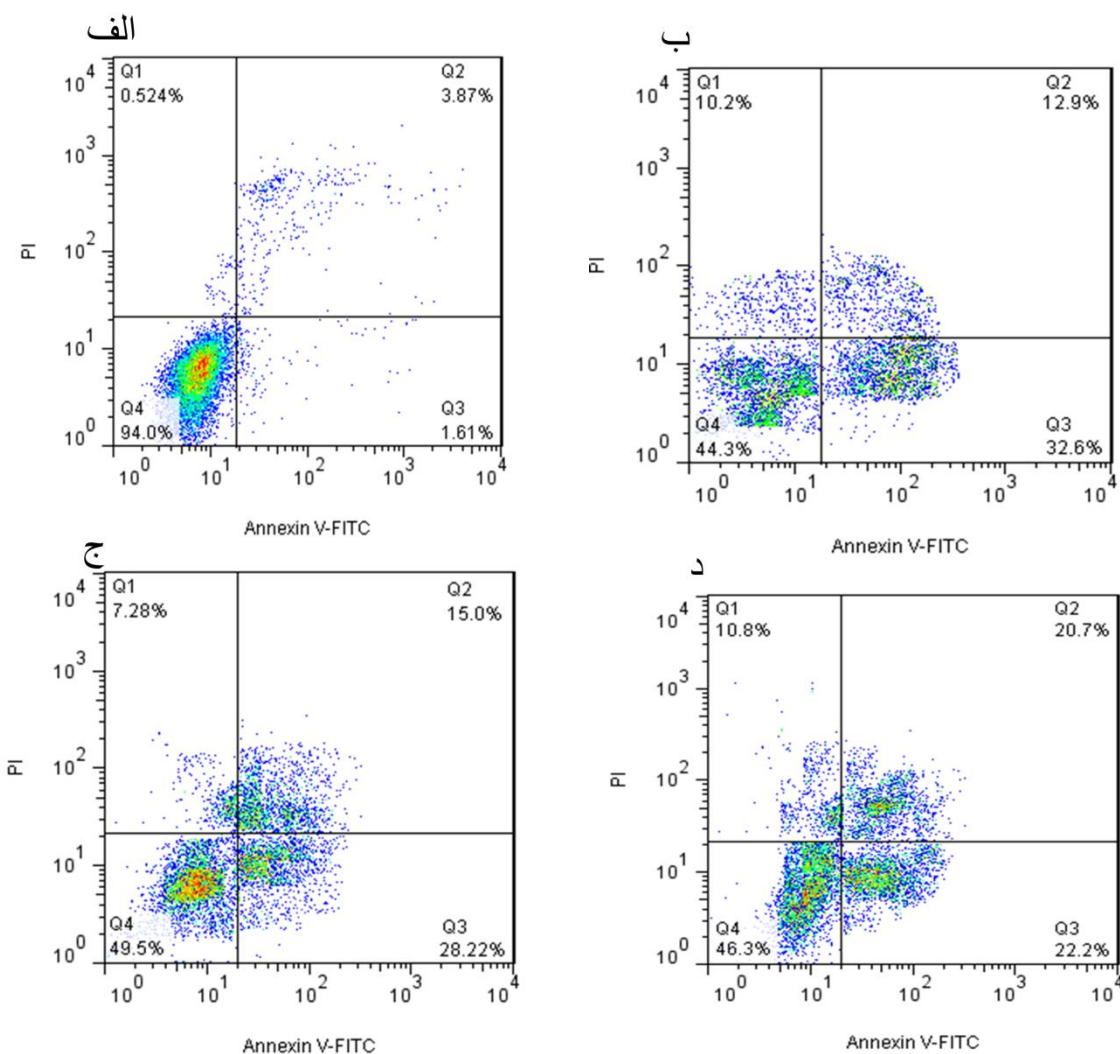
که بیشترین درصد تجمع سلولی در زمان ۲۴ ساعت (۵۳/۸۹ درصد) و در زمانهای ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر ۳۰/۶۷ درصد و ۲۱/۹ درصد تعیین شد (شکل ۳).

### ۴.۳. بررسی بیان ژن Cyclin E و Cyclin D1

به منظور بررسی بیان ژنهای سایکلین D1 و E، ژن  $\beta$ -actin به عنوان کنترل (House keeping) در نظر



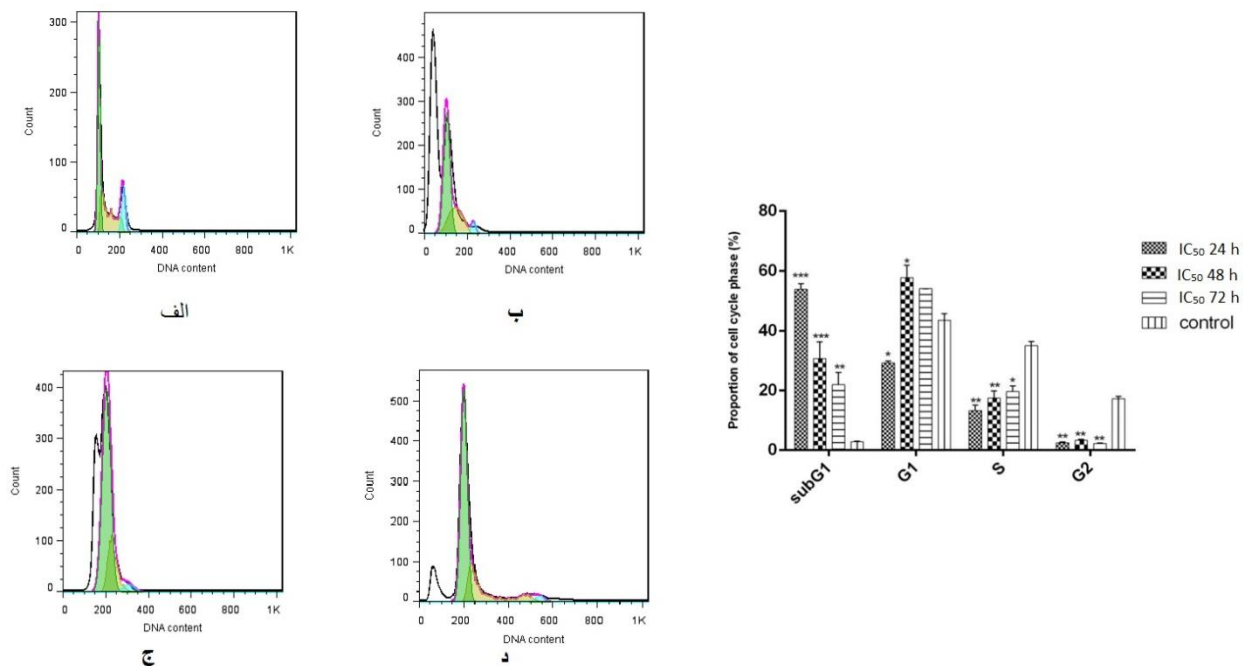
شکل ۱. درصد بقای سلولهای AGS در برابر غلظت‌های مختلف عصاره در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت؛ نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (n=3: \*\*\* P < 0.001, \*\* P < 0.01, \* P < 0.05).



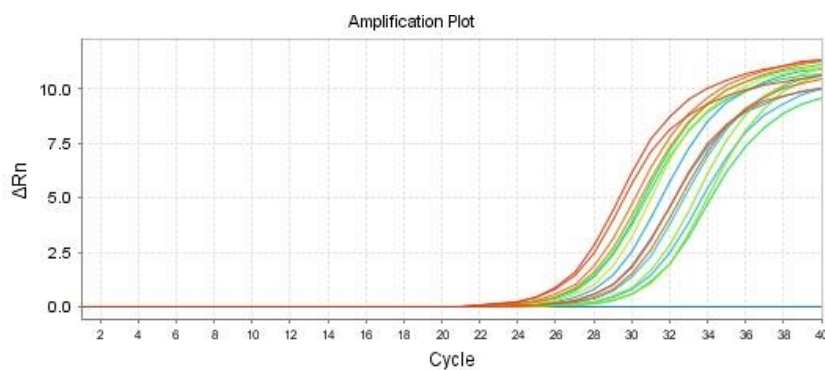
شکل ۲. نتایج فلوسایتومتری کیت انکسین در سلول‌های AGS تیمار شده با عصاره گیاه درمنه ترکمنی. الف) سلول کنترل (تیمار نشده)، ب) زمان ۲۴ ساعت، ج) زمان ۴۸ ساعت، د) زمان ۷۲ ساعت. Q1: میزان نکروز، Q2: میزان آپوپتوز ثانویه، Q3: میزان آپوپتوز اولیه، Q4: میزان سلول‌های زنده.

جدول ۱. مقایسه آپوپتوز و نکروز القا شده بر اساس داده‌های فلوسایتومتری با دوبار تکرار

Stage	Control	IC <sub>50</sub> (24 h)	P	IC <sub>50</sub> (48 h)	P	IC <sub>50</sub> (72 h)	P
Early apoptosis	۱/۶۱	۲۹/۳۵ ± ۴/۵۹	< ۰/۰۰۱	۲۷/۲۷ ± ۱/۳۳	< ۰/۰۰۱	۲۰/۹ ± ۱/۸۳	< ۰/۰۱
Late apoptosis	۳/۸۷	۱۷/۶ ± ۶/۶۷	< ۰/۰۵	۱۴/۶ ± ۰/۵۶۶	< ۰/۰۵	۲۱/۶ ± ۱/۲۷	< ۰/۰۱
Necrosis	۰/۵۲۴	۱۲/۳۵۹ ± ۳/۲۵	< ۰/۰۱	۶/۴۲ ± ۱/۲	= ۰/۰۹۲	۹/۵۵ ± ۱/۷۶	= ۰/۱۵

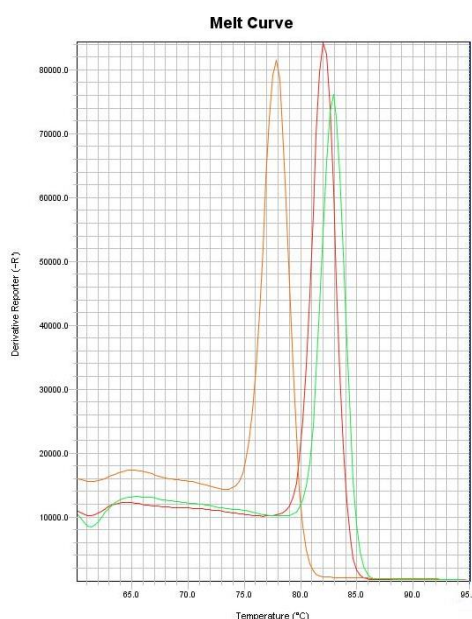


شکل ۳. تأثیر عصاره گیاه درمنه ترکمنی بر میزان تغییر سیکل‌های سلولی در سلول کنترل (الف) بعد از ۲۴ (ب) ۴۸ (ج) و ۷۲ (د) ساعت.

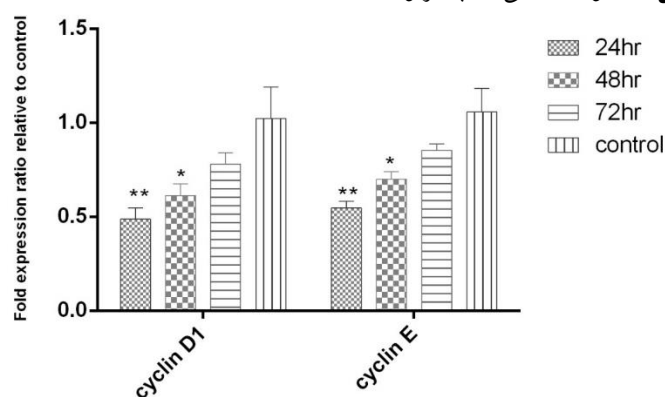


شکل ۴. منحنی تکثیر ژن‌های نمودار منحنی ذوب مربوط به ژن‌های cyclin D1، cyclin E و β-actin.





شکل ۵. نمودار منحنی ذوب مربوط به ژنهای cyclin D1 و cyclin E و  $\beta$ -actin



شکل ۶. مقایسه بیان ژنهای (Cyclin E, cyclin D1) در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت.

۵.۳. بررسی خواص ضد میکروبی *S. aureus* می‌باشد که میزان MIC آن غلظت ۲۵۰

میلی گرم/میلی لیتر بود (شکل ۷).

۶.۳. محاسبه غلظت مهار ۵۰ درصد ( $IC_{50}$ ) با استفاده از

روش DPPH

نتایج بررسی آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی نشان

داد که میزان ۵۰ درصد مهارکنندگی عصاره برابر بود با ۰/۲۷

میکروگرم در میلی لیتر. همچنین میزان  $IC_{50}$  اسید آسکوربیک

۵.۳. بررسی خواص ضد میکروبی

به منظور بررسی حداقل غلظت مهارکننده رشد

باکتری‌ها، غلظت‌های مختلف عصاره (۷/۸۱، ۱۵/۶۲،

۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) مورد

مطالعه قرار گرفت. کمترین غلظتی که در حضور آن

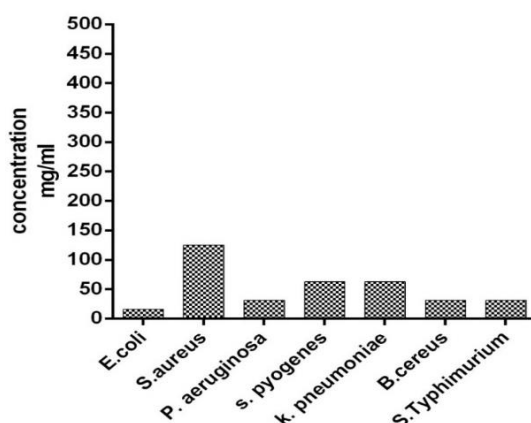
کدورتی مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت مهارکننده

در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد، بیشترین تأثیر این عصاره

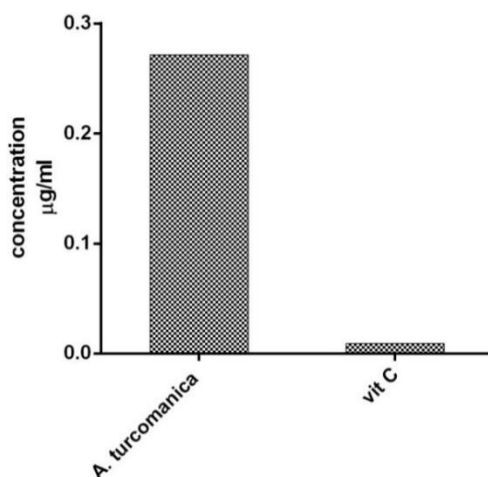
بر روی باکتری *E. coli* می‌باشد که میزان MIC آن ۳۱/۲۵

میلی گرم/میلی لیتر بود و کمترین تأثیر آن بر روی

(ویتامین C) به عنوان نمونه کنترل برابر بود با ۹/۳۵ میکروگرم در میلی لیتر (شکل ۸).



شکل ۷. نتایج مربوط به تست MIC باکتری‌های مورد مطالعه. همانطور که مشاهده می‌شود عصاره گیاه درمنه ترکمنی بیشترین تأثیر را بر روی باکتری *E. coli* دارد.



شکل ۸. مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه درمنه ترکمنی در مقایسه با ویتامین C

#### ۴. بحث

میر ناشی از سرطان‌ها و نقص روش‌های شیمی درمانی و رادیو درمانی در فرم‌های پیشرفته سرطان، نیاز به یافتن شیوه‌های جدید برای کنترل سرطان احساس می‌شود. با توجه به این امر که سرطان بزرگترین عامل مرگ و میر در میان زنان و مردان است، تحقیق و تولید داروهای ضدسرطانی با کارایی بیشتر و سمیت کمتر امر ضروری می‌باشد و در این میان عصاره‌های گیاهی کاندید مناسب جهت درمان می‌باشند [۲۳].

سرطان معده یکی از معمول‌ترین انواع بدخیمی‌ها است که معمولاً در افراد تا مراحل پیشرفته هیچ علامتی ندارد و طول عمر پنج ساله برای بیماران مبتلا به این نوع کارسینوما حدود ۱۰ تا ۱۳ درصد می‌باشد [۲۲]. امروزه درمان‌های رایج سرطان شامل جراحی، اشعه درمانی و شیمی درمانی می‌باشد که اغلب موارد سلول‌های سالم نیز از بین می‌روند که این می‌تواند باعث اثرات سمی و عوارض جانبی در بیمار شود. در سال‌های اخیر به علت افزایش شیوع مرگ و

بوده و قادر است رشد باکتری‌های پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی را مهار کند که این مقدار با غلظت عصاره رابطه مستقیم دارد و با افزایش غلظت آن افزایش می‌یابد. فعالیت ضد میکروبی عصاره بر روی باکتری‌های مختلفی بررسی شد. حساس‌ترین باکتری نسبت به عصاره باکتری *E. coli* بود و مقاوم‌ترین باکتری در برابر اثر عصاره باکتری *S. aureus* بود.

اثر سمیت سلولی عصاره متانولی درمنه دشتی بر سلول سرطانی پستان MCF-7 نشان داد که کمترین میزان  $IC_{50}$  برای سلول‌های سرطانی در مدت زمان ۲۴ ساعت، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که در مقایسه با مطالعه حاضر نشان می‌دهد عصاره گیاه درمنه ترکمنی با  $IC_{50}$  کمتر (۱۲۰/۳۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر) اثرات ضد تکثیر در رده سلولی AGS دارد [۲۴].

اثر ضد تکثیر عصاره گونه‌های مختلف درمنه در ایران بر روی رده‌های سلولی (AGS, HeLa, AGS, MCF-7) و رده سلولی نرمال (L-929) نشان داد که گونه‌های مختلف درمنه خاصیت ضد تکثیر دارند. مقادیر متفاوتی از عصاره گیاهان به کشت سلول اضافه و برای مدت ۷۲ ساعت انکوبه شد. سلول‌های Hela به هر دو عصاره *A. ciniformis* و *A. diffusa Krasch* حساسیت نشان دادند. عصاره دی کلرومتان *A. ciniformis* و *A. santolina* اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری را روی سلول‌های AGS در مقایسه با دیگر عصاره‌ها نشان داد. سلول‌های MCF-7 به خوبی توسط *A. ciniformis* مهار شدند. در سلول‌های AGS، عصاره‌های دی کلرومتان و متانول *A. ciniformis Krasch* بیشترین تأثیر ممانعت‌کنندگی در رشد سلول را نشان دادند [۱۵].

نانو ذرات نقره سنتز شده با استفاده از عصاره برگ گیاه درمنه ترکمنی، اثرات ضد سرطانی بر روی رده سلولی سرطان معده نشان دادند. اندازه میانگین نانو ذره نقره سنتز شده ۲۲

نتایج تست MTT نشان داد که خاصیت ضد تکثیری عصاره از الگوی وابسته به دوز و زمان پیروی می‌کند. به طوری که بیشترین خاصیت ضد تکثیری عصاره درمنه ترکمنی بر روی رده سلولی در مدت زمان ۲۴ ساعت بود یعنی با افزایش مدت زمان تیمار از ۲۴ ساعت به ۷۲ ساعت، کاهش فعالیت ضد تکثیری دیده شد. همچنین با افزایش غلظت عصاره در هر سه زمان، افزایش فعالیت ضد تکثیری و مهار سلولی دیده شد.

نتایج حاصل از القاء آپوپتوز هم نشان داد که بیشترین القاء آپوپتوز اولیه در زمان ۲۴ ساعت دیده شد. در برآورد کلی نسبت آپوپتوز القاء شده نسبت به نکروز ایجاد شده، به نظر می‌رسد که در زمان ۴۸ ساعت آپوپتوز بیشتر و نکروز کمتری با تأثیر عصاره گیاه در سلول‌های AGS اتفاق می‌افتد. نتایج این تست نیز الگوی وابسته به زمان القاء آپوپتوز با استفاده از عصاره گیاه را نشان می‌دهد.

در بررسی بیان ژن هم راستا با سایر نتایج گرفته شده اعم از MTT و فلوسایتومتری نشان داده شد که در هر دو زمان ۲۴ و ۴۸ کاهش بیان معنی‌دار دو ژن Cyclin D1 و Cyclin E نسبت به گروه کنترل دیده شد، ولی بیشترین کاهش بیان متعلق به ۲۴ ساعت بود.

در بررسی فلو چرخه سلولی، نتایج نشان داد که عصاره گیاه قادر است سبب تجمع سلول‌ها در مرحله sub G1 چرخه سلولی شود و از ورود سلول‌ها به مراحل بعدی چرخه سلولی (مراحل S و G2) جلوگیری کند به طوری که درصد سلول‌های واقع در مرحله S و G2 کاهش معنی‌داری نسبت به گروه کنترل داشت. از طرفی نتایج نشان داد که این توانایی در زمان ۲۴ ساعت بیشتر بود و با گذشت زمان کاهش می‌یابد.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره الکلی گیاه درمنه نشان می‌دهد، عصاره این گیاه دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی

آنها در فاز G0/G1 به میزان ۵۸ درصد شود. همچنین نتایج بررسی بیان ژن‌های دخیل در سرطان نشان داد که عصاره این گیاه قادر است باعث کاهش بیان انکوژن cyclin D1 تا میزان ۵۶ درصد شود که نتایج این مطالعه بسیار نزدیک به نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر می‌باشد [۲۹].

#### ۵. نتیجه گیری

مطالعه انجام شده اثر بیولوژیکی قابل قبولی از عصاره گیاه درمنه ترکمنی را در شرایط آزمایشگاهی در مدل سرطان معده و خاصیت ضد میکروبی نشان داد. همچنین استفاده از عصاره گیاه در فرآیند آپوتوزی می‌تواند مؤثر باشد. در نهایت بر اساس این تحقیق و تحقیقات پیشین این گیاه می‌تواند کاندید مطالعات جامع‌تر بررسی اثرات ضدسرطانی و ضد میکروبی باشد.

#### مشارکت نویسندگان

نوشین فتحی، انجام کار تحقیقاتی و آزمایشگاهی، فرزانه تفویضی، سوپروایزر، طراحی پروژه تحقیقاتی، نوشتن مقاله و ویرایش آن، امیر میرزایی، نوشتن مقاله.

#### تضاد منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافع ندارند.

#### تقدیر و تشکر

از همکاری دکتر بازرگان در انجام پروژه قدردانی می‌شود.

نانومتر بود و نانوذرات نقره سنتز شده دارای اثرات ضد تکثیری و القا آپتوز بر روی رده سلولی سرطان معده بودند [۲۵].

اثرات سمیت سلولی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از قسمت‌های هوایی گیاه *A. marschalliana* بر روی رده سلولی AGS گزارش شده است. همچنین اثر آنتی‌باکتریالی آن علیه باکتری‌های پاتوژنیک *S. aureus* *Bacillus* *Acinetobacter baumannii* و *P. aeruginosa* بررسی شد.

مقدار IC<sub>50</sub> بر روی رده سلولی AGS پس از ۲۴ ساعت مقدار ۲۱/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. وقتی غلظت نانوذرات به ۱۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید، درصد سلول‌های زنده ۶/۵۱ درصد تخمین زده شد. همچنین نتایج فلوسایتومتری نشان دهنده افزایش ۷ و ۳۰ درصدی در آپتوز اولیه و تأخیری در سلول‌های تیمار شده با غلظت IC<sub>50</sub> نانوذرات در مقایسه با سلول‌های کنترل بود. بیشترین خاصیت ضدباکتریایی بر علیه *P. aeruginosa* دیده شد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره هم به اثبات رسید [۲۶].

اثرات چشمگیر ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نانوذرات نقره سنتز شده با استفاده از گیاه *A. annua* گزارش شده است [۲۸].

همچنین مطالعات نشان داده است که عصاره آبی گیاه *Rosemary* سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS) می‌شود. نتایج این مطالعه نشان داد عصاره آبی رزماری با غلظت ۴۱۰ میکروگرم/میلی‌لیتر قادر است رشد ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی را مهار کند. همچنین نتایج این مطالعه در ارتباط با تأثیر عصاره آبی گیاه بر روی چرخه سلولی نشان داد که این عصاره قادر است باعث افزایش توقف سلول‌ها در مرحله G1 به میزان قابل توجهی شود [۲۸].

عصاره گیاه *Incarvilleae compacta* قادر است باعث مهار رشد سلول‌های سرطانی معده (AGS) و توقف رشد

## منابع

1. Bent S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation: grand rounds at University of California, San Francisco Medical Center. *J. Gen. Intern. Med.* 2008; 23 (6): 854 - 9.
2. Bent S1 and Ko R. Commonly used herbal medicines in the United States: a review. *Am. J. Med.* 2004; 116 (7): 478 - 85.
3. Firenzuoli F and Gori L. Herbal medicine today: clinical and research issues. *eCAM.* 2007; 4 (Suppl 1): 37 - 40.
4. Bora KS1 and Sharma A. The genus *Artemisia*: a comprehensive review. *Pharm. Biol.* 2011; 49 (1): 101 - 9.
5. Tan RX, Zheng WF and Tang HQ. Biologically active substances from the genus *Artemisia*. *Planta Med.* 1998; 64 (4): 295 - 302.
6. Blackadar CB. Historical review of the causes of cancer. *WJCO.* 2016; 10; 7 (1): 54 - 86.
7. Alberto d'Onofrio, Chiara Mazzetta, Chris Robertson, Michel Smans, Peter Boyle, Mathieu Boniol. Maps and atlases of cancer mortality: a review of a useful tool to trigger new questions. *E cancer medical science* 2016; 10: 670.
8. Sitarz R, Skierucha M, Mielko J, Offerhaus GJA, Maciejewski R and Polkowski WP. Gastric cancer: epidemiology, prevention, classification, and treatment. *Cancer Manag. Res.* 2018; 7; 10: 239 - 48.
9. Charalampakis N, Economopoulou P, Kotsantis I, Tolia M, Schizas D, Liakakos T, Elimova E, Ajani JA and Psyrris A. Medical management of gastric cancer: a 2017 update. *Cancer Med.* 2018; 7 (1): 123 - 33.
10. Urruticoechea A, Alemany R, Balart J, Villanueva A, Viñals F and Capellá G. Recent advances in cancer therapy: an overview. *Curr. Pharm. Des.* 2010; 16 (1): 3 - 10.
11. Ortiz R1, Melguizo C, Prados J, Álvarez PJ, Caba O, Rodríguez-Serrano F, Hita F and Aránega A. New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. *Recent Pat. Anti-Cancer Drug Discov.* 2012; 7 (3): 297-312.
12. Qie S and Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. *J. Mol. Med (Berl).* 2016; 94 (12): 1313-26.
13. Möröy T and Geisen C. Cyclin E. *IJBCB.* 2004; 36 (8): 1424-39.
14. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol. Cancer.* 2007; 2; 6: 24.
15. Taghizadeh Rabe SZ, Mahmoudi M, Ahi A and Emami SA. Antiproliferative effects of extracts from Iranian *Artemisia* species on cancer cell lines. *Pharm. Biol.* 2011; 49 (9): 962-9.
16. Satyavani K, Gurudeeban S, Ramanathan T and Balasubramanian T. Toxicity study of silver nanoparticles synthesized from *Suaeda monoica* on Hep-2 Cell Line. *AJMB.* 2012; 4 (1): 35-9.
17. Badmus JA, Ekpo OE, Hussein AA, Meyer M and Hiss DC. Antiproliferative and apoptosis induction potential of the methanolic leaf extract of *Holarrhena floribunda* (G. Don). *eCAM.* 2015; 2015: 756482.
18. Pozarowski P, Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods Mol. Biol.* 2004; 281: 301-11.
19. Hirata Y, Maeda S, Mitsuno Y, Akanuma M, Yamaji Y, Ogura K, Yoshida H,

Shiratori Y and Omata M. *Helicobacter pylori* activates the cyclin D1 gene through mitogen-activated protein kinase pathway in gastric cancer cells. *Infect Immun*. 2001; 69 (6): 3965-71.

20. Wypij M, Czarnecka J, Świecimska M, Dahm H, Rai M and Golinska P. Synthesis, characterization and evaluation of antimicrobial and cytotoxic activities of biogenic silver nanoparticles synthesized from *Streptomyces xinghaiensis* OF1 strain. *World J. Microbiol. Biotechnol*. 2018; 5; 34 (2): 23.

21. Mahdi-Pour B1, Jothy SL, Latha LY, Chen Y and Sasidharan S. Antioxidant activity of methanol extracts of different parts of *Lantana camara*. *Asian Pac. J. Trop. Biomed*. 2012; 2 (12): 960-5.

22. Carcas LP. Gastric cancer review. *J. Carcinog*. 2014; 19; 13: 14.

23. Tsuruo T1, Naito M, Tomida A, Fujita N, Mashima T, Sakamoto H and Haga N. Molecular targeting therapy of cancer: drug resistance, apoptosis and survival signal. *Cancer Sci*. 2003; 94 (1): 15-21.

24. Gordanian B, Behbahani M, Carapetian J and Fazilati M. In vitro evaluation of cytotoxic activity of flower, leaf, stem and root extracts of five *Artemisia* species. *Res. Pharm. Sci*. 2014; 9 (2): 91-6.

25. Mousavi B, Tafvizi F, Zaker Bostanabad S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia turcomanica* leaf extract and the study of anti-cancer effect and apoptosis induction on gastric cancer cell line (AGS). *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2018; 23: 1-12.

26. Salehi S, Shandiz SA, Ghanbar F, Darvish MR, Ardestani MS, Mirzaie A and Jafari M. Phytosynthesis of silver nanoparticles using *Artemisia marschalliana* Sprengel aerial part extract and assessment of their antioxidant, anticancer, and antibacterial properties. *Int. J. Nanomedicine* 2016; 11: 1835-46.

27. Johnson AS, Obot I.B and Ukpong US. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artemisia annua* and *Sida acuta* leaves extract and their antimicrobial, antioxidant and corrosion inhibition potentials. *J. Mater. Environ. Sci*. 2014; 5: 3: 899-906.

28. Karimi N, Rashedi J, Mahdavi Poor B, Arabi S, Ghorbani M, Tahmasebpour N and Asgharzadeh M. Cytotoxic effect of rosemary extract on gastric adenocarcinoma (AGS) and esophageal squamous cell carcinoma (KYSE30) cell lines. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench*. 2017; 10 (2): 102-7.

29. Zhang L, Wu H, Sun G, Xu X, Sun X and Cao L. Trichloromethane fraction of *Incarvillea compacta* induces lytic cytotoxicity and apoptosis in Epstein-Barr virus-positive gastric cancer AGS cells. *BMC Complement. Altern. Med*. 2016; 16: 344.

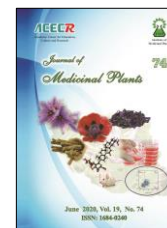
How to cite this article: Fathi N, Tafvizi F, Mirzaie A. Antibacterial and anti-cancer activities of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its interaction on *cyclin D1* and *cyclin E* genes. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(74): 163-176.  
doi: 10.29252/jmp.19.74.163



Institute of  
Medicinal Plants

## Journal of Medicinal Plants

Journal homepage: [www.jmp.ir](http://www.jmp.ir)



### Research Article

## Antibacterial and anti-cancer activities of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its interaction on *cyclin D1* and *cyclin E* genes

Nooshin Fathi<sup>1</sup>, Farzaneh Tafvizi<sup>1,\*</sup>, Amir Mirzaie<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

*Artemisia turcomanica*  
Apoptosis  
Cytotoxicity  
Gastric cancer

### ABSTRACT

**Background:** The use of medicinal herbs in traditional medicine has been important and many of these plants have antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-cancer effects. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the antibacterial and anti-cancer effects of *Artemisia turcomanica* extract on gastric cancer cell line (AGS) and its effect on expression of *cyclin D1* and *cyclin E* genes. **Methods:** At first the alcoholic extract of *A. turcomanica* was prepared and its antibacterial effect was evaluated using MIC (Minimum Inhibitory Concentration) method. Subsequently, the cytotoxic effect of extract on AGS cell line was studied using MTT method after 24, 48 and 72 hours. Moreover, the apoptotic effect of extract was determined via annexin FITC-V and PI staining. Finally, the gene expression of *cyclin D1* and *cyclin E* were measured using Real Time PCR method. **Results:** The antibacterial results show that the *A. turcomanica* extract had significant effect on *Escherichia coli*. In addition, the results of MTT assay indicated that the maximum cytotoxic effect of *A. turcomanica* extract was observed in 24 h and over time, its cytotoxic effects were decreased. The maximum apoptotic effect and minimum necrosis effects was observed in 48 h. Also, the Real Time PCR results reveal that the gene expression of *cyclin D1* and *cyclin E1* was down-regulated. **Conclusion:** The results of this study show that the *A. turcomanica* extract had cytotoxic and apoptotic effects on AGS cell line and it can be used as anticancer candidate in cancer therapy and prevention after further studies.

**Abbreviations:** MIC, Minimum inhibitory concentration; MTT, Microculture Tetrazolium Test; DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazyl.

\* Corresponding author: [f.tafvizi@rkiau.ac.ir](mailto:f.tafvizi@rkiau.ac.ir)

doi: [10.29252/jmp.19.74.163](https://doi.org/10.29252/jmp.19.74.163)

Received 15 December 2018; Received in revised form 24 February 2019; Accepted 18 March 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)