

ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی و سمیت سلولی عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ بر رده سلول سرطانی *Hela*

باقر سید علی پور^{۱*}، نسیمه دلفان آذری^۲، محمود اسدی^۳، مجتبی محسنی^۴

^۱استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
^۲کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
^۳استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، تنکابن، ایران
^۴استادیار، گروه زیست سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران
 *نویسنده مسئول: مازندران، دانشگاه مازندران، دانشکده علوم پایه، گروه زیست سلولی و مولکولی
 پست الکترونیک: b.alipour81@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: فرآورده‌های طبیعی استخراج شده از گیاهان دارویی می‌تواند نقش مهمی در درمان سرطان داشته باشد. این مطالعه به منظور بررسی فعالیت ضد باکتریایی و سمیت سلولی عصاره اتانولی *Lilium ledebourii* بر رده سلول سرطانی *Hela* طراحی گردید.

مواد و روش کار: در این مطالعه تجربی، عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ استخراج شد و سمیت سلولی آن بر رده سلولی *Hela* بررسی شد. رده سلولی *Hela* با غلظت‌های مختلف عصاره (۱۰-۱۱۵۶ میلی‌گرم بر لیتر) به مدت ۷۲ ساعت تیمار شد و برای بررسی مهار رشد، از آزمون *MTT* استفاده شد. همچنین فعالیت ضد باکتریایی عصاره این گیاه با روش انتشار از دیسک علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی انجام شد. نتایج حاصله توسط نرم‌افزار *SPSS* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد عصاره اتانولی در غلظت‌های مختلف، رشد سلول‌های *Hela* را بطور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داد. بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به میزان ۸۷/۴۲ درصد محاسبه شد. همچنین نتایج نشان داد عصاره اتانولی پیاز سوسن چلچراغ دارای فعالیت ضد باکتریایی است. در میان باکتری‌های مذکور، بیشترین فعالیت ضد باکتریایی عصاره علیه استافیلوکوکوس اورئوس و کمترین فعالیت علیه سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اتانولی گیاه سوسن چلچراغ دارای فعالیت ضد باکتریایی و سمیت سلولی علیه رده سلولی *Hela* می‌باشد. لذا به منظور پیدا کردن مکانیسم اساسی این فعالیت، تحقیقات بیشتری باید انجام شود.

واژه‌های کلیدی: *Lilium ledebourii*، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئروژینوزا، عصاره اتانولی، آزمون *MTT*، رده سلولی *Hela*

وصول: ۹۳/۱۱/۱۹

اصلاح: ۹۳/۱۲/۱۲

پذیرش: ۹۴/۲/۱۴

مقدمه

سرطان عامل بزرگی در مرگ و میر انسان ها بوده و درمان های امروزی آن اغلب چندان موثر نبوده و با اثرات جانبی نامطلوب همراه هستند. بنابراین با در نظر گرفتن عدم پاسخ مطلوب به درمان و رشد سریع بیماری تلاش برای یافتن دارو های موثرتر با سمیت کمتر ضروری است [۱].

به کمک پیشرفت‌های تکنولوژی در بیوانفورماتیک و تکنیک‌های مولکولی، اطلاعات زیادی بدست آمد که در تشخیص زودرس بیماری سرطان کمک خواهد کرد و همچنین غربالگری به موقع برای بعضی از سرطان ها کمک موثری در تشخیص زودرس آن می نماید. امروزه تلاش‌های فراوانی جهت یافتن روش‌های مناسب برای درمان این بیماری صورت پذیرفته که از آن جمله می‌توان به کشف داروهای جدید ضد سرطان که بیش از نیمی از آنها از گیاهان استخراج شده اند، اشاره نمود. در دهه‌های اخیر، گیاهان به عنوان یکی از منابع اصلی مواد فعال بیولوژیکی، برای تهیه داروهای طبیعی جهت درمان سرطان اهمیت جهانی پیدا کرده اند [۲]. عقیده بر این است که اثرات ضد سرطانی گیاهان از طریق مهار آنزیم-های محرک سرطان، کمک به ترمیم DNA، تحریک تولید آنزیم‌های ضد توموری در سلول، افزایش ایمنی بدن و القاء اثرات آنتی‌اکسیدانی ایجاد می‌شوند [۳]. سرطان گردن رحم ششمین سرطان شایع در بین همه انواع سرطان‌ها و دومین سرطان شایع در بین زنان است. سلول HeLa رده ای از سلول سرطانی انسانی است که در سال ۱۹۵۱ از سرطان گردن رحم جدا شد و اکنون در بسیاری از مطالعات بر روی سلول‌های سرطانی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴]. سلول‌های HeLa به عنوان نخستین رده سلولی انسانی شناخته شد که در مقایسه با سایر رده‌های سلولی دارای رشد برجسته و قابل توجهی می‌باشد [۵].

اگر چه درمان‌های رایج کنونی توانسته‌اند پیش آگهی مبتلایان به این سرطان را بهبود بخشند، اما بسیاری از این تومورها به اقدامات درمانی کنونی پاسخ نمی‌دهند. بنابراین در مورد سرطان گردن رحم نیز همانند سایر سرطان‌ها، تلاش برای یافتن داروهای مؤثرتر و با عوارض جانبی کمتر ادامه دارد.

درصد زیادی از مردم دنیا برای درمان بیماری ها تمایل به استفاده از دارو های سنتی دارند و این امر انگیزه ای شد تا عصاره گیاهی سوسن چلچراغ بعنوان یک گیاه بومی ایران برای درمان سرطان و عفونت باکتری بررسی شود. خانواده Liliaceae شامل حدود ۲۵۰ جنس و نزدیک به ۳۰۰۰ گونه گسترده در سراسر جهان هستند و اندام های زیرزمینی آنها پیاز، غده و یا ریزوم می باشد. سوسن چلچراغ با نام علمی *Lilium Ledebourii* (Baker) Boiss گونه ای کمیاب از گیاهان تیره سوسنیان می باشد. عامل ارتفاع برای رویش این گونه بسیار مهم است و تنها در ارتفاعات ۱۷۰۰ تا ۲۱۰۰ متر از سطح دریا و در شرایط وجود زمستانهای سخت می روید. تیمار سرمای حدود ۵ درجه سانتی گراد طی مدت تقریباً ۳ ماه برای پیاز این گیاه و توان رویش در فصل بهار ضروری است [۶].

ساپونین ها حاوی اگلیکون های تری تروپونیدی یا استروئیدی هستند که یک یا چند زنجیره قندی به آنها متصل می شوند. خصوصیات بیولوژیک ساپونین ها به آگلیکون ها و یا به تعداد واحد قندی وابسته است [۷، ۸]. ساپونین ها دترجنت غیر یونی متعلق به گروه گلیکوزیدهای هستند که دارای فعالیت سیتوتوکسیک، همولیتیک، ضد التهاب، ضد قارچ، ضد مخمر، ضد باکتری، ضد ویروسی می باشند [۹-۱۱]. خواص ضد سرطانی عصاره گیاه سیر *Allium sativum* از خانواده Liliacea وجود ساپونین ها و همچنین آلیسین که ترکیباتی با خواص ضدسرطانی اند مشخص شده است [۱۲]. مطالعات انجام شده نشان داد که ریزوم گیاه *Boiss* (Baker) *Lilium ledebourii* حاوی اسید های چرب لینولیک اسید - اولئیک اسید - پالمیتک اسید - استرولها (پیماریک اسید) و همچنین وجود ساپونین ها نیز در ریزوم این گیاه مشخص شده است [۱۳]. با توجه به وجود ترکیبات ساپونین در گیاهان خانواده Liliacea و خاصیت سیتوتوکسیک و ضد باکتری در گونه های مختلف جنس (*Lilium*) و عدم مطالعه بر گونه ی ایرانی جنس مذکور انجام مطالعات بر روی این گونه جالب توجه است. لذا بر آن شدیم تا عصاره اتانولی پیاز گونه بومی ایران (Baker) *Lilium ledebourii* Boiss را به منظور مهار رشد سلول های سرطانی (HeLa) در شرایط برون تنی توسط آزمون

رنگ سنجی MTT و همچنین فعالیت آنتی باکتریایی آن را مورد ارزیابی قرار دهیم.

روش کار

در این مطالعه تجربی، گیاه *Lilium (Baker) Boiss ledebourii* در اواخر خرداد ماه ۱۳۹۲ از منطقه ی رودبارک در شهرستان کلاردشت استان مازندران جمع آوری گردید. جهت عصاره گیری ابتدا فلس های پیازگیاه مورد نظر را جدا و پس از خشک شدن در معرض هوا، با استفاده از دستگاه آسیاب به صورت پودر در آمده و ۲۵ گرم از پودر در اتانول ۹۶ درصد خیسانده و در یک دوره حداقل سه روزه همراه با تحریک مکرر به منظور حل شدن ماده حل شونده در دمای اتاق نگهداری شد. پس از گذشت سه روز مخلوط عصاره و الکل با استفاده از کاغذ صافی صاف گردید و در نهایت با استفاده از دستگاه روتاری حلال اضافی تبخیر شد و آنچه باقی ماند به عنوان عصاره خالص در نظر گرفته شد و برای تهیه غلظت های مختلف استفاده شد. عصاره گیاه توسط ترازو حساس دیجیتال توزین گردید و بخاطر اینکه عصاره گیاه *(Baker) Boiss Lilium ledebourii* مستقیماً در محیط کشت RPMI-1640 حل نمی شد ابتدا ۴۸۰ میلی گرم عصاره گیاه بعد از توزین توسط ترازو حساس دیجیتال در ۱۰۰ میکرو لیتر حلال دی متیل سولفوکساید (DMSO) حل شد. میزان DMSO در محلول نهایی موجود در چاهک های کشت سلول کمتر از یک درصد محاسبه گردید. در ضمن DMSO تا غلظت کمتر از یک درصد فاقد سمیت است و غلظت این حلال از این حیث مهم می باشد. سپس در محیط کشت سلولی (RPMI-1640) رقت های مختلف مورد نیاز تهیه شد. رقت های به کار رفته در این تحقیق شامل ۰/۱۵۶، ۰/۳۱۲، ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر می باشند.

رده سلولی Hela (NCBI C115) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد و در محیط کشت مایع RPMI1640، حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاو غیر فعال شده (FBS)، پنی سیلین (۱۰۰ واحد در هر میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم در میلی لیتر) کشت داده شد. سلول ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در اتمسفر حاوی ۵ درصد CO₂ و ۹۵ درصد رطوبت در

فلاسک های استریل قرار گرفتند. محیط کشت های آماده در پلیت های ۹۶ تایی با تعداد سلول های ۳۰۰۰ ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت که سلول ها مورفولوژی طبیعی یافتند در معرض عصاره اتانولی در رقت های ۰/۱۵۶ تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفتند. همزمان نمونه کنترل فاقد عصاره نیز به صورت سه تایی مانند نمونه های حاوی عصاره در نظر گرفته شد. روش های متنوعی برای تخمین تعداد سلول بر اساس حضور یک آنزیم یا سوبسترای سلولی خاص یا جذب و سپس استخراج یک رنگ معرفی شده اند. در این آزمایش بررسی زنده بودن سلول ها توسط تست MTT (۵، ۴، ۳ دی متیل تیازول ۲ یل ۵، ۲ دی فنیل تترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. MTT افزوده شده به محیط کشت توسط فعالیت دهیدروناز سلول های زنده به رنگ فورمازان تبدیل می شود. چون محتوای دهیدروناز سلول های یک نوع نسبتاً ثابت است، میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول است. به طور خلاصه سلول ها به تعداد ۳ هزار در هر چاهک ۹۶ تایی پلیت سلولی قرار گرفت و پس از ۷۲ ساعت از اضافه کردن عصاره به سلول ها، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر MTT اضافه شد. سپس پلیت ها به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از گذشت ۴ ساعت پلیت ها از انکوباتور خارج گشته، محیط رویی آنها دور ریخته شده و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه گردید تا فورمازان حاصل حل گردد. پس از ۱۰ دقیقه و تکان دادن پلیت ها با استفاده از تکان دهنده پلیت، جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA Plate Reader خوانده شد. جهت مشاهده بررسی تغییرات مورفولوژیک سلول های Hela پس از تیمار با عصاره اتانولی در رقت های ۰/۱۵۶ تا ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر به مدت ۷۲ ساعت توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X مورد بررسی قرار گرفتند.

چاهک های حاوی سلول و بدون عصاره به عنوان چگالی نوری کنترل و چاهک های بدون سلول و تنها محیط RPMI1640 به همراه سرم جنین گاوی به عنوان Blank در نظر گرفته شد.

در صد حیات سلولی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\%OD = \frac{OD \text{ پلاک} - OD \text{ پلاک های تحت تاثیر عصاره}}{OD \text{ پلاک} - OD \text{ کنترل}} \times 100$$

با توجه به مقادیر جذب نوری بدست آمده بوسیله دستگاه ELISA-reader درصد مهار رشد مربوط به هر غلظت با بکارگیری فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 - \frac{OD \text{ برای هر گروه بیمار}}{OD \text{ برای گروه کنترل}} \times 100 = \text{درصد مهار رشد سلولی}$$

در نهایت داده‌ها پس از جمع آوری با استفاده از روش T-Students Test تجزیه و تحلیل شد. اختلاف در سطح احتمال کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ به روش انتشار از دیسک بررسی شد [۱۴]. میکروارگانیسم‌های استاندارد شامل دو باکتری گرم مثبت باسیلوس سوبتیلیس (PTCC 1156) و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) و دو باکتری گرم منفی اشیریشیا کلی (PTCC 1533) و سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 1707) بود. باکتری‌ها در محیط کشت مایع مولر-هینتون (مرک، آلمان) رشد داده شدند. سپس کشت متراکم و یکنواختی از باکتری‌ها به کمک سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک‌فارلند توسط سوآب پنبه‌ای استریل در سطح مولر-هینتون آگار (مرک، آلمان) تهیه شد. دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر (پادتن طب، ایران) و آغشته به ۳۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف (شامل ۵۰۰-۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره اتانولی حل شده در DMSO، به طور مجزا در سطح آگار قرار داده شد. از دیسک آغشته به ۳۰ میکرولیتر حلال DMSO به‌عنوان شاهد منفی و دیسک آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به‌عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، انکوبه شد. فعالیت ضد باکتریایی عصاره گیاهی با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) سنجیده شد.

برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره بر رده سلولی HeLa، تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش Student T-Test انجام و سپس با استفاده از نتایج حاصل از داده‌ها نمودارهای مربوطه توسط نرم افزار Excel رسم شده است. اختلاف در سطح احتمال کمتر از پنج صدم معنی‌دار در نظر گرفته شد. تجزیه و

تحلیل نتایج آزمون باکتریایی با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۶ و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه یا آنووا انجام شد. همچنین برای تعیین گروه‌های دارای اختلاف معنی‌دار از آزمون مقایسه میانگین LSD استفاده شد و اختلاف در سطح احتمال کمتر از پنج صدم معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

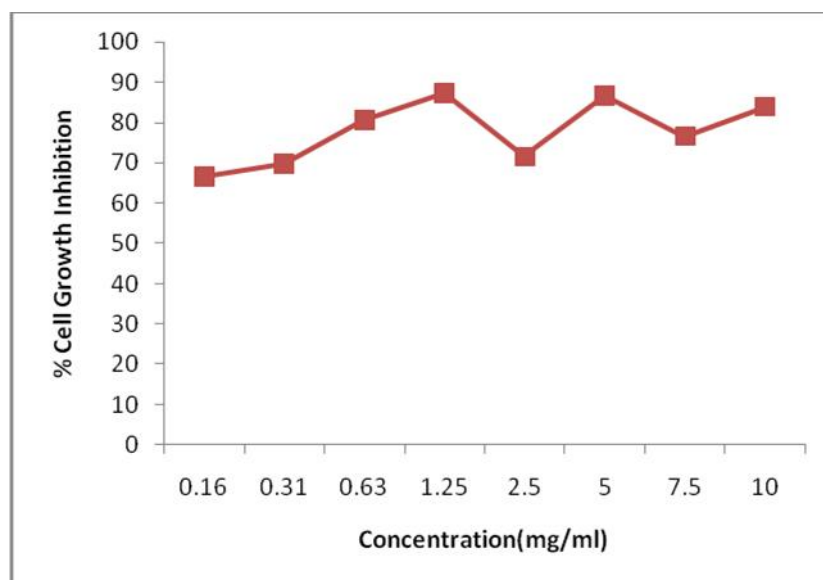
اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss بر رده سلول سرطانی HeLa برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی گیاه *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss (۱۰، ۷/۵، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲ و ۰/۱۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) غلظت‌های مورد نظر از عصاره تهیه شده و اثرات سمیت سلولی هر ترکیب با کمک روش MTT بر رده سلول‌های سرطانی HeLa مورد بررسی قرار گرفت. همان طوری که در جدول ۱ نشان داده شده است این عصاره دارای اثرات سمیت سلولی در غلظت‌های مورد نظر بر رده سلول سرطانی HeLa می‌باشد.

در این مطالعه فعالیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ در غلظت‌های مختلف به صورت هاله عدم رشد علیه باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی بررسی شد. همچنین از آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل به‌عنوان شاهد مثبت و حلال DMSO به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. همانطوری که در جدول ۲ مشاهده می‌شود نتایج حاصل از آزمون آنالیز واریانس نشان داد میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی در غلظت‌های مختلف عصاره گیاه سوسن چلچراغ یکسان نمی‌باشد. بطوریکه بر اساس آزمون مقایسه میانگین LSD، میانگین قطر هاله عدم رشد باسیلوس سوبتیلیس در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری را نشان داد و در بقیه غلظت‌ها میانگین قطر هاله عدم رشد این باکتری اثری مشاهده نشد. بر اساس آزمون مقایسه میانگین LSD، میانگین قطر هاله عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر

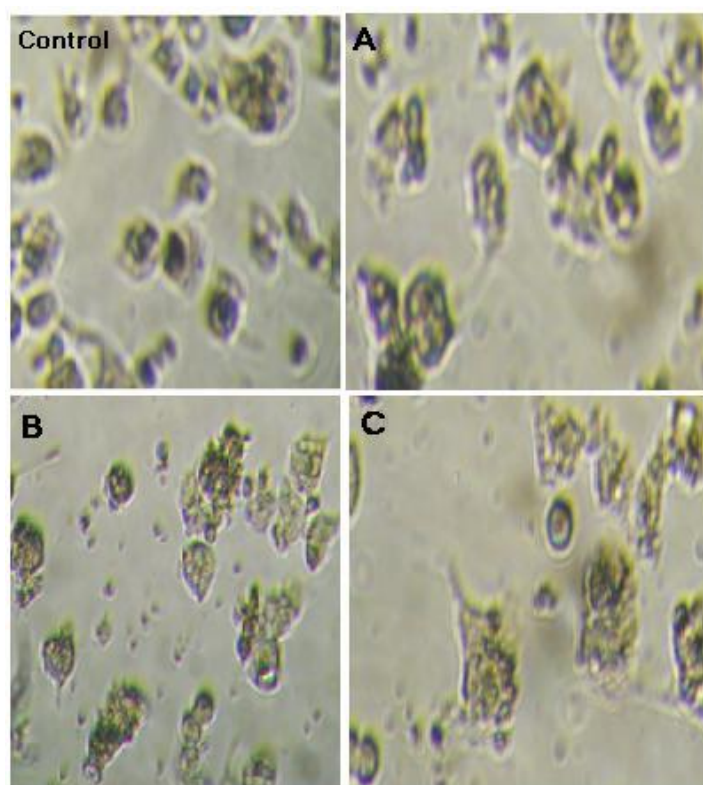
جدول ۱: اثر غلظت‌های مختلف عصاره گیاه *Lilium ledebourii* بر میزان جذب نوری و مهار رشد سلول‌های HeLa

Concentration (mg/ml) <i>Lilium ledebourii</i>	Absorbance	%Inhibition
۰/۱۵۶	۰/۲۳ ± ۰/۰۲۸	۶۶/۶۰
۰/۳۱۲	۰/۱۱۵ ± ۰/۲۴۱	۶۹/۹۲
۰/۶۲۵	۰/۰۷۶ ± ۰/۰۰۸*	۸۰/۶۶
۱/۲۵	۰/۱۱۰ ± ۰/۰۳۶*	۸۷/۴۲
۲/۵	۰/۱۰۷ ± ۰/۰۲۰	۷۱/۴۲
۵	۰/۸۴ ± ۰/۰۱۳*	۸۶/۶۴
۷/۵	۰/۰۶۷ ± ۰/۰۱۶*	۷۶/۶۵
۱۰	۰/۱۰۵ ± ۰/۰۲۷*	۸۴/۰۰
Control	۰/۰۶۹ ± ۰/۰۱۲	-
Blood	۰/۰۸۸ ± ۰/۰۱۴	۴۹/۷۸

مقادیر بدست آمده، به صورت Mean±SD می باشد و تفاوت میانگین‌ها در سطح (p<۰/۰۵) در نظر گرفته شد (* p<۰/۰۵). تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از روش Students T-Test انجام شد.



نمودار ۱: درصد مهار رشد سلولی عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ بر رده سلولی HeLa به وسیله آزمون MTT



شکل ۱: ارزیابی تغییرات مورفولوژیک رده سلولی HeLa بعد از ۷۲ ساعت تیمار شدن با غلظت های مختلف عصاره پیاز گیاه سوسن چلچراغ ۱/۲۵ mg/ml ، A= ۵ mg/ml ، B= ۱۰ mg/ml ، C= می باشند. ثبت مورفولوژی با میکروسکوپ نوری با بزرگ نمایی ۴۰ X پس از ۷۲ ساعت انجام شد.

جدول ۲: آزمون مقایسه میانگین LSD هاله عدم رشد (میلی متر) عصاره اتانولی گیاه سوسن چلچراغ در غلظت های مختلف بر علیه باکتری های سودوموناس آئروژینوزا، باسیلوس سوبتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس و اشیریشیا کلی (سه بار تکرار).

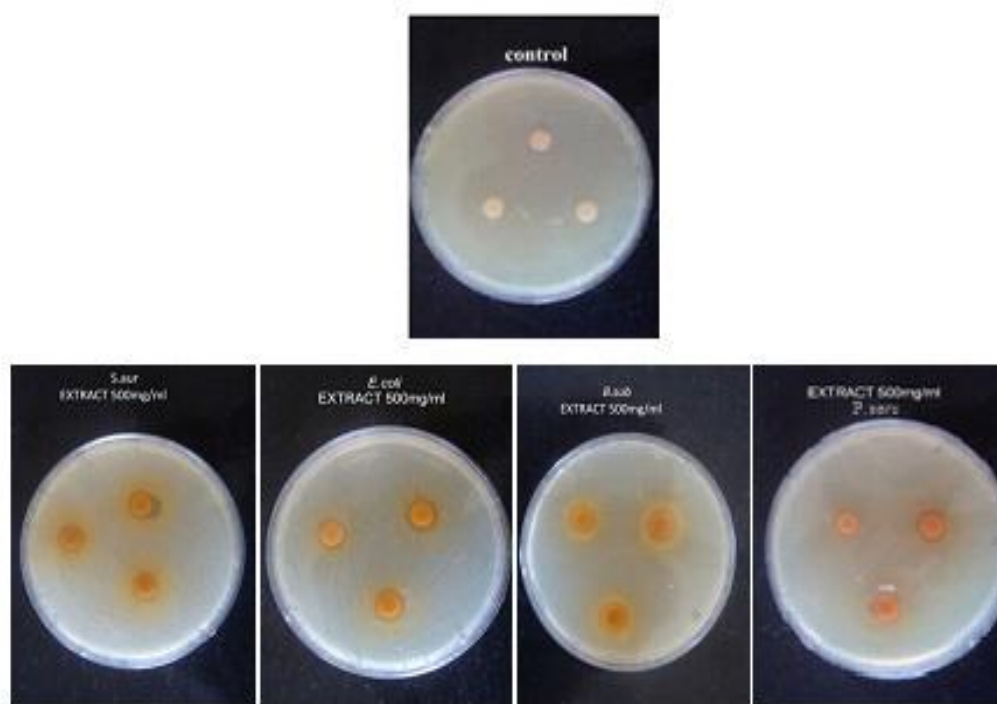
هاله عدم رشد (میلی متر)

باکتری

Chloramphenicol (30 µg/disc)	mg ml ⁻¹ ۱۰	mg ml ⁻¹ ۵۰	mg ml ⁻¹ ۱۰۰	mg ml ⁻¹ ۲۵۰	mg ml ⁻¹ ۵۰۰	
^a ۲۰/۶۶±۱	ب ت	^{ab} ۸/۳۳±۰/۵۷	^b ۸±۰/۵۷	^b ۷/۶۶±۰/۵۷	^a ۹/۳۳±۰/۵۷	اشیریشیا کلی
^a ۲۰/۳۳±۱	ب ت	ب ت	ب ت	^a ۹/۶۶±۰/۳	^a ۹/۶۶±۰/۳	باسیلوس سوبتیلیس
^a ۲۱/۶۶±۱	^{ab} ۸/۶±۲/۱۷	^{ab} ۸±۲/۱۷	^{ab} ۹±۲/۱۷	^b ۶±۲/۱۷	^a ۱۱/۳۳±۲/۱۷	استافیلوکوکوس اورئوس
ب ت	^{ab} ۴/۶۶±۲/۸	^b ۵±۲/۸۵	^b ۵±۲/۸۵	^a ۷/۶۶±۲/۸۵	^a ۸/۶۶±۲/۸۵	سودوموناس آئروژینوزا

ب ت: بدون تاثیر

میانگین هایی با حروف مشترک در هر ردیف اختلاف معنی داری با هم ندارند (p<۰/۰۵)



شکل ۲: هاله عدم رشد ایجاد شده توسط عصاره اتانولی به روش انتشار از دیسک علیه باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیاکلی، باسیلوس سوبتیلیس و سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر.

بحث

در این مطالعه با مواجهه کردن رده سلولی HeLa با غلظت های مختلف عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ مشاهده گردید که این عصاره به طور وابسته به غلظت می تواند موجب سمیت سلولی شود. در سال های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی برای مقابله با سرطان با توجه به عوارض جانبی کم و تاثیرات امید بخش مورد توجه واقع گشته است. مطالعات متعددی جهت بررسی اثرات ضد سرطانی و ضد میکروبی گیاهان دارویی بومی در کشورهای مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته است. دارو درمانی هنوز یکی از روش های مورد استفاده در درمان سرطان بوده و مراکز تحقیقاتی مختلف در دنیا و ایران در تلاش برای دستیابی به داروهای موثر با اثر انتخابی بر سلول های

بیشتر از سایر غلظت‌ها بود و نسبت به غلظت ۲۵۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری داشت ($p < 0.05$) در حالی که میانگین قطر هاله عدم رشد این باکتری در غلظت ۲۵۰ نسبت به ۱۰۰، ۵۰ و ۱۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌دار نداشت. بر اساس آزمون مقایسه میانگین LSD، میانگین قطر هاله عدم رشد سودوموناس آئروژینوزا در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر تفاوت معنی‌داری را نشان نداد اما با سایر غلظت‌ها تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($p < 0.05$). بر اساس آزمون مقایسه میانگین LSD، میانگین قطر هاله عدم رشد اشریشیا کلی در غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر در مقایسه با غلظت ۲۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0.05$).

همکارانش اثرات ساپونین‌ها را به تشکیل واکنش آنها با غشای سلولی نسبت دادند که باعث از بین رفتن غشای سلولی در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۸]. تحقیقات نشان داد ساپونین‌ها باعث آپوپتوز در سلول‌های سرطان معده در انسان می‌شوند و چرخه سلولی در سرطان سینه را در فاز G1 مهار می‌کنند. ساپونین‌ها چرخه سلولی را در سلول‌های سرطانی در مرحله G2/M مهار می‌کند و باعث القاء آپوپتوز در مسیرهای وابسته به میتوکندری می‌شوند [۱۹]. مطالعه فیتوشیمیایی بر روی پیاز گیاه *Lilium callosum* نشان داد که گلیکوزیدهای استروئیدی جدید به نام Callosum A و ساپونین‌های استروئیدی همانند Atropuroside A و Atropuroside B دارای فعالیت سایتوتوکسیک ضد سرطان می‌باشند [۲۰]. بنابراین وجود گلیکوزیدهای استروئیدی و ساپونین در گیاهان خانواده Liliaceae بخصوص در پیاز آن و همچنین تأیید فعالیت سایتوتوکسیک عصاره گیاهی بر رده سلول‌های MCF-7، MAD-MB43 و HeLa در گونه‌های دیگر این خانواده، در این تحقیق به این نتیجه رسیدیم اثر مهاری عصاره پیاز گیاه سوسن چلچراغ می‌تواند به علت وجود ترکیبات ساپونین و گلیکوزیدهای استروئیدی باشد.

در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی در زمینه اثرات ضد میکروبی گیاهان مختلف صورت گرفته است. در مطالعه حاضر بررسی تأثیر عصاره گیاه سوسن چلچراغ بر تعدادی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت انجام شد. پس از تأثیر عصاره گیاه *Lilium ledebourii* بر باکتری‌های مورد نظر، نتایج نشان داد که تمام باکتری‌ها به عصاره گیاه مورد نظر واکنش نشان داده و عصاره در غلظت‌های بالاتر، به میزان بیشتری از رشد باکتری‌ها جلوگیری کرده است و این تأثیر با افزایش غلظت عصاره به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد. بیشترین تأثیر عصاره مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس (گرم مثبت) است و کمترین تأثیر مربوط به سودوموناس آئروژینوزا (گرم منفی) می‌باشد. همانگونه که در نتایج مطالعه حاضر مشاهده شد عصاره اتانولی این گیاه اثرات قابل توجهی علیه باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سوبتیلیس نشان داد و فعالیت ضد باکتریایی عصاره بر باکتری‌های گرم

سرطانی و اثر کمتر بر سلول‌های سالم می‌باشند. در این راستا گیاهان دارویی منبع بسیار بزرگ و امید بخشی جهت کشف داروهای جدید می‌باشند. مطالعات نشان داد گیاهان متعلق به جنس *Lilium* دارای ترکیبات بسیار مفید و موثر می‌باشد که دارای خاصیت ضد سرطانی و ضد باکتریایی هستند. عصاره حاصل از گل‌ها و پیاز تازه و خشکیده گونه سوسن سفید *Lilium candidum* از خانواده Liliaceae دارای خواص درمانی برای سوختگی‌ها، رفع التهابات و همچنین بی‌نظمی‌های رحمی می‌باشد [۱۵]. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد عصاره اتانولی پیاز گیاه سوسن چلچراغ بر روی سلول‌های HeLa در غلظت ۱۰، ۷/۵، ۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری در سطح ۵ درصد نسبت به گروه کنترل، بعد از ۷۲ ساعت کاهش داده است (جدول ۱). همچنین دارای اثرات سمیت سلولی بر روی سلول‌های HeLa به ترتیب به میزان ۸۴/۰۰، ۷۶/۶۵، ۸۶/۶۴، ۷۱/۴۲، ۸۷/۴۲، ۸۰/۶۶، ۶۹/۹۲، ۶۶/۶۰ درصد می‌باشد. بالاترین درصد مهار رشد در غلظت ۸۶/۶۴ mg/ml به میزان ۸۷/۴۲٪ بوده است. به طور کلی نتایج نشان می‌دهد که عصاره اتانولی گیاه باعث مهار رشد سلول‌های HeLa شده است و رشد سلول‌ها را به طور معنی‌داری نسبت به گروه کنترل کاهش داده است (جدول ۱)، همچنین مشخص شده است که عصاره اتانولی *Lilium ledebourii* به طور وابسته به غلظت باعث مهار رشد این سلول‌ها شده، به طوری که با افزایش غلظت درصد مهار رشد افزایش پیدا کرده است (نمودار ۱). آنالیز فیتوشیمیایی گونه سوسن سفید *Lilium candidum* از خانواده Liliaceae حضور چندین نوع ساپونین در عصاره گل و پیاز را نشان داد [۱۵]. فریس^۱ و همکارانش برای اولین بار فعالیت ساپونین‌ها بر سلول‌های سرطانی را مطالعه و اعلام کردند که ساپونین‌ها فعالیت ضد سرطانی دارند [۱۶]. فرانسیس^۲ و همکارانش نشان دادند ساپونین‌ها فعالیت‌های فارماکولوژیکال دارند که باعث نفوذپذیری غشای سلول، تحریک آزاد شدن هورمون‌لوتئین و اثر سمیت سلولی روی سلول‌های توموری دارند [۱۷]. رن و

1 - Fries

2 - Francis

و هزینه پایین آن وارد کردن این مکمل گیاهی در رژیم غذایی ممکن است در درمان سرطان دهانه رحم و همچنین از بین بردن باکتری های مورد نظر موثر باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دوره کارشناسی ارشد خانم نسیم دلفان آذری با کد تصویب پروپوزال ۱۵۹۳۰۵۰۶۹۱۲۰۲۲ می باشد که با هزینه شخصی خودش به اتمام رسید. بدین وسیله از جناب آقای دکتر بهمن اسلامی که در جمع آوری و شناسایی نمونه و همچنین از کارشناس آزمایشگاه سرکار خانم محمدی که در کارهای آزمایشگاهی ما را یاری نمودند نهایت تشکر به عمل می آید.

منفی ضعیف تر بود به طوری که سودوموناس آئروژینوزا بیشترین مقاومت را نشان داد. این مقاومت احتمالا به حضور لیپوپلی ساکاریدها در دیواره سلولی باکتری های گرم منفی مربوط می شود و مانع از رسیدن ترکیبات فعال عصاره به غشاء سینتوپلاسمی باکتری گرم منفی می شود [۲۱]. تحقیقات پریسیلا^۱ و همکارانش نشان داد که باکتری های گرم منفی نسبت به عوامل شیمیایی مقاوم تر از انواع گرم مثبت ها هستند [۲۲]. این نتایج با نتایج بعضی محققان در ارتباط با عدم تاثیر عصاره گیاهی یا تاثیر کمتر برخی گیاهان بر رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا مطابقت دارد [۲۳، ۲۴]. همچنین بارلی^۲ و همکارانش گزارش کردند ساپونین اسخراج شده از گونه *Allium minutiflorum* دارای خواص ضد میکروبی بسیار بالایی می باشد [۲۵]. بنابراین خواص ضد میکروبی عصاره اتانولی را می توان به حضور متابولیت های ثانویه به خصوص فلاونوئیدها و ساپونین ها نسبت داد. ساپونین ها به علت داشتن خصوصیات فعال سطحی و به عنوان دترجنت غیر یونی در بخش های لیپیدی دیواره باکتری توزیع شده و موجب تغییر و تخریب ساختمان و نفوذپذیری بیشتر آن ها می شود و در نهایت منجر به مرگ باکتری می شود. بنابراین نتایج تحقیق حاضر موید آن است که فعالیت ضد میکروبی عصاره اتانولی گیاه سوسن چلچراغ وابسته به نوع میکروارگانیسم، غلظت عصاره و نوع ترکیبات موجود در پیاز است که با نتایج بسیاری از تحقیقات همخوانی دارد [۲۶].

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد عصاره اتانولی گیاه سوسن چلچراغ دارای اثرات سیتوتوکسیک بر رده سلول سرطانی Hela و همچنین اثرات ضد باکتری می باشد که این تاثیر در مورد باکتری گرم مثبت بیشتر از گرم منفی است. به نظر می رسد اثرات ضد سرطانی و ضد میکروبی عصاره اتانولی پیاز این گیاه مربوط به حضور متابولیت های ثانویه به خصوص گلیکوزید های استروئیدی، فلاونوئید ها و ساپونین می باشد. با توجه به طبیعی بودن فراورده گیاهی

1 - Priscila

2 - Baril

References

1. Srivastava V, Negi AS, Kumar JK, Gupta MM, Khanuja SP, Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads, *Bioorg Med Chem* 2005; 13(21):5892-908.
2. Singh P, Raj R, Kumar V, Mahajan M P, Bedi PMS, Kaur T ,“et al”, 1,2,3-Triazole tethered b-lactam-Chalcone bifunctional hybrids: Synthesis and anticancer evaluation, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2012; 47: 594-600.
3. Sakarkar DM, Deshmukh VN, Ethnopharmacological review of traditional medicinal plants for anticancer activity, *Int J Pharm Tech Res* 2011; 3(1):298-308.
4. Scherer WF , Syverton JT, Gey GO, Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses, IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix, *J Exp Med* 1953; 97(5):695-710.
5. Bentley GR, The Evolution of the human breast, *Am J Phys Anthropol*, 2001; 32:30.
6. Ghahreman A, Flora of Iran, Published by Research Institute of Forests and Rangelands (RIFR), Tehran, 1997; 16: No. 1944[Persian].
7. Sparg SG, Light ME, Van Staden J, Biological activities and distribution of plant saponins, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004; 94(2-3): 219-243.
8. Chwalek M, Lalun N, Bobichon H, Pl'e K, Voutquenne- Nazabadioko L, Structure-activity relationships of some hederagenin diglycosides: haemolysis, cytotoxicity and apoptosis induction, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006;1760(9): 1418-1427.
9. Leung YM, Ou YJ, Kwan CY, Loh TT, Specific interaction between tetrandrine and Quillaja saponins in promoting permeabilization of plasmamembrane in human leukemic HL-60 cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1997;1325(2): 318–328.
10. Sen S, Makkar HPS, Muetzel S, Becker K, Effect of Quillaja saponaria saponins and Yucca schidigera plant extract on growth of Escherichia coli, *Letters in Applied Microbiology*, 1998; 27(1): 35–38.
11. Bachran C, Sutherland M, Heisler I, Hebestreit P, Melzig MF, Fuchs H, The saponin-mediated enhanced uptake of targeted saporin-based drugs is strongly dependent on the saponin structure, *Experimental Biology and Medicine*, 2006;231(4): 412-420.
12. Rahman MM, Fazlic V , Saad NW, Antioxidant properties of raw garlic (*Allium sativum*) extract, *International Food Research Journal*, 2012; 19(2):589-591.
13. farsam H, Amanlou M , Amani Gh, Nezamivand Gh, Salehi M, Shafiee S ,anatomical and phytochemical study of *Lilium ledebourii*(Baker) Boiss ., a rare endemic species in iran, *Drug journal pharmaceutical science*, 2003; 11(4):) 164 - 170[Persian].
14. Kirby-Bauer, Susceptibility test with single, high-concentration antimicrobial disks, *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1979; 3(3):418-424.
15. Vachalkova A, Eisenreichova E, Mucaji P, Potential carcinogenic and inhibitory activity of compounds isolated from *Lilium candidum* L, *Neoplasma* 2000; 47: 313-318.
16. Fries SL, Standaert FG, Witcomb ER, Nigrelli RF, Chanley JD, Sobotka H, Some pharmacologic properties of holothurin A, a glicosidic mixture from the sea cucumber, *Ann N Y Acad Sci*.1960;90:893-901.
17. Francis G, Kerem Z, Makkar HP, Backer K, The biological action of saponins in animal systems: a review, *Br J Nutr*.2002;10(2):140-151.
18. Ren W, Qiao Z, Wang H, Zhu L, Zhang L, Flavonoids: Promising anticancer Agents, *Medicinal Research Reviews* 2003; 23(4):519-534.
19. Gutterman JU, Lai HT, Yang P, Haridas V, Gaikwad A, Marcus S, Effects of the tumor inhibitory triterpenoid avicin G on cell integrity, cytokinesis and protein ubiquitination in fission yeast, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005;102(36):12771–12776.
20. Wang X, Wu GU, A new steroidal glycoside and potential anticancer cytotoxic activity of compounds isolated from the bulbs of *Lilium callosum*, *Journal of Chemical Research* 2014; 38(10) : 577-638.
21. Olaleye M, Cytotoxicity and Antibacterial Activity of Methanolic Extract of *Hibiscus Sabdaviffa*, *J Med Plan Res* 2007;1(1):9-13.

22. Priscila G, Alzira MS, Thereza CV, chemical resistans of the gram negativ bacteria to different sanitizers in a water purification system, BMC Infectious Disease 2006; 6 : 131.
23. Duraipandiyan V, Ayyanar M, Ignacimuthu S, Animicrobial Activity of Some Ethnomedicinal Plants Used by Paliyar Tribe from Tamil Nadu, India, BMC Complement Altern Med 2006;6:35.
24. Mothana R, Lindequist U, Geraenert R, Bednarski P, Studies of the in Vitro Anticancer, Antimicrobial and Antioxidant Potentials of Selected Yemeni Medicinial Plants from the Island Soqotra, BMC Complement Altern Med 2009;9:7.
25. Baril E, Bonanomi G, Antignani V, Zolfaghari B, sajjadi E, Scala F and lanzotti V, Saponins from allium minutiflorum with antifungal activity, Phytochemistry 2006; 68 : 596-603.
26. Arabski M, W gierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W, Effects of Saponins against Clinical E. coli Strains and Eukaryotic Cell Line, Journal of Biomedicine and Biotechnology 2011; 2012: 286216- 286222.

Evaluation of antibacterial activity and cytotoxicity of ethanolic extract of *Lilium ledebourii* bulbs on HeLa cell line

Seyedalipour B^{1*}, Delfan-Azari N², Asadi M³, Mohseni M⁴

¹Assistant professor, Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

²MSc, Department of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

³Assistant professor, Department of Biology, Islamic Azad University, Tonekabon Branch, Tonekabon, Iran.

⁴Assistant professor, Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

*Corresponding Author: Department of Cellular and Molecular Biology, faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran

E mail: b.alipour81@gmail.com

Abstract

Background & Objectives: Natural products extracted from medicinal plants can play an important role in cancer treatment. This study was designed to investigate antibacterial activity and cytotoxicity of ethanolic extract of *Lilium ledebourii* (Baker) Boiss bulbs on HeLa cell line.

Materials & Methods: In this experimental study, ethanolic extract of *Lilium ledebourii* bulbs was prepared and its cytotoxicity on HeLa cell line was investigated. HeLa cell line was treated with various concentrations of extract (0.156-10.0 mg ml⁻¹) for 72 hours and growth inhibition was assayed using MTT test. In addition, antibacterial activity of the extract was examined using disc diffusion method against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. Statistical analysis was performed using SPSS software.

Results: The results showed that the ethanolic extract at different concentrations significantly reduced the growth of HeLa cell compared to the control group. The most pronounced growth inhibition was %87.42 at the concentration of 1.25 mg ml⁻¹. In addition, the results indicated that ethanolic extract of *Lilium ledebourii* bulbs possessed antibacterial activity. Among the aforementioned bacteria, the highest antibacterial activity was seen against *S. aureus* and the lowest activity against *P. aeruginosa*.

Conclusion: The results of this study revealed that the ethanolic extract of *Lilium ledebourii* bulbs possesses antibacterial activity and cytotoxicity against HeLa cell line. In order to find the underlying mechanism of this activity, further research should be done.

Keywords: *Lilium ledebourii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, Ethanolic extract, MTT test, HeLa cell line