

Investigation of Chemical Composition of *Helichrysum artemisioides* Essential Oil, and its Antibacterial and Cytotoxic Effects on Colon Cancer Cell Line and Analysis of Apoptotic Gene Expression Using PCR Method

Sepideh Piroozmand¹, Zahra Mousavi¹, Amir Mirzaie², Abdolhossein Rustaiyan^{3*}

¹Department of Pharmacology & Toxicology, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Department of Biology, Roudehen Branch, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.

³Department of Chemistry, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

*Corresponding Author:
Abdolhossein Rustaiyan,
Department of Chemistry,
Science & Research Branch,
Islamic Azad University,
Tehran, Iran.

Email:
arustaiyan@yahoo.it

Received: 3 Dec, 2016

Accepted: 8 Feb, 2017

Abstract

Background and Objectives: *Helichrysum artemisioides* is one of the endemic medicinal plants in Iran. The aim of this research was to identify the chemical composition of *H. artemisioides* essential oil and its antibacterial and cytotoxic effects on colon cancer cell line (HT29).

Methods: In this study, the essential oil of *H. artemisioides* was collected by hydrodistillation method using Clevenger apparatus. Chemical composition of essential oil was identified using a GC-MS device. Subsequently, antibacterial effect of the essential oil on pathogenic bacteria and its cytotoxic activity on colon cancer cell line (HT29), were determined using MIC and MTT methods, respectively. The expression of *Bax* and *Bcl2* apoptotic genes in HT29 cell line, was assessed using real time PCR method.

Results: GC-MS analysis of essential oil of the plant showed 55 compounds, most of which belonged to Carvacrol (12.5%) and 1R- α -Pinene (12.5%). Furthermore, the essential oil of this plant had the highest effect on Gram-positive bacteria and the least effect on gram-negative bacteria. Moreover, the essential oil of this plant had IC₅₀=31.54mg/ml on HT29 cell line. Results of real time PCR showed increase in expression level of *Bax* gene and decrease in expression level of *Bcl2*, respectively, 2.9 ± 0.2 ($p < 0.05$) and 0.2 ± 0.7 ($p < 0.05$).

Conclusion: Considering antibacterial and anticancer effects of *H. artemisioides* essential oil, it appears that this plant has the potential to be used in pharmaceutical industries.

Keywords: *Helichrysum artemisioides*; Colon cancer; Antibacterial agents; Apoptosis; Real-time polymerase chain reaction.

بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه هلیکریزوم آرتمیزیوئیدس، اثرات ضد میکروبی و سمیت سلولی آن بر روی رده سلولی سرطان کولون و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی با روش PCR

سپیده پیروزمند^۱، زهرا موسوی^۱، امیر میرزایی^۲، عبدالحسین روستایان^{۳*}

چکیده

زمینه و هدف: گیاه *Helichrysum artemisioides* یکی از انواع گیاهان بومی دارویی ایران است که از نظر طب سنتی حایز اهمیت می‌باشد. هدف از این پژوهش، بررسی ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *H. artemisioides*، اثرات ضدباکتریایی، سمیت سلولی و آپوپتوزی آن بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT29) بود.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، ابتدا اسانس گیاه *H. artemisioides* به روش تقطیر با آب به وسیله دستگاه کلونجر استخراج شد، سپس ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده اسانس این گیاه به کمک دستگاه GC-MS شناسایی شدند. در پی آن، اثرات ضدباکتریایی اسانس گیاه بر روی باکتری‌های پاتوژن و اثرات سمیت سلولی آن در رده سلولی HT29 با روش‌های MIC و MTT تعیین گردید. بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در رده سلولی HT29 با استفاده از روش Real Time PCR ارزیابی شد.

یافته‌ها: آنالیز GC-MS اسانس گیاه، تعداد ۵۵ ترکیب را نشان داد که بیشترین آن مربوط به Carvacrol (۱۲/۵٪) و 1R- α -Pinene (۱۲/۵٪) بود. همچنین اسانس این گیاه، بیشترین تأثیر را روی باکتری‌های گرم مثبت و کمترین اثر را روی باکتری‌های گرم منفی داشت. علاوه بر این، اسانس این گیاه دارای سمیت سلولی IC50=۳۱/۵mg/ml روی رده سلولی HT29 بود. نتایج Real Time PCR افزایش بیان ژن *Bax* و کاهش بیان *Bcl2* را به ترتیب به میزان $2/9 \pm 0/2$ و $0/2 \pm 0/7$ ($p < 0/05$) نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثرات ضدباکتریایی و ضدسرطانی اسانس گیاه *H. artemisioides*، به نظر می‌رسد این گیاه پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد.

کلید واژه‌ها: هلیکریزوم آرتمیزیوئیدس؛ سرطان‌های کولون؛ عوامل ضدباکتریایی؛ آپوپتوزیس؛ واکنش زنجیره پلیمرز در زمان واقعی.

^۱گروه داروسازی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲گروه زیست‌شناسی، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران.

^۳گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

عبدالحسین روستایان، گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
arustaiyan@yahoo.it

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۲

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۱۹

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Piroozmand S, Mousavi Z, Mirzaei Z, Rustaiyan AH. Investigation of chemical composition of *Helichrysum artemisioides* essential oil, and its antibacterial and cytotoxic effects on colon cancer cell line and analysis of apoptotic gene expression using PCR method. Qom Univ Med Sci J 2018;12(3):9-18. [Full Text in Persian]

مقدمه

گیاهان دارویی جزء منابع بالقوه‌ای هستند که از نظر طب سنتی حایز اهمیت بوده و از دیرباز خواص درمانی و دارویی آن‌ها مورد توجه محققین بوده است (۱). در واقع، گیاهان دارویی مخازن غنی از متابولیت‌های ثانویه و مؤثره دارویی هستند که کمتر از ۱٪ وزن خشک گیاه را تشکیل می‌دهند. یکی از این ترکیبات دارای خواص دارویی، اسانس‌های گیاهی می‌باشد (۲،۳). اسانس گیاهان دارویی، ترکیبات فرار و معطری هستند که در اندام‌های مختلف گیاه وجود دارند و یکی از نقش‌های آن محافظت از گیاه در برابر عفونت‌های میکروبی است (۴،۵). دلیل اصلی تشکیل اسانس‌ها به خوبی مشخص نیست، ولی این ترکیبات به‌طور کلی بازمانده‌های ناشی از فرآیندهای اصلی متابولیسم گیاهان بوده که تحت تأثیر تنش‌ها قرار دارند و از نظر شیمیایی همگن نبوده و به‌اشکال مختلف اغلب با منشأ ترپنی مشاهده می‌شوند (۶،۷). سالیان درازی است که خواص ضد میکروبی و ضدسرطانی اسانس‌ها در حال بررسی است، همچنین تمایل محققان طی این سال‌ها جهت شناسایی ترکیبات سازنده اسانس‌های گیاهی و اثرات بیولوژیکی آن‌ها مانند اثرات ضدسرطانی بیشتر شده است (۸،۹). مطالعات نشان می‌دهند سرطان عامل اصلی مرگ‌ومیر در کشورهای پیشرفته بوده و تا چندسال آینده نیز تخمین زده می‌شود میزان شیوع آن به چند برابر برسد (۱۰). سرطان کولون به رشد بیش از حد سلول‌های روده بزرگ گفته می‌شود که ممکن است به بافت‌های دیگر هم متاستاز دهد. مطالعات اپیدمیولوژیک نشان داده است سرطان کولون سالانه باعث مرگ بسیاری از افراد در کل جهان می‌شود و این نوع سرطان در مردان پس از سرطان ریه به‌عنوان شایع‌ترین نوع سرطان شناخته شده است (۱۱،۱۲). برای درمان سرطان از روش‌هایی مانند جراحی، پرتودرمانی و شیمی‌درمانی استفاده می‌شود؛ درحالی‌که این نوع سرطان به اکثر داروها مقاوم بوده و درمان آن با موفقیت چندانی همراه نبوده است (۱۳). یکی از روش‌هایی که اخیراً مطالعات زیادی بر روی آن انجام شده، استفاده از گیاهان و اسانس‌های آن‌ها برای درمان سرطان است، محققان نیز در حال یافتن ترکیبات دارویی با منشأ گیاهی بدون اثرات جانبی هستند (۱۴). همچنین از نقطه‌نظر بالینی، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها

جهت درمان بیماری‌های باکتریایی منجر به پیدایش ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک شده که هر روز بر تعداد آن‌ها افزوده می‌شود (۱۵). پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تلاش برای یافتن به عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌کند. به‌منظور دستیابی به ترکیبات ضد میکروبی جدید، از ترکیبات طبیعی مانند اسانس گیاهان دارویی استفاده می‌شود. هزینه پایین تولید و عدم بروز مشکلات زیست‌محیطی از جمله مزایایی است که گیاهان دارویی را به‌عنوان یکی از کاندیداهای مناسب برای مهار سویه‌های باکتریایی معرفی کرده است (۱۶). گیاه گل بی‌مرگ (*Helichrysum artemisioides*) از گیاهان بومی کشور در استان مرکزی بوده و از خانواده آستراسه است. این گیاه علفی چندساله با ارتفاع ۴۰-۱۵ سانتی‌متر، در ماه‌های خرداد تا مرداد به گل‌دهی می‌رسد. این گیاه منبع با ارزشی از ترکیبات ثانویه بوده که از آن می‌توان جهت درمان سنگ کلیه، اختلالات ادراری، دل‌درد، یرقان، اسهال و تنگی نفس استفاده کرد (۱۷،۱۸).

تاکنون مطالعه‌ای در زمینه بررسی ترکیبات شیمیایی و اثرات بیولوژیک اسانس گیاه *H. artemisioides* انجام نشده است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس گیاه *H. artemisioides*، اثرات ضدباکتریایی، سمیت سلولی و آپوپتوز بر روی رده سلول سرطانی روده بزرگ (HT29)، همچنین آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bcl2* و *Bax* در سلول‌های HT29 انجام شد.

روش بررسی

در این مطالعه تجربی، ابتدا گیاه *H. artemisioides* از مرکز ذخایر زیستی ایران تهیه گردید، سپس مواد گیاهی جمع‌آوری شده پس از تمیز شدن، در سایه خشک و به‌وسیله آسیاب پودر شده و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شدند. جهت استخراج اسانس گیاه، از روش تقطیر با آب و دستگاه اسانس‌گیری کلونجر استفاده شد؛ بدین ترتیب که ابتدا ۱۰۰ گرم از برگ خشک گیاه خرد و به بالن ۲ لیتری کلونجر منتقل گردید و مقدار ۱ لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. عملیات اسانس‌گیری به‌مدت ۴ ساعت ادامه یافت. در خلال عملیات، اسانس گیاه به‌علت فرار بودن همراه بخار آب تقطیر و در لوله جمع‌آوری‌کننده کلونجر، جمع‌آوری شد.

سپس رقت‌های متوالی از اسانس گیاه *H. artemisiodes* در محدوده غلظت از ۳/۹-۵۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر (۳/۹، ۷/۸، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰) تهیه گردید. در ادامه، پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به کمک توزیع ۹۵ میکرو لیتر از محیط مولر هینتون براث، ۵ میکرو لیتر از تلقیح میکروبی و ۱۰۰ میکرو لیتر از اسانس با غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت. چاهک آخر شامل ۹۵ میکرو لیتر محیط مولر هینتون براث با ۵ میکرو لیتر از باکتری‌های منتخب در هر ردیف به منزله نمونه شاهد در نظر گرفته شد. محتویات هر چاهک روی شیکر (به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰ rpm) مخلوط شده، سپس در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از این مدت، میزان رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانده شد و میزان MIC تعیین گردید. سلول‌های رده سلولی سرطان کولون (HT29 cell line) و نرمال L929 از بخش کشت سلولی انستیتو پاستور ایران به صورت فلاسک تهیه و در محیط کشت RPMI₁₆₄₀ (Biosera, USA) با pH=۷/۳ کشت داده شد. لازم به ذکر است محیط کشت RPMI₁₆₄₀ با نسبت ۲۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر پنی سیلین G، استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) غنی شده بود. به منظور انجام

تست سمیت سلولی اسانس گیاه

H. artemisiodes روش MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) به کار برده شد. به طور خلاصه، تعداد ۵ هزار سلول در هر چاهک ۹۶ تایی پلیت سلولی اضافه شد و غلظت‌های ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر از اسانس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT29) و نرمال L929 افزوده شد.

بعد از گذشت مدت زمان مورد نظر، محلول رویی محیط کشت دور ریخته شد و سلول‌ها با رنگ MTT (محلول ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در PBS) به مدت ۴ ساعت تحت شرایط دی‌اکسید کربن ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از محلول‌سازی فرمازان با ۱۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفو کساید، جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر به وسیله دستگاه قرائت خوان الایزا (ELISA reader, Oraganon Teknika) ساخت هلند) خوانده شد.

باتوجه به اینکه چگالی اسانس از چگالی آب کمتر است؛ بنابراین اسانس استخراج شده روی فاز آبی قرار گرفت و به راحتی به وسیله شیر تخلیه جداسازی شد. عمل آگیری از اسانس به دست آمده با سولفات سدیم بدون آب (Na₂SO₄) انجام گرفت. از آنجایی که اسانس‌ها نسبت به نور، اکسیژن و دما حساسند و در چنین شرایطی ترکیبات آن‌ها دچار تغییر و تحول می‌شود؛ لذا بلافاصله اسانس استخراج شده به یک شیشه تیره در بسته منتقل و تا مراحل بعدی کار در یخچال نگهداری شد. به منظور جداسازی و شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه *H. artemisiodes* از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل شده به طیف‌سنج جرمی GC/MS (مدل Agilent 6890، ساخت کشور آمریکا) استفاده گردید. طول ستون ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر بود و برای ردیابی از سامانه پونیزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد. برنامه حرارتی دستگاه به این صورت بود که دما از ۵۰ درجه سانتیگراد شروع و تا ۲۵۰ درجه سانتیگراد ادامه پیدا می‌کرد. از حامل هلیوم ۹۹/۹۹٪، مقدار تزریق ۱ میکرو لیتر و سرعت جریان گاز ۱۵ میلی لیتر در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱ میکرو لیتر از اسانس گیاه به دستگاه GC/MS تزریق شد، سپس نتایج به دست آمده از دستگاه، بر اساس اندیس کواتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی شناسایی گردید. برای شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه *H. artemisiodes* از سطح زیرپیک GC/MS و اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی (National Institute Standard and Technology) NIST استفاده شد.

در این مرحله، خاصیت ضد میکروبی اسانس با روش حداقل غلظت مهارتی (MIC) بررسی گردید. MIC به کمترین غلظت از ترکیبات که رشد میکروارگانیسم را مهار می‌کند، اطلاق می‌گردد. در این مطالعه، از باکتری‌های

Staphylococcus aureus ATCC 29213
Listeria monocytogenes ATCC 35152
Salmonella typhimurium ATCC 14028 و *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 استفاده شد. بدین منظور، ابتدا باکتری‌های مدنظر در محیط کشت مایع (به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) انکوبه و در پی آن با استفاده از لوله ۰/۵ مک فارلند رقیق شدند.

سپس رنگ MTT، جداسازی و کریستال‌های فورمازان تولید شده با سلول‌های زنده در ایزوپروپانول حل شدند. در نهایت، میزان کشندگی سلول به کمک فرمول زیر محاسبه گردید.

= میزان بقای سلولی
 ×۱۰۰ (جذب نوری سلول‌های کنترل/ جذب نوری سلول‌های تیمار شده)
 همچنین میزان دوز ۵۰٪ کشندگی
 (Half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) نیز محاسبه شد.

به منظور بررسی میزان بیان ژن‌های آپتوزی *Bax* و *Bcl2* در سطح mRNA، از روش Real Time PCR استفاده گردید؛ بدین ترتیب که ابتدا کل RNA سلول‌های تحت تیمار و غیر تیمار با عصاره، با کیت استخراج RNA (کیژن، امریکا، طبق دستورالعمل آن)، استخراج شدند، سپس غلظت آن به وسیله دستگاه نانودراپ (IMPLEN GmbH، ساخت آلمان) تعیین گردید. در پی آن، برای سنتز cDNA از مولکول‌های RNA استخراج شده، از کیت Revert Aid™ First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas، لیتوانی) به صورت: ۵ میکرولیتر بافر ۵x، یک میکروگرم RNA، ۰/۵ میکرولیتر پرایمرهای Random hexamer، ۰/۵ میکرولیتر از پرایمر Oligo dT، ۲ میکرولیتر dNTPs، ۱ میکرولیتر RNase inhibitor، ۱ میکرولیتر Reverse Transcriptase (۲۰ واحد بر میکرولیتر) و آب مقطر ۲ بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر) استفاده گردید. در سنتز cDNA، از برنامه دمایی ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتیگراد و ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد استفاده شد. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف *Bcl2*، *Bax* بود و ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای رفت و برگشتی ژن هدف *Bax* به صورت 5'- TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG -3' و 5'- AGCTTCTTGGTGGACGCATC -3' بودند.

همچنین توالی آغازگرهای رفت و برگشت ژن هدف *Bcl2* به صورت 5'- TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC -3' و 5'- CAGCCAGGAGAAATCAAACAGAG -3' و برای ژن مرجع *GAPDH* به صورت 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' رفت، و 5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشتی بود. در نهایت برای بررسی بیان ژن‌ها، روش Real Time PCR (Bioneer، کره) به کار برده شد (۲۶).

نتایج حاصل در این مطالعه با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ و آنالیز واریانس (با اندازه‌گیری‌های مکرر) تحلیل شدند. سطح معنی‌داری، $p < 0.05$ در نظر گرفته شد. تمامی تست‌ها به صورت ۳ بار تکرار انجام گرفت.

یافته‌ها

آنالیز کروماتوگرام GC-MS اسانس گیاه *H. artemisiodes*، ۵۵ پیک را نشان داد که نشان‌دهنده وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه بود. در مقایسه طیف‌ها با اطلاعات کتابخانه NIST، ۵۵ ترکیب شیمیایی شناسایی گردید. از میان ترکیبات شناسایی شده، Carvacrol (12/585%) و 1R- α -Pinene (12/5%) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل‌دهنده بودند.

نتایج حاصل از بررسی میزان اثرات ضدباکتریایی اسانس علیه باکتری‌های *S. typhimurium*، *S. aureus*، *L. monocytogenes* و *P. aeruginosa* نشان داد این اسانس، بیشترین تأثیر را روی باکتری‌های گرم مثبت (*S. aureus* و *L. monocytogenes*) و کمترین را بر روی دو باکتری دیگر که گرم منفی بوده‌اند، داشته است (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱. نتایج MIC اسانس گیاه *H. artemisioides* در سوبه‌های باکتریایی منتخب

نام باکتری	(میلی گرم بر میلی لیتر) MIC
سالمونلا تیفی موریوم	۶۲/۵
سودوموناس آتروژینوزا	۱۵/۶۲
استافیلوکوکوس اورئوس	۷/۸
لیستریا مونوسیٹونز	۷/۸

زمان ۲۴ ساعت و غلظت ۰/۷۸ میلی گرم، کمترین تأثیر را بر روی سلول‌ها داشته است که از لحاظ آماری در مقایسه با گروه کنترل معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). همچنین میزان IC50 این اسانس در مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۳۱/۵، ۶/۰۸ و ۲/۹ میلی گرم بر میلی لیتر بود. با مقایسه این یافته‌ها می‌توان نتیجه گرفت بیشترین میزان سمیت سلولی اسانس مربوط به غلظت ۱۰۰ میلی گرم در زمان ۷۲ ساعت بوده و کمترین تأثیر بر روی سلول را این اسانس در زمان ۲۴ ساعت داشته است (جدول شماره ۲).

بررسی میزان سمیت سلولی اسانس با استفاده از روش MTT در غلظت‌های ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بر روی رده سلولی HT29 انجام گرفت و داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر آنالیز شدند. نتایج حاصل از مقایسه تست سمیت سلولی بین غلظت‌های مختلف اسانس در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در رده سلولی HT29 نشان داد اسانس در مدت زمان ۷۲ ساعت و غلظت ۱۰۰ میلی گرم، بیشترین تأثیر سمیت سلولی را داشته ($p < 0.0001$) و در مقابل، در مدت

جدول شماره ۲. اثر غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *H. artemisioides* بر روی رده سلولی HT29

زمان ساعت	۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۳/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر
۲۴	۹۴/۵±۰/۲	۸۹±۰/۵	۸۰±۰/۷	۶۸/۵±۰/۴	۶۰/۵±۰/۳	۵۳/۷±۰/۲	۴۰/۵±۰/۵	۳۲/۷±۰/۴
۴۸	۸۵/۳±۰/۶	۷۲/۵±۰/۴	۶۶/۵±۰/۵	۵۰/۵±۰/۵	۳۹/۵±۰/۳	۳۱±۰/۳	۲۰/۷±۰/۳	۱۶/۷±۰/۲
۷۲	۷۳/۲±۰/۴	۵۹/۵±۰/۲	۵۱/۲±۰/۳	۴۱/۵±۰/۳	۲۹/۵±۰/۵	۲۳±۰/۴	۱۰/۸±۰/۲	۱/۷±۰/۱

نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. (* $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$).

درحالی‌که در غلظت‌های کمتر از ۱۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر نسبت به گروه کنترل، اختلاف معنی‌داری را نشان نداد و از نظر آماری معنی‌دار نبود ($p > 0.05$) (جدول شماره ۳). لازم به ذکر است میزان IC50 این اسانس در رده سلولی L929 در مدت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت به ترتیب برابر با ۲۲۵، ۱۸۶ و ۱۵۷ میلی گرم بر میلی لیتر بود.

تیمار سلول‌های نرمال L929 با غلظت‌های مختلف اسانس ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲۵، ۶/۲۵، ۱۲، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر با استفاده از تست MTT طی مدت زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انجام شد. همچنین اسانس در غلظت ۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر، بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشت و اختلاف فاحشی با گروه کنترل نشان داد که از لحاظ آماری معنی‌دار بود ($p < 0.001$).

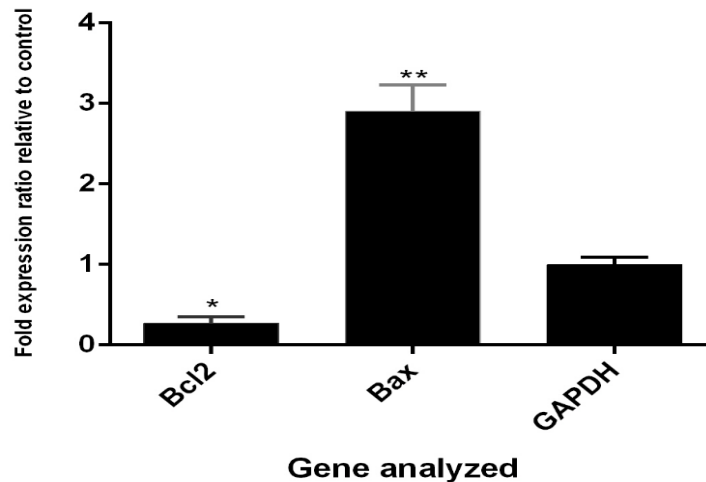
جدول شماره ۳. اثر غلظت‌های مختلف اسانس گیاه *H. artemisioides* بر روی رده سلولی L929

زمان ساعت	۰/۷۸ میلی گرم بر میلی لیتر	۱/۵۶ میلی گرم بر میلی لیتر	۳/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۶/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر	۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر	۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر	۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر
۲۴	۹۷/۲±۰/۲	۹۴±۰/۲	۹۲/۲±۰/۳	۹۱/۷±۰/۴	۸۸±۱/۳	۸۱/۷±۰/۷	۷۴±۰/۵	۶۳/۷±۰/۶
۴۸	۹۸/۳±۰/۸	۹۳/۲±۱/۱	۹۱/۲±۰/۶	۹۰±۰/۹	۸۷±۰/۹	۷۸/۷±۰/۸	۷۰/۵±۰/۶	۵۹±۰/۷
۷۲	۹۵±۰/۹	۸۸/۷±۰/۹	۸۶/۲±۰/۷	۸۴/۵±۰/۸	۸۱±۰/۵	۷۴/۲±۰/۷	۶۵±۰/۵	۵۴±۰/۶

نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل و به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. $p < 0.05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. (* $p < 0.05$ ، ** $p < 0.01$ ، *** $p < 0.001$).

نتایج Real Time PCR نشان داد ژن‌های *Bax* و *Bcl2* نسبت به ژن مرجع در رده سلولی سرطانی کولون تیمار شده طی ۲۴ ساعت به میزان $۲/۹ \pm ۰/۲$ ($p < ۰/۰۵$) افزایش و $۰/۲ \pm ۰/۷$ ($p < ۰/۰۵$) کاهش داشته‌اند (نمودار).

بررسی میزان القای بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در سلول‌های سرطانی کولون (HT29) تیمار شده با غلظت IC50 اسانس با استفاده از روش Real Time PCR بعد از ۲۴ ساعت ارزیابی شد.



نمودار: میزان بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* نسبت به ژن کنترل (*GAPDH*).

نسبت بیان ژن‌های *Bax* و *Bcl2* به ژن کنترل در رده سلولی سرطانی کولون تیمار شده طی ۲۴ ساعت به میزان $۲/۹ \pm ۰/۲$ ($p < ۰/۰۵$) افزایش و $۰/۲ \pm ۰/۷$ ($p < ۰/۰۵$) کاهش یافته است.

بحث

از نقطه نظر طب سنتی، استفاده از عصاره و اسانس‌های گیاهی جهت درمان عفونت‌های باکتریایی و سرطانی، همچنین شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده آن‌ها از دیرباز حایز اهمیت بوده و انجام مطالعات اخیر در جهت جایگزین کردن ترکیبات طبیعی به جای داروهای شیمیایی جهت درمان بیماری‌ها می‌باشد (۱۹). در این مطالعه یکی از گیاهان بومی کشور به نام *H. artemisiodes* جهت بررسی ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آنالیز شیمیایی اسانس این گیاه به وسیله روش GC-MS، ۵۵ ترکیب را نشان داد که از میان ترکیبات شناسایی شده، دو ترکیب Carvacrol (12/585%) و IR- α -Pinene (12/5%) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل‌دهنده اسانس بودند. Carvacrol یک ترکیب شیمیایی با جرم مولی ۱۵۰/۲۱۷ گرم برمول، از خانواده ترکیبات فنولی و مونوترپنی می‌باشد. این ترکیب به عنوان جزء مهم ترکیب موجود در اسانس‌های برخی از گیاهان خانواده آستراسه، دارای خاصیت ضدباکتریایی است (۲۰). IR- α -Pinene نیز از ترکیبات شیمیایی مهم اسانس‌های گیاهی به فرمول $C_{10}H_{16}$ می‌باشد.

مطالعات نشان می‌دهد این ترکیب دارای طیف میکروبی کشی وسیعی است (۲۱). مطالعات مختلفی در زمینه بررسی ترکیبات شیمیایی جنس *Helichrysum* انجام شده است. Javidnia و همکاران ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *Helichrysum leucocephalum* Boiss. را با روش GC-MS شناسایی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد (22/3%) Rosifoliol، (10/1%) β -caryophyllene و (9%) α -humulene بیشتر ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس بوده‌اند (۲۲). Mastelić و همکاران ترکیبات شیمیایی اسانس گیاه *H. italicum* را با روش GC-MS شناسایی کردند. نتایج این مطالعه نشان داد (12/8%) alpha-pinen و (11/1%) 2-methyl-cyclohexyl pentanoate، بیشترین ترکیبات موجود در اسانس این گیاه بوده‌اند (۲۳). با توجه به نتایج این پژوهش و سایر مطالعات به نظر می‌رسد یکی از دلایل تفاوت ترکیبات شیمیایی اسانس‌های گیاه یک جنس می‌تواند به علت نوع منطقه جغرافیایی و محل رشد این گیاه باشد. یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس گیاه *H. artemisiodes* بر روی برخی از باکتری‌های پاتوژن بود.

Afoulous و همکاران، اثرات سمیت سلولی اسانس گیاه *Helichrysum gymnocephalum* را روی رده سلولی سرطان سینه مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد اسانس این گیاه دارای اثرات چشمگیر ضدسرطانی علیه این سلول است (۲۸). Bigović و همکاران با بررسی اثرات ضدسرطانی اسانس گیاه *Helicrysum plicatum* بر روی سه رده سلول سرطانی رحم، پروستات و کبد نشان دادند بین اسانس این گیاه با خاصیت سمیت سلولی، ارتباط معنی داری وجود دارد (۲۹). در واقع، نتایج مطالعه حاضر در زمینه اثرات سمیت سلولی اسانس گیاه *H. artemisioides* با سایر مقالات منتشره همخوانی داشت.

یکی دیگر از اثرات بیولوژیک اسانس های گیاهی، القای آپوپتوز در مرگ سلولی است. به طور کلی، القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی یکی از رویکردهای جذاب در درمان سرطان به شمار می رود. مسیر مرگ سلولی می تواند شامل فعال سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشای اندامک میتو کندری به وسیله پروتئین های *Bax* و *Bak* شروع شده و موجب آزادسازی سیتوکروم c از آن و در نهایت، فعال شدن کاسپاز - ۹، سپس کاسپاز - ۳ می شود. علاوه بر این، پروتئین های *Bcl2* و *Bclxl* با قرار گرفتن در سطح شبکه اندوپلاسمی، میتو کندری و هسته، از کنار هم قرار گرفتن پروتئین های *Bax* و *Bak* جلوگیری کرده و فعالیت آپوپتوزی نشان می دهند. در این مطالعه دو ژن مهم درگیر با فرآیند آپوپتوز (*Bax* و *Bcl2*) در سلول های تیمار شده با اسانس بررسی شدند (۳۰). در مطالعه حاضر سمیت سلولی سلول های سرطانی کولون (HT29) مرتبط با فرآیند آپوپتوز بود که نتیجه امیدوارکنندگی داشت. همچنین در این مطالعه اثرات اسانس گیاه در افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک *Bax* و کاهش بیان ژن *Bcl2* در سلول های سرطانی کولون و القای مرگ برنامه ریزی شده سلولی نشان داده شد؛ بنابراین بررسی های بیشتری لازم است تا بتوان اثبات کرد "آیا پروفایل بیانی mRNA این ژن ها می تواند مدرکی برای نقش آن در پیشگویی اختصاصی و دقیق تر پاسخ سرطان به درمان باشد؟" باید توجه داشت بیشتر مطالعات سال های اخیر در جهت یافتن داروهای ضدسرطانی است تا بتوان با استفاده از این داروها آپوپتوز را در سلول های سرطانی القا و بدون ایجاد التهاب آنها را فاگوسیته کرده و در نهایت از بین برد.

در مطالعه حاضر اسانس گیاه مدنظر، بیشترین تأثیر را بر روی باکتری های گرم مثبت داشت. با توجه به تعداد ترکیبات شیمیایی شناسایی شده در این گیاه، نمی توان مکانیسم واحدی برای اثرات ضدباکتریایی آن در نظر گرفت؛ بلکه آن ها اهداف متعددی را در سلول باکتری خواهند داشت. یکی از ویژگی های اسانس ها و اجزای تشکیل دهنده آن ها، خاصیت آب گریزی است که موجب نفوذ این مواد به لپیدهای غشای سلول باکتری شده و سبب اختلال در ساختمان سلولی و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می گردد. این مسئله موجب خروج، نشت یون ها و دیگر محتویات سلولی می شود (۲۴). به طور کلی، هر چه مواد فنولیک دارای ساختارهای حلقه ای عامل دار، بیشتر باشد، خواص ضدباکتریایی آن ها نیز بیشتر است (۲۵). از میان ۵۵ ترکیب شناسایی شده از اسانس گیاه *H. artemisioides*، به نظر می رسد ترکیباتی مانند 1R- α -Pinene، Cyclohexene, 1-، Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl) (2-nitro-2-propenyl) و Carvacrol و 4-Terpeneol دارای اثرات ضدباکتریایی هستند.

به منظور بررسی اثرات سیتوتوکسیک اسانس گیاه *H. artemisioides* از روش MTT استفاده شد که نتایج نشان داد میزان اثرات سمیت سلولی اسانس، وابسته به دوز و زمان است؛ به طوری که در غلظت های بالاتر و در مدت زمان بیشتر، میزان سمیت سلولی بیشتر می شود. همچنین اسانس این گیاه دارای اثرات سمیت سلولی کمتری در سلول نرمال L929 نسبت به سلول سرطانی HT29 بود که به نظر می رسد اسانس این گیاه به علت وجود ترکیبان فنلی، به خصوص فلاونوئیدها اثر مهاری دارد. در واقع، اسانس این گیاه دارای ماهیت چربی دوست بوده و با عبور از عرض غشای سلولی، وارد سلول می شود. مطالعات نشان می دهند اسانس ها باعث تداخل با غشای میتو کندری، غشای سلولی و کانال های یونی می شوند و پتانسیل غشایی را برهم زده و در نهایت، باعث مهار پمپ پروتونی و تولید ATP می شوند (۲۶). برخی مطالعات نشان داده اند اسانس های گیاهی با تخریب پمپ های یونی غشایی منجر به نشت یون ها (کلسیم) و پروتئین های سلولی شده و آپوپتوز را القا می کنند (۲۷). مطالعات مختلفی اثرات سمیت سلولی اسانس گیاهان جنس *Helichrysum* را نشان داده اند.

نتیجه گیری

به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد اسانس گیاه *H. artemisioides* دارای اثرات بیولوژیک چشمگیر ضدباکتریایی و ضدسرطانی است. بنابراین، پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری در مورد خواص زیستی ترکیبات شناسایی شده انجام گیرد تا اهمیت پزشکی این گیاه بیشتر مشخص گردد و به عنوان یک ترکیب ضدسرطانی و ضدباکتریایی امیدبخش به مراکز دارویی پیشنهاد شود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی سپیده پیروزمند واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی است که از اردیبهشت تا مهرماه سال ۱۳۹۵ انجام گرفت. بدین وسیله از تلاش همکاران، به خصوص جناب آقای حسن نوربازرگان و تمام کسانی که در انجام این پروژه همکاری نموده اند، تشکر و قدردانی می نمایم.

References:

- Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 2012;6(11):1-5.
- Kong JM, Goh NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(1):7-21.
- Hossain MM. Therapeutic orchids: traditional uses and recent advances--an overview. *Fitoterapia* 2011;82(2):102-40.
- Hansen SC, Stolter C, Imholt C, Jacob J. Plant secondary metabolites as rodent repellents: A systematic review. *J Chem Ecol* 2016;42(9):970-83.
- Perricone M, Arace E, Corbo MR, Sinigaglia M, Bevilacqua A. Bioactivity of essential oils: A review on their interaction with food components. *Front Microbiol* 2015;6:76.
- Solórzano-Santos F, Miranda-Navales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2012;23(2):136-41.
- Bassolé IH, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. *Molecules* 2012;17(4):3989-4006.
- Radulović NS, Blagojević PD, Stojanović-Radić ZZ, Stojanović NM. Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Curr Med Chem* 2013;20(7):932-52.
- Tariq A, Mussarat S, Adnan M. Review on ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological evidence of Himalayan anticancer plants. *J Ethnopharmacol*. 2015;22;164:96-119.
- Migliore L, Migheli F, Spisni R, Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:792362.
- Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* 2016;13(1):120-35.
- Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. Molecular pathways in colorectal cancer. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27(9):1423-31.
- Sudhakar A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. *J Cancer Sci Ther* 2009;1(2):1-4.
- Greenwell M, Rahman PK. Medicinal plants: Their use in anticancer treatment. *Int J Pharm Sci Res* 2015;6(10):4103-12.
- Gillings MR, Paulsen IT, Tetu SG. Genomics and the evolution of antibiotic resistance. *Ann N Y Acad Sci* 2017;1388(1):92-107.

16. Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, et al. Natural products--antifungal agents derived from plants. *J Asian Nat Prod Res* 2009;11(7):621-38.
17. Leonardi M, Ambryszewska KE, Melai B, Flamini G, Cioni PL, Parri F, et al. Essential-oil composition of *Helichrysum italicum* (ROTH) G.DON ssp. *italicum* from Elba Island (Tuscany, Italy). *Chem Biodivers* 2013;10(3):343-55.
18. Antunes Viegas D, Palmeira-de-Oliveira A2, Salgueiro L3, Martinez-de-Oliveira J4, Palmeira-de-Oliveira R. *Helichrysum italicum*: from traditional use to scientific data. *J Ethnopharmacol* 2014;151(1):54-65.
19. Bhalla Y, Gupta VK, Jaitak V. Anticancer activity of essential oils: A review. *J Sci Food Agric* 2013;93(15):3643-53.
20. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. *J Anim Sci Biotechnol* 2015;6:58.
21. Rivas da Silva AC, Lopes PM, Barros de Azevedo MM, Costa DC, Alviano CS, Alviano DS. Biological activities of α -pinene and β -pinene enantiomers. *Molecules* 2012;17(6):6305-16.
22. Javidnia K, Miri R, Soltani M, Khosravi AR. Essential oil composition of two Iranian Endemic *Helichrysum* Miller. Species (*H. leucocephalum* Boiss. and *H. artemisioides* Boiss. et Hausskn.). *J Essent Oil Res* 2009;21(1):11-20.
23. Mastelić J, Politeo O, Jerković I. Contribution to the analysis of the essential oil of *Helichrysum italicum* (Roth) G. Don. Determination of ester bonded acids and phenols. *Molecules* 2008;13(4):795-803.
24. Freires IA, Denny C, Benso B, de Alencar SM, Rosalen PL. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: A systematic review. *Molecules* 2015;20(4):7329-58.
25. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods--a review. *Int J Food Microbiol* 2004;94(3):223-53.
26. Lesgards JF, Baldovini N, Vidal N, Pietri S. Anticancer activities of essential oils constituents and synergy with conventional therapies: A review. *Phytother Res* 2014;28(10):1423-46.
27. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem Toxicol* 2008;46(2):446-75.
28. Afoulous S, Ferhout H, Raelison EG, Valentin A, Moukarzel B, Couderc F, et al. *Helichrysum gymnocephalum* essential oil: chemical composition and cytotoxic, antimalarial and antioxidant activities, attribution of the activity origin by correlations. *Molecules* 2011;16(10):8273-91.
29. Bigović D, Savikin K, Janković T, Menković N, Zdunić G, Stanojković T, et al. antiradical and cytotoxic activity of different *helichrysum plicatum* flower extracts. *Nat Prod Commun* 2011;6(6):819-22.
30. Bilia AR, Guccione C, Isacchi B, Righeschi C, Firenzuoli F, Bergonzi MC. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014;2014:651593.