مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳

DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

بررسی تأثیر عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای (*Stachys byzantina*) در شرایط هم‌کِشتی هلیکوباکترپیلوری (*Helicobacter pylori*) با سلول‌های سرطان معده AGS بر زنده‌مانی سلول‌های سرطانی

هاشم یعقوبی*، هاله مکبر

گروه زیست شناسی ،واحد اردبیل، دانشگاه آزاد اسلامی، اردبیل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۰۷

چکیده

هلیکوباکترپیلوری از عوامل اصلی بروز زخم‌های گوارشی و سرطان معده بوده و نقش مهمی در التهاب مزمن مخاط معده و پیشرفت بیماری‌های مربوط به زخم معده ایفا می‌کند، در این راستا، گیاه دارویی سنبله نقره‌ای (*Stachys byzantina*) با اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی و ضدسرطانی، به‌عنوان گزینه‌ای بالقوه مورد توجه قرار گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای بر زنده‌مانی باکتری هلیکوباکترپیلوری و سلول‌های سرطانی آدنوکارسینومای معده (AGS) در شرایط هم‌کشتی با یکدیگر است. پس از تأیید وجود هلیکوباکترپیلوری با انجام آزمون‌های اوره‌آز و کاتالاز، عصاره متانولی و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای استخراج گردید. پس از تعیین حداقل غلظت‌های مهارکنندگی (MIC) و کشندگی (MBC) این ترکیبات بر روی باکتری میزبان، ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های AGS در شرایط هم‌کِشتی با هلیکوباکترپیلوری با آزمون MTTو سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روشDPPH انجام گرفت. هم‌چنین از آزمون ANOVA یک‌طرفه برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از تست انتشار آگار نشان داد بیشترین خاصیت ضد میکروبی عصاره گیاه سنبله نقره ای در غلظت ۴۰ mg/ml مشاهده شد. طبق نتایج حاصل از بررسی MIC و MBC، عصاره سنبله نقره‌ای در ۲۵ mg/ml رشد هلیکوباکترپیلوری را مهار کرد اما اثر کشندگی کامل نداشت، این درحالی بود که اسانس این گیاه در غلظت ۳۰ µl رشد این باکتری را مهار نموده و در غلظت ۶۰ µl/ml نابودی کامل ایجاد کرد. هم‌چنین نتایج آزمون MTT نشان داد که هم‌کشتی هلیکوباکترپیلوری و سلول‌های AGS تاثیر معنی‌داری بر زنده‌مانی سلول‌های AGS نداشت این درحالی بود که عصاره و اسانس سنبله نقره‌ای موجب کاهش معنی‌دار و وابسته به دوز و زمان زنده‌مانی سلول‌هایAGS شدند، به‌طوری‌که اسانس اثر سیتوتوکسیک قوی‌تری نشان داد. از سویی دیگر، بر اساس نتایج حاصل از آزمون DPPH، اسانس سنبله نقره‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی داشت.

واژگان کلیدی: اسانس، هم‌کِشتی، سنبله نقره‌ای، هلیکوباکترپیلوری و AGS

*نویسنده مسئول، پست الکترونیک: yaghoubi_h@iau.ac.ir

مقدمه

عفونت هلیکوباکترپیلوری (*H. pylori*) یکی از شایع‌ترین عفونت‌های باکتریایی مزمن در جهان است که نقش مهمی در بروز بیماری‌های گوارشی از جمله گاستریت مزمن، زخم‌های پپتیک و سرطان معده دارد (۱). این باکتری گرم‌منفی، مارپیچی و میکروآئروفیل با ابعاد تقریبی ۲/۵ تا ۳ میکرومتر طول و حدود ۰/۵ میکرومتر قطر، از

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

طریق تولید آنزیم‌هایی نظیر اوره‌آز و چسبندگی به لایه مخاطی معده قادر به بقا و کلونیزاسیون در محیط اسیدی معده است (۲). برآوردها نشان داده‌اند که بیش از نیمی از جمعیت جهان به این باکتری آلوده هستند و در بیماران مبتلا به اختلالات گوارشی، شیوع آن می‌تواند به بیش از ۹۰ درصد برسد (۳). از نظر پاتوفیزیولوژیک، *H. pylori* با ایجاد التهاب مزمن و اختلال در تعادل سلولی مخاط معده، در بروز بیماری‌هایی نظیر زخم معده، زخم دوازدهه، آدنوکارسینوم معده و لنفوم بافت لنفوئیدی مرتبط با مخاط نقش دارد (۴). هم‌چنین این باکتری از طریق تنظیم همزمان مسیرهای آپوپتوز و تکثیر سلولی، موجب برهم‌زدن هموستاز بافتی و افزایش احتمال تغییرات نئوپلاستیک می‌شود (۵). ورم معده ناشی از *H. pylori* به‌عنوان یکی از قوی‌ترین عوامل خطر سرطان معده شناخته شده و سازمان جهانی بهداشت در سال ۱۹۹۴ این باکتری را در گروه عوامل سرطان‌زا طبقه‌بندی کرده است. سرطان معده نیز از مهم‌ترین علل مرگ‌ومیر ناشی از سرطان در جهان محسوب می‌شود (۶). درمان استاندارد این عفونت شامل رژیم‌های ترکیبی آنتی‌بیوتیکی همراه با مهارکننده‌های پمپ پروتون است؛ با این حال، افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، عوارض جانبی داروها و کاهش موفقیت درمان در برخی بیماران، محدودیت‌های جدی در این رویکرد ایجاد کرده است (۷). بنابراین، توسعه راهکارهای درمانی مکمل یا جایگزین برای بهبود اثربخشی درمان ضروری به نظر می‌رسد. در این میان، استفاده از ترکیبات طبیعی و گیاهان دارویی به‌عنوان منابع غنی از متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال، مورد توجه گسترده قرار گرفته است. طب سنتی، از جمله طب ایرانی، از دیرباز از گیاهان دارویی برای درمان اختلالات گوارشی استفاده کرده و این دانش بومی همچنان به‌عنوان منبعی ارزشمند برای شناسایی ترکیبات ضدمیکروبی، ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی مطرح است (۸). در این راستا، گیاه سنبله نقره‌ای (*S. byzantina*) به‌عنوان یکی از گیاهان دارویی ارزشمند خانواده Lamiaceae، به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست‌فعال متنوع از جمله فنل‌ها، فلاونوئیدها، ترپنوئیدها و سایر متابولیت‌های ثانویه، مورد توجه بسیاری از مطالعات فارماکولوژیک قرار گرفته است. این ترکیبات به‌طور گسترده با فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدمیکروبی، ضدالتهابی و ضدسرطانی مرتبط بوده و می‌توانند در تنظیم استرس اکسیداتیو، مهار رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و القای مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی نقش مؤثری ایفا کنند (۹). گزارش‌های متعدد نشان داده‌اند که عصاره‌ها و اسانس‌های حاصل از گونه‌های مختلف جنس *Stachys* قادر به مهار رشد طیف وسیعی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی بوده و هم‌چنین اثرات مهاری قابل توجهی بر تکثیر سلول‌های سرطانی در مدل‌های آزمایشگاهی دارند. این ویژگی‌ها عمدتاً به حضور ترکیبات فنلی با قابلیت اهدای الکترون و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نسبت داده می‌شود که می‌تواند از آسیب‌های اکسیداتیو به DNA ، پروتئین‌ها و لیپیدهای سلولی جلوگیری کند (۱۰). با توجه به نقش کلیدی استرس اکسیداتیو و التهاب مزمن در پاتوژنز عفونت هلیکوباکترپیلوری و هم‌چنین در پیشرفت سرطان معده، استفاده از ترکیبات طبیعی با خواص هم‌زمان آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی می‌تواند رویکردی هدفمند و چندوجهی در کنترل این بیماری‌ها محسوب شود (۱۱). از سوی دیگر، توانایی برخی ترکیبات گیاهی در القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی و مهار فاکتورهای رشد، اهمیت آن‌ها را در توسعه درمان‌های ضدسرطان افزایش داده است (۱۲).

با وجود گزارش‌های متعدد در خصوص خواص زیستی گیاه سنبله نقره‌ای، هنوز اطلاعات جامعی در خصوص اثرات همزمان عصاره و اسانس این گیاه بر هلیکوباکترپیلوری در یک

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

مدل نزدیک به شرایط فیزیولوژیک (هم‌کِشتی با سلول‌های اپی‌تلیال معده) در دسترس نیست. اغلب مطالعات پیشین به بررسی جداگانه فعالیت ضدباکتریایی یا سیتوتوکسیک پرداخته‌اند و ارتباط بین این دو جنبه، به‌ویژه در حضور استرس اکسیداتیو ناشی از عفونت، کمتر مورد توجه قرار گرفته است. بنابراین، نوآوری اصلی این پژوهش در ارزیابی یکپارچه اثرات عصاره و اسانس سنبله نقره‌ای بر مهار رشد *H. pylori* و بررسی همزمان پاسخ‌های سلولی در رده AGS در شرایط هم‌کِشتی نهفته است. در این راستا، این مطالعه با هدف پاسخ به این سؤال طراحی شد که آیا این ترکیبات گیاهی می‌توانند علاوه بر مهار باکتری، بر زنده‌مانی سلول‌های میزبان نیز تأثیرگذار باشند و این اثرات تا چه حد به ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مرتبط است.

مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده

در این پژوهش محیط کشت مولر هینتون آگار، کلرید پتاسیم (KCl)، MTT، اتانول، HCL، NaCl، کلروفرم و هیدروکسیدسدیم (NaOH) از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. سرم جنین گاوی (FBS)، محیط کشت DMEM و تریپسین-EDTA از شرکت Biowest (ایالات متحده آمریکا) خریداری شدند.

روش انجام کار

آزمون اوره‌آز و تست کاتالاز

وجود هلیکوباکترپیلوری و عدم آلودگی نمونه به سایر میکروارگانیسم‌ها با استفاده از آزمون‌های اوره‌آز و کاتالاز تأیید شد. در آزمون اوره‌آز، کلنی‌های باکتری بر روی محیط حاوی فنل رد کشت داده شدند. در صورت حضور هلیکوباکترپیلوری، آنزیم اوره‌آز موجود در باکتری موجب هیدرولیز اوره به آمونیوم، افزایش pH محیط و تغییر رنگ محیط به ارغوانی می‌گردد. هم‌چنین در آزمون کاتالاز، با افزودن آب اکسیژنه به کلنی‌های باکتری، به دلیل تجزیه پراکسید هیدروژن توسط آنزیم کاتالاز، تولید حباب اکسیژن مشاهده شد (۱۳).

تهیه نمونه گیاهی

نمونه گیاه (اندام هوایی) سنبله نقره‌ای (*S. byzantina*) از پژوهشکده گیاهان دارویی جهاد دانشگاهی کرج جمع‌آوری شد.

تهیه عصاره و اسانس گیاهی

عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای با استفاده از برگ‌های خشک‌شده گیاه که توسط دست به قطعات کوچک تا ریز درآمده بودند، تهیه شد. برای تهیه عصاره‌ی گیاهی، ابتدا پودر گیاه در محلول متانول ۹۰ درصد حجمی-حجمی (۹:۱-آب:متانول) قرار داده شد و فرآیند استخراج به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور شیکردار انجام گرفت. پس از تهیه عصاره، نمونه‌ها در گرم‌خانه خشک و جهت تیمار با نمونه‌های باکتری و سلول AGS در آب مقطر محلول شدند (این فرایند به دلیل کاهش حداقلی اثرات مضر متانول بر روی باکتری و سلول میزبان در ادامه مسیر آزمایشی بود). استخراج اسانس، از طریق تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر (Germany, BÜCHI B-811) انجام شد. اسانس حاصل پس از جمع‌آوری و جداسازی فاز روغنی، در دمای ۵ درجه سانتی گراد و در شرایط تاریکی مطلق نگهداری گردید.

بررسی حساسیت باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها به کمک روش انتشار در چاهک آگار

بمنظور بررسی حساسیت هلیکوباکترپیلوری به ترکیبات مورد مطالعه، ابتدا سوسپانسیون یکنواختی از باکتری تهیه و غلظت آن با استاندارد مک‌فارلند شماره ۱ تنظیم گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه‌شده بر روی سطح محیط کشت آگار در پلیت‌ها تلقیح و به‌طور یکنواخت پخش شد. پس از

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

جذب و خشک شدن سطح محیط، چاهک‌هایی با قطر تقریبی ۶ میلی‌متر ایجاد گردید. در ادامه، غلظت‌های مختلف عصاره گیاه سنبله نقره‌ای شامل ۱، ۲، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی‌گرم گیاهی خشک شده حاصل از عصاره متانولی بر میلی‌لیتر آب مقطر و هم‌چنین غلظت‌های مختلف اسانس شامل ۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر در چاهک‌های مربوطه افزوده شد. پلیت‌ها پس از آماده‌سازی در شرایط مناسب به مدت ۳ روز انکوبه شدند. در نهایت، قطر هاله عدم رشد ایجادشده در اطراف هر چاهک با استفاده از نرم‌افزار ImageJ(نسخه ۱/۵۳) اندازه‌گیری و مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (۱۴).

بررسی تأثیر هلیکوباکترپیلوری زنده‌ملنی سلول‌های AGS در شرایط هم‌کِشتی

برای بررسی تأثیر هلیکوباکترپیلوری بر زنده‌مانی سلول‌های AGS در شرایط هم‌کِشتی، ابتدا سلول‌های AGSدر پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جنینی (FBS) و فاقد آنتی‌بیوتیک، کشت داده شدند و تا رسیدن به تراکم مناسب (حدود ۷۰–۸۰ درصدی) در CO_2 انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2)، انکوبه شدند. سوسپانسیون استاندارد هلیکوباکترپیلوری با استفاده از استاندارد مک‌فارلند ۱ تهیه گردید و سپس با محیط کشت به نسبت‌های مختلف رقیق شد تا غلظت‌های نهایی ۱:۷۵۰ و ۱:۱۰۰۰ (نسبت باکتری به سلول‌های AGS) حاصل گردد. پس از تعیین تعداد سلول‌های AGS (به کمک تریپان بلو)، مقدار مشخصی از سوسپانسیون باکتری به هر چاهک اضافه شد به‌گونه‌ای که نسبت‌های مورد نظر بین سلول‌های میزبان و باکتری برقرار گردد. پس از افزودن باکتری، پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در CO_2 انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2) نگهداری شدند. در پایان دوره هم‌کِشتی، زنده‌مانی سلول‌های AGS با استفاده از آزمون MTT ارزیابی گردید (۱۵).

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

بمنظور تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای بر هلیکوباکترپیلوری در شرایط هم‌کِشتی با سلول‌های AGS، ابتدا تعداد سلول‌ها با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو شمارش و سوسپانسیون باکتری با تراکم ۳×۱۰^{۸} سلول در میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری بر روی سلول‌های AGSدر پلیت‌های ۹۶ خانه تلقیح شد. در ادامه، محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم گاوی جنینی (FBS) و فاقد آنتی‌بیوتیک، به همراه غلظت‌های مختلف عصاره (صفر (شاهد)، ۰/۳۹، ۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم گیاهی خشک شده حاصل از عصاره متانولی بر میلی‌لیتر محیط کشت RPMI) و اسانس (صفر (شاهد)، ۰/۴۶، ۰/۹۴، ۱/۸۸، ۳/۷۵، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر محیط کشت RPMI) به هر کدام از چاهک‌ها اضافه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در CO_2 انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2)، محیط رویی سلول‌ها جمع‌آوری و به پلیت‌های جدید منتقل گردید و در انتها پلیت‌های فاقد رشد قابل مشاهده باکتری به‌عنوان غلظت نهایی MIC در نظر گرفته شدند.

برای تعیین MBC، نیز از نمونه‌های مربوط به غلظت‌های برابر و بالاتر از MIC برداشت شده و بر روی محیط مولر-هینتون آگار حاوی ۱۰ درصد FBS کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲ روز در CO_2 انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2)، انکوبه شدند و

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

سپس از نظر وجود کلونی بررسی گردیدند. حداقل غلظتی که در آن هیچ‌گونه رشد هلیکوباکتر مشاهده نشد، به‌عنوان MBC در نظر گرفته شد (۱۶).

به‌منظور تفسیر بهتر نتایج رشد باکتری، ارزیابی کلونی‌ها به‌صورت نیمه‌کمی انجام شد. به این صورت که شدت رشد باکتری بر اساس مشاهده چشمی و تراکم کلونی‌ها در محیط کشت به سطوح کیفی شامل عدم رشد (—)، رشد کم (+)، رشد متوسط (++) و رشد زیاد (+++) طبقه‌بندی گردید. این روش امکان تبدیل داده‌های کمی به یک سیستم رتبه‌بندی قابل مقایسه را فراهم نمود.

آزمون سمیت سلولی

جهت بررسی تأثیر عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای بر زنده‌مانی سلول‌ها، سلول‌های AGS در تراکم ۷۰۰۰ سلول در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در CO_2 انکوباتور (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2)، انکوبه شدند. پس از ۲۴ ساعت، سلول‌ها با محیط کشت تازه حاوی غلظت‌های مختلف عصاره متانولی (۱، ۲، ۵، ۷/۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم گیاهی خشک شده حاصل از عصاره متانولی بر میلی‌لیتر محیط کشت RPMI) و اسانس (۲، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰ و ۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر محیط کشت RPMI) تیمار شدند. پس از انکوباسیون (دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO_2)، در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، میزان زنده‌مانی سلول‌ها با استفاده از آزمون MTT مورد ارزیابی قرار گرفت (۱۷).

آزمون DPPH

بمنظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای، از آزمون DPPH استفاده شد. بدین منظور، ۳ میلی‌لیتر از عصاره گیاه سنبله نقره‌ای (۰/۷۸، ۱/۵۶، ۳/۱۲، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب مقطر) و یا اسانس آن (۰/۹۴، ۱/۸۸، ۳/۷۵، ۷/۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر آب مقطر) به صورت مجزا از یکدیگر به ۳ میلی‌لیتر از محلول DPPH در متانول اضافه گردید. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریک و دمای اتاق انکوبه شد تا واکنش مهار رادیکال پایدار گردد. سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (Thermo Fisher Scientific, USA) اندازه‌گیری شد. کاهش جذب نوری نسبت به نمونه کنترل نشان‌دهنده توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH و بیانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در نظر گرفته شد (۱۸). درصد مهار رادیکال DPPH بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهارکنندگی} = \frac{A\ control - A\ sampel}{\text{A control}}$$

A control: جذب نمونه کنترل و A sample: جذب نمونه حاوی عصاره یا اسانس

تجزیه و تحلیل آماری

هر پارامتر اندازه‌گیری شده در این مطالعه در سه تکرار ارزیابی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS22 از طریق آنالیز واریانس یک‌طرفه و به دنبال آن آزمون دانکن برای مقایسه‌های چندگانه در آستانه معنی‌داری ۵ درصد انجام شد. توزیع نرمال داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف-اسمیرنوف بررسی شد. نتایج به صورت مقادیر میانگین با انحراف معیار (میانگین ± انحراف معیار) گزارش شده‌اند.

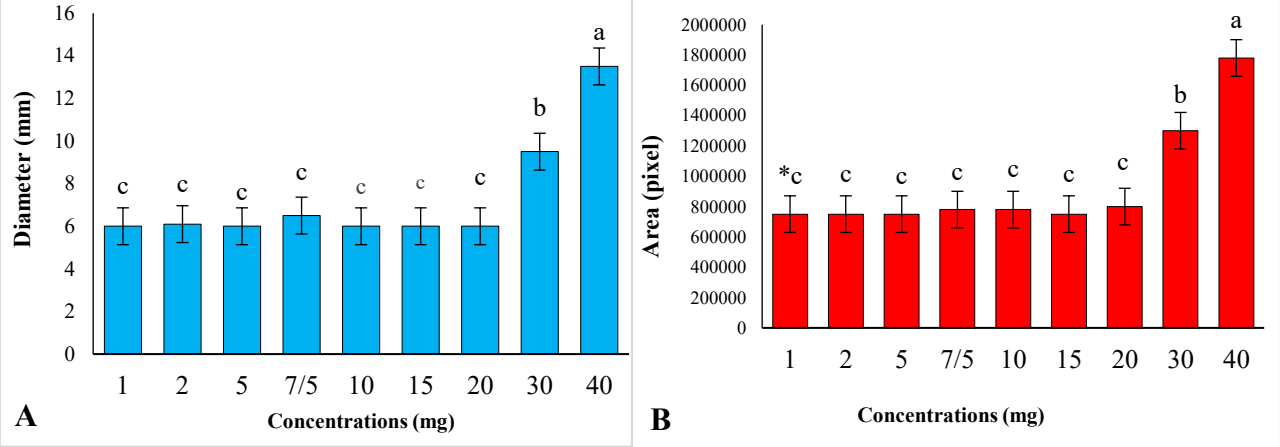
نتایج

بررسی خواص ضدمیکروبی عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای به کمک روش انتشار در چاهک آگار

نتایج حاصل از بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره سنبله نقره‌ای بر روی هلیکوباکترپیلوری نشان داد که این

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

عصاره بر هر دو شاخص قطر و مساحت تأثیر وابسته به غلظت دارد (شکل۱-A و B). طبق نتایج حاصل در غلظت‌های پایین (تا ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، تغییرات ایجاد شده در هر دو پارامتر محدود بوده و از نظر آماری و در سطح احتمال ۵ درصد، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. این موضوع بیانگر آن است که در این محدوده غلظتی، ترکیبات موجود در عصاره قادر به ایجاد پاسخ قابل توجه در سیستم مورد مطالعه نیستند. با افزایش غلظت به بالاتر از ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، افزایش در مقدار قطر و مساحت مشاهده شد که از نظر آماری معنی‌دار بود. این تغییر نشان‌دهنده آغاز اثرگذاری زیستی عصاره و عبور از آستانه پاسخ است. به عبارت دیگر، در این سطح غلظت، میزان ترکیبات فعال به حدی می‌رسد که می‌تواند اثر قابل توجهی بر رشد یا گسترش نمونه‌ها ایجاد کند. در بالاترین غلظت (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، افزایش در هر دو پارامتر به‌صورت چشمگیرتری ادامه یافت و اختلاف‌ها نسبت به غلظت‌های پایین‌تر کاملاً معنی‌دار باقی ماند. این روند نشان‌دهنده وجود یک رابطه دوز-پاسخ مثبت است که در آن با افزایش غلظت عصاره، شدت اثر نیز افزایش می‌یابد.

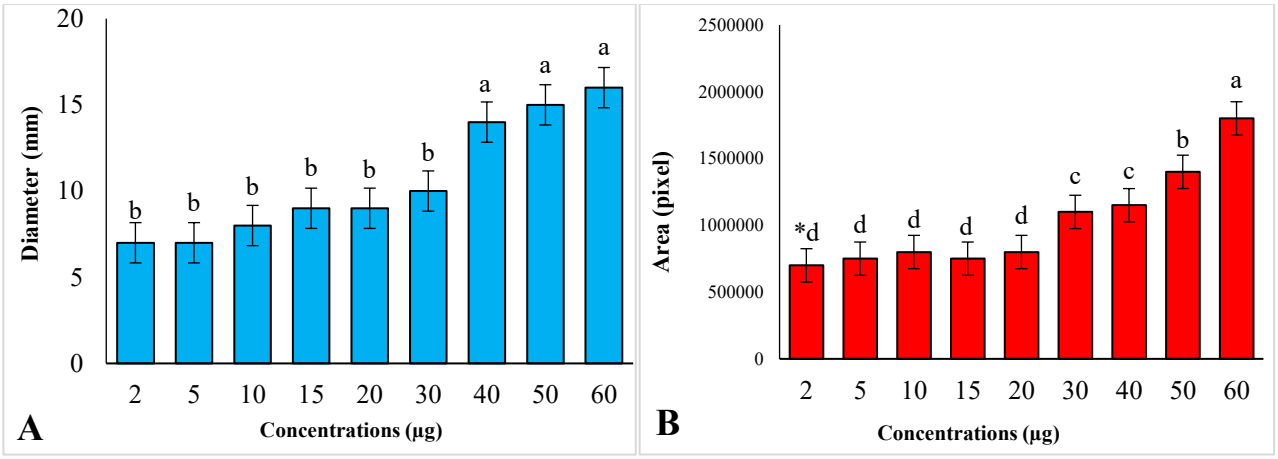


شکل۱- مقایسه میانگین قطر (A) و مساحت (B) هاله عدم رشد هلیکوباکترپیلوری پس از تیمار با غلظت‌های متفاوتی از عصاره گیاه سنبله نقره‌ای. *حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

از سویی دیگر، نتایج بررسی اثر غلظت‌های مختلف اسانس سنبله نقره‌ای نشان داد که این ترکیب نیز همانند عصاره‌ی گیاهی، دارای اثر وابسته به غلظت بر شاخص‌های قطر و مساحت است، با این تفاوت که الگوی پاسخ در اینجا تدریجی‌تر و گسترده‌تر مشاهده می‌شود (شکل۲-A و B). در غلظت‌های پایین، تغییرات ایجادشده در هر دو پارامتر قطر و مساحت محدود بوده و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. این موضوع نشانگر این است که در این بازه، اسانس در غلظت‌های پایین هنوز به سطح مؤثری برای ایجاد تغییرات قابل توجه نرسیده است. با افزایش غلظت به ۳۰ میکروگرم، افزایش در مقادیر قطر و مساحت آغاز شد، با این حال این تغییرات در مقایسه با غلظت‌های پایین‌تر هنوز به‌صورت کامل چشمگیر نبوده و شدت اثر نسبتاً ملایم باقی ماند. اما از غلظت ۴۰ میلی‌گرم به بالا، افزایش در هر دو شاخص به‌صورت واضح و از نظر آماری معنی‌دار مشاهده شد، که نشان‌دهنده عبور از آستانه اثرگذاری اسانس است (شکل۲-A و B). در غلظت‌های بالاتر (۵۰ و ۶۰ میکروگرم)، روند افزایشی ادامه یافته و مقادیر قطر و مساحت به بیشینه خود نزدیک شدند. اختلاف این مقادیر نسبت به غلظت‌های پایین و متوسط کاملاً معنی‌دار (در سطح احتمال ۵ درصد) باقی ماند، هرچند شیب افزایش در این محدوده نسبت به بازه ۳۰ تا

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

۴۰ میکروگرم کمتر است که می‌تواند بیانگر نزدیک شدن سیستم به حالت اشباع یا حداکثر پاسخ باشد. هم‌چنین همبستگی مثبت بین افزایش قطر و مساحت در تمامی غلظت‌های اسانس مشاهده شد، به‌طوری‌که افزایش مساحت به‌طور مستقیم با افزایش غلظت اسانس تیمار شده همراه بوده است. این موضوع نشان می‌دهد که اسانس گیاه تأثیر یکنواختی بر الگوی رشد داشته و موجب گسترش کلی ساختار مورد بررسی شده است. در مجموع، اسانس و عصاره گیاه سنبله نقره‌ای هر دو دارای الگوی پاسخ وابسته به دوز با آستانه اثرگذاری مشخص هستند؛ به‌طوری‌که در غلظت‌های پایین اثر معنی‌داری مشاهده نمی‌شود، اما در غلظت‌های بالاتر موجب افزایش معنی‌دار در شاخص‌های رشد می‌شوند. هم‌راستایی تغییرات قطر و مساحت نیز نشان می‌دهد که افزایش سطح مستقیماً ناشی از رشد شعاعی بوده و بیانگر تأثیر یکنواخت این ترکیبات بر الگوی رشد است.



شکل۲- مقایسه میانگین قطر (A) و مساحت (B) هاله عدم رشد هلیکوباکترپیلوری پس از تیمار با غلظت‌های متفاوتی از اسانس گیاه سنبله نقره‌ای. *حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

بررسی اثر کشت همزمان هلیکوباکترپیلوری و AGS بر زنده‌مانی سلول‌های AGS

نتایج حاصل از هم‌کشتی هلیکوباکترپیلوری و AGS و تأثیر آن بر روی زنده‌مانی سلول‌های AGS نشان داد که تیمارهای مختلف هم‌کشتی، تأثیر متفاوتی بر زنده‌مانی سلول‌ها داشتند (شکل۳). در گروه‌های شاهد و رقت‌های پایین‌تر (۱:۱۰۰ و ۱:۲۵۰)، میزان زنده‌مانی سلولی در سطح بالایی باقی مانده و اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد بین این تیمارها مشاهده نشد. این امر بیانگر این است که در این غلظت‌ها، ترکیب مورد بررسی فاقد اثر سیتوتوکسیک قابل توجه بوده و توانسته است وضعیت بقاء سلولی را در حد نزدیک به کنترل حفظ کند. اما با افزایش رقت (کاهش غلظت مؤثر ماده)، در تیمارهای ۱:۵۰۰ و ۱:۷۵۰ کاهش نسبی در زنده‌مانی سلولی مشاهده شد (شکل۳)، با این حال این کاهش در مقایسه با گروه‌های اولیه از نظر آماری به‌صورت کامل معنی‌دار نبوده و در یک محدوده میانی قرار دارد ($p>0.05$ در مقایسه با برخی تیمارها). این وضعیت نشان‌دهنده شروع تغییرات در پاسخ سلولی است، اما شدت آن هنوز محدود است. از سویی نیز در بالاترین رقت (۱:۱۰۰۰)، کاهش قابل توجهی در زنده‌مانی سلولی مشاهده شد که این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($p<0.05$) و کمترین میزان بقاء (۷۸ درصد) در بین تمامی تیمارها ثبت شد. این نتایج نشان می‌دهد که در این شرایط، اثر حفاظتی یا حمایتی ترکیب مورد

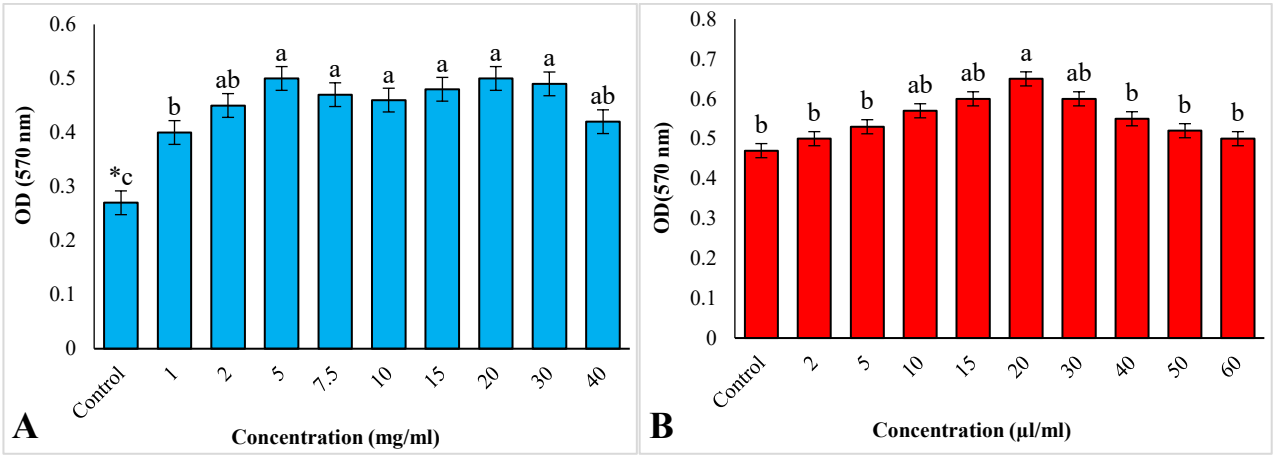
مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

بررسی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته و سلول‌ها بیشتر تحت تأثیر عوامل آسیب‌زا (احتمالاً حضور *H. pylori*) قرار گرفته‌اند. به‌طور کلی، نتایج حاصل از هم‌کشتی هلیکوباکترپیلوری و AGS بیانگر آن است که اثر این ترکیب بر زنده‌مانی سلول‌ها وابسته به غلظت/رقت بوده و در غلظت‌های بالاتر (رقت‌های کمتر) توانایی حفظ بقاء سلولی بیشتر است، در حالی‌که با افزایش رقت، این اثر کاهش یافته و در نهایت منجر به افت معنی‌دار در زنده‌مانی سلول‌ها می‌شود (شکل۴).



شکل۳- مقایسه میانگین تاثیر کشت همزمان هلیکوباکترپیلوری بر زنده‌مانی سلول‌های AGS در کشت همزمان هلیکوباکترپیلوری و سلول‌های AGS

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.



شکل۴- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره (A) و اسانس (B) گیاه سنبله نقره‌ای بر سلول‌های AGS در کشت همزمان با هلیکوباکترپیلوری

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

مقدار نهایی MIC و MBC عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای علیه هلیکوباکترپیلوری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که هر دو ترکیب دارای اثرات ضدباکتریایی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت، میزان مهار رشد باکتری به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد (جدول۱). همانطوریکه از جدول۱ استنباط می‌شود، در

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

غلظت‌های پایین، رشد باکتری به‌صورت قابل‌توجهی مشاهده شد (+++)، در حالی‌که با افزایش غلظت، میزان رشد به‌تدریج کاهش یافت (++ تا +). در غلظت‌های بالاتر، مهار کامل رشد باکتری مشاهده شد که نشان‌دهنده حداقل غلظت مهاری (MIC) است. هم‌چنین، اسانس در مقایسه با عصاره، فعالیت ضدباکتریایی قوی‌تری از خود نشان داد، به‌طوری‌که در غلظت‌های پایین‌تر منجر به مهار کامل رشد باکتری شد. از سویی نیز با بررسی MBC عصاره گیاه سنبله نقره‌ای بر هلیکوباکترپیلوری مشخص شد، عصاره گیاه سنبله نقره‌ای تا غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از توانایی کافی جهت از بین بردن کامل هلیکوباکترپیلوری برخوردار نبود. اما در مقابل اسانس گیاه سنبله نقره‌ای از خاصیت بازدارندگی بهتری در مقایسه با عصاره این گیاه برخوردار بود. بطوریکه اسانس گیاه سنبله نقره‌ای در غلظت ۳۰ میکرولیتر سبب مهار رشد و در غلظت ۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر نیز قادر به از بین بردن هلیکوباکترپیلوری شد.

جدول۱- مقدار MIC عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای بر هلیکوباکترپیلوری در شرایط هم‌کِشتی با سلول‌های AGS

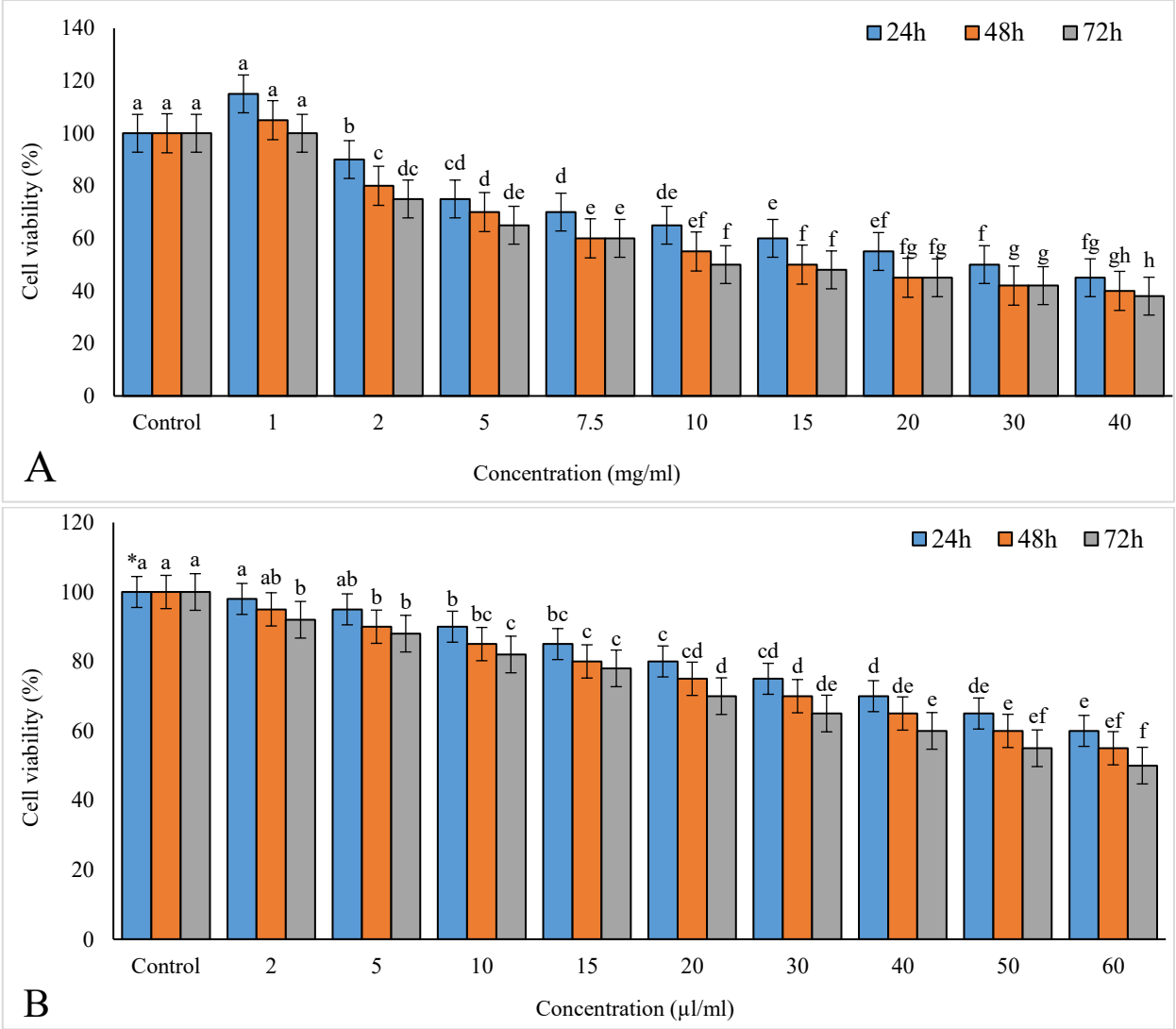
Extract		Essential oil	
Concentration (mg/ml)	MIC	Concentration (µl/ml)	MIC
0	+++	0	+++
0.39	+++	0.46	+++
0.78	+++	0.94	+++
1.56	+++	1.88	+++
3.12	+++	3.75	+++
6.25	+++	7.5	++
12.5	++	15	+
25	+	30	-
50	-	60	-

وضعیت رشد هلیکوباکترپیلوری: عدم رشد (—)، رشد کم (+)، رشد متوسط (++) و رشد زیاد (+++)

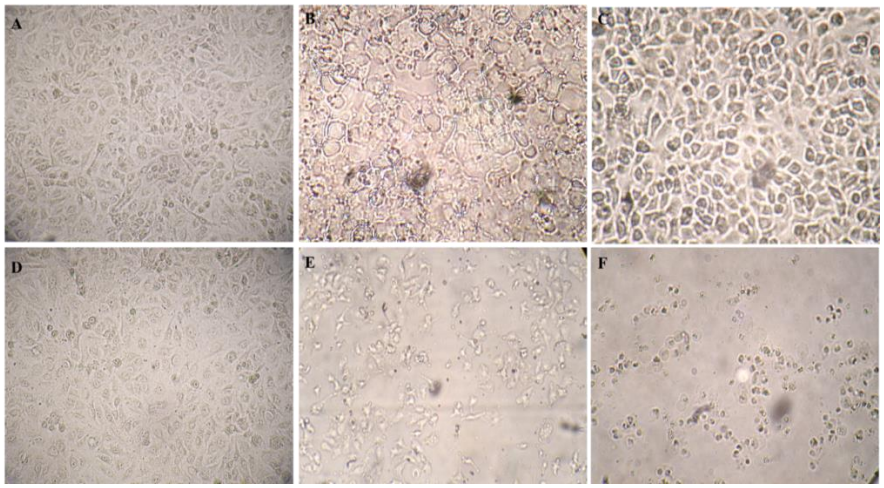
بررسی تاثیر عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای بر زنده‌مانی سلول‌های سرطان معده (AGS)

نتایج حاصل از ارزیابی زنده‌مانی سلول‌های AGS پس از تیمار با عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد که هر دو ترکیب دارای اثرات سیتوتوکسیک وابسته به دُز و زمان هستند. در هر دو تیمار، در غلظت‌های پایین (به‌ویژه نزدیک به کنترل)، تغییر معنی‌داری در زنده‌مانی سلولی مشاهده نشد و میزان زنده‌مانی سلولی در محدوده ۱۰۰ درصد باقی ماند. با این حال، با افزایش غلظت، کاهش تدریجی و معنی‌دار در زنده‌مانی سلول‌ها مشاهده شد (شکل۵-A و B). در تیمار مربوط به عصاره (شکل ۵-A)، کاهش زنده‌مانی از غلظت ۲mg/ml آغاز شده و در غلظت‌های بالاتر (به‌ویژه ۲۰ تا ۴۰ mg/ml) به حدود ۴۰—۶۰ درصد رسید (شکل۶-A تا C). هم‌چنین اثر زمان نیز مشهود بود، به‌طوری‌که در ۷۲ ساعت میزان زنده‌مانی به‌طور قابل‌توجهی کمتر از ۲۴ ساعت بود که نشان‌دهنده افزایش اثر سیتوتوکسیک در طول زمان است.در مورد اسانس (شکل ۵-B)، روند مشابهی مشاهده شد، اما شدت اثر سیتوتوکسیک بیشتر بود. کاهش زنده‌مانی از غلظت‌های پایین‌تر (۵ الی ۱۰ µl/ml) آغاز شده و در غلظت‌های بالاتر (۴۰ تا ۶۰ µl/ml) به حدود ۵۰ درصد یا کمتر رسید (شکل۶-D تا F). هم‌چنین، اثر وابسته به زمان در این بخش نیز به‌وضوح مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین کاهش زنده‌مانی (درصد زنده مانی سلولی برابر با ۵۰ درصد) در ۷۲ ساعت و تحت تیمار با µl/ml ۶۰ از اسانس گیاه ثبت گردید (شکل ۵-B).

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344



شکل۵- نتایج حاصل از مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های متفاوت عصاره (A) و اسانس (B) گیاه سنبله نقره‌ای بر زنده‌مانی سلول‌های AGS در مدت زمانی‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت. *حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

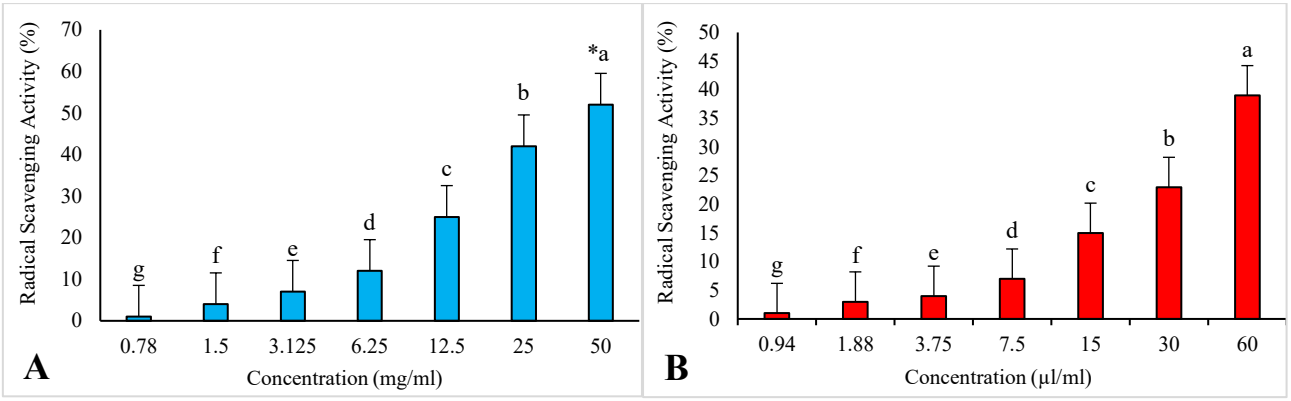


شکل۶- تصاویر میکروسکوپ نوری از سلول‌های AGS پس از ۷۲ ساعت تیمار با غلظت‌های متفاوت عصاره (A-C) به ترتیب غلظت‌های صفر (شاهد)، ۲۰ و ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و اسانس (D-F) به ترتیب غلظت‌های صفر (شاهد)، ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر گیاه سنبله نقره‌ای.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای به کمک DPPH

طبق نتایج به دست آمده از آزمون DPPH (شکل۷-A و B)، با افزایش غلظت عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای، درصد فعالیت رادیکال‌زدایی به طور معنی‌داری افزایش یافته است (در سطح احتمال ۵ درصد). طبق نتایج به دست آمده از آزمون DPPH، اسانس گیاه سنبله نقره‌ای در مقایسه با عصاره آن از فعالیت بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد به صورت وابسته به غلظت برخوردار بود (شکل۷-B)، به طوری که درصد مهار رادیکال‌های آزاد از ۱/۵ درصد در غلظت ۰/۷۸ µl/ml به ۵۲ درصد در غلظت ۵۰ µl/ml افزایش یافت که این افزایش به طور معنی‌داری (در سطح احتمال ۵ درصد) وابسته به غلظت بود. بیشترین شیب افزایش فعالیت بین غلظت‌های ۳/۱۲۵ تا ۱۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (از ۷/۵ به ۲۶/۵ درصد). اگرچه اسانس در غلظت‌های بالا عملکرد نسبتاً مناسبی نشان داد، اما برای رسیدن به ۵۰ درصد مهار (IC_{50}) به حدود ۴۸µl/ml نیاز داشت که بیانگر قدرت آنتی‌اکسیدانی متوسط آن است.



شکل۷- مقایسه خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره (A) و اسانس (B) گیاه سنبله نقره‌ای

*حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار (در سطح احتمال ۵٪) بین تیمارها در هر یک از مقاطع زمانی مورد مطالعه است.

بحث

هلیکوباکترپیلوری یک عامل شایع عفونت مزمن معده است که با بیماری‌هایی مانند گاستریت، زخم پپتیک و سرطان معده مرتبط می‌باشد. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، درمان این باکتری را دشوار کرده است (۲). در سال‌های اخیر، ترکیبات گیاهی به‌دلیل داشتن متابولیت‌های زیست‌فعال مانند فنول‌ها و فلاونوئیدها، به‌عنوان گزینه‌ای جایگزین مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات می‌توانند با اختلال در ساختار سلولی و مهار فرایندهای حیاتی، اثرات ضدباکتریایی نشان دهند (۱۹). با توجه به خواص ضدباکتریایی و ضدسرطانی تأیید شده گیاه سنبله نقره‌ای، در این مطالعه، اثرات عصاره و اسانس این گیاه بر هلیکوباکترپیلوری و پاسخ‌های سلولی بررسی شد. روش انتشار در چاهک آگار یکی از روش‌های استاندارد برای سنجش فعالیت ضدمیکروبی ترکیبات گیاهی است، زیرا علاوه بر اثر مهاری، به‌طور غیرمستقیم توانایی انتشار مولکول‌های فعال در محیط جامد را نیز نشان می‌دهد. این موضوع به‌ویژه برای اسانس‌ها و عصاره‌ها اهمیت دارد، زیرا ترکیبات آن‌ها از نظر قطبیت و وزن مولکولی متفاوت‌اند و همین موضوع بر الگوی انتشار و در نتیجه شدت اثر آن‌ها تأثیر می‌گذارد (۲۰). بر اساس نتایج حاصل از این پژوهش (شکل۱-A و B)، عصاره سنبله نقره‌ای در غلظت‌های پایین (تا ۲۰ mg/ml) اثر معنی‌داری بر قطر و مساحت هاله مهاری بر علیه هلیکوباکتر پیلوری نداشت. این موضوع احتمالاً به دلیل

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

غلظت ناکافی ترکیبات فعال فنولی و فلاونوئیدی در این محدوده است، به‌طوری‌که هنوز به حد آستانه لازم برای اختلال در غشای باکتری یا مهار آنزیم‌های حیاتی نرسیده‌اند. هم راستا با نتایج حاصل، Grzegorczyk-Karolak و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش کردند که عصاره گیاه مریم‌گلی یکساله (*Salvia viridis*) در غلظت‌های پایین اغلب به دلیل محدودیت در تجمع ترکیبات فعال در محیط آگار، اثر قابل مشاهده‌ای ایجاد نمی‌کنند (۲۰). از سویی دیگر، با افزایش غلظت عصاره به بالای mg/ml ۳۰، افزایش معنی‌دار قطر و مساحت مشاهده شد که نشان‌دهنده عبور از آستانه اثرگذاری و ایجاد اختلال در رشد باکتری است. این اثر می‌تواند ناشی از افزایش نفوذ ترکیبات پلی‌فنولی و ترپنوئیدی به غشای سلولی و ایجاد تغییر در نفوذپذیری غشاء یا دناتوره شدن پروتئین‌های حیاتی باشد (۲۱). در مطالعات مشابه نیز گزارش شده است که افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی به‌طور مستقیم با افزایش تخریب غشای سلولی و کاهش رشد میکروبی همراه است (۲۲). Karaoglan و همکاران (۲۰۲۱)، گزارش کردند که عصاره سنبله نقره‌ای دارای فعالیت ضد هلیکوباکتری وابسته به غلظت بوده و در غلظت‌های بالاتر موجب ایجاد هاله مهاری قابل توجه در *H. pylori* می‌شود. این یافته با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد (۲۳). در مورد اسانس (شکل ۲ A-و B)، مشاهده شد که اثر مهاری از ۴۰µg/ml به بعد به‌صورت معنی‌دار ظاهر می‌شود و در غلظت‌های ۵۰ و ۶۰ µg/ml به بیشینه نزدیک می‌شود. این الگو معمولاً به ترکیب لیپوفیلیک اسانس‌ها نسبت داده می‌شود که توانایی بالاتری در نفوذ به غشای لیپیدی باکتری دارند، اما در عین حال به دلیل محدودیت در انتشار در محیط آگار، اثر آن‌ها تدریجی‌تر ظاهر می‌شود. کاهش شیب افزایش در غلظت‌های بالا نیز می‌تواند ناشی از اشباع محل‌های هدف در غشاء یا محدودیت فیزیکی در انتشار باشد. همراستا با نتایج این پژوهش، Karaoglan و همکاران (۲۰۲۱)، با بررسی خواص ضدباکتریایی اسانس سنبله نقره‌ای، گزارش دادند که ترکیبات فرّار این گیاه به دلیل خاصیت لیپوفیلیک، توانایی بالایی در نفوذ به غشای باکتری‌های گرم منفی از جمله *H. pylori* دارند و موجب اختلال در یکپارچگی غشاء و کاهش رشد باکتری می‌شوند. این موضوع می‌تواند توضیح‌دهنده اثر قوی‌تر اسانس نسبت به عصاره در نتایج این تحقیق باشد، جایی که اثر مهاری اسانس از غلظت‌های پایین‌تر و با شدت بیشتری ظاهر شد.

بر اساس نتایج حاصل از هم‌کشتی در این پژوهش (شکل۳)، در گروه‌های شاهد و نسبت‌های ۱:۱۰۰ و ۱:۲۵۰، زنده‌مانی بالای سلول‌های AGS نشان می‌دهد که در این شرایط، تعادل بین اثرات آسیب‌زای هلیکوباکتر پیلوری و ظرفیت دفاعی سلول‌ها هنوز به سمت حفظ بقاء سلولی حفظ شده است. این یافته با گزارش‌های قبلی هم‌خوانی دارد که نشان می‌دهند در مراحل اولیه یا تماس با بار باکتریایی پایین‌تر، سلول‌های اپی‌تلیال می‌توانند از طریق مکانیسم‌های دفاعی مانند پاسخ‌های آنتی‌اکسیدانی و تنظیم مسیرهای بقا، اثر آسیب را تا حدی خنثی کنند (۲۴). از سویی دیگر، طبق نتایج حاصل در بالاترین رقت (۱:۱۰۰۰)، کاهش معنی‌دار زنده‌مانی (حدود ۷۸ درصد در شکل۳) نشان‌دهنده غلبه اثرات سیتوتوکسیک هلیکوباکترپیلوری بر توان دفاعی سلول‌های AGS است. این پدیده با مطالعاتی که نقش عوامل بیماری‌زایی مانند CagAو VacA را در القای آپوپتوز، اختلال میتوکندری و کاهش بقاء سلولی نشان داده‌اند، هم‌راستا است (۲۵). در این شرایط، کاهش اثر محافظتی ترکیب مورد بررسی نیز می‌تواند باعث تشدید آسیب سلولی شود. در مجموع، نتایج حاصل از هم‌کشتی هلیکوباکترپیلوری و سلول‌های AGS نشان داد که پاسخ سلول‌های AGS در مدل

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

هم‌کشـــتی وابســـته به شـــدت تیمار بوده و یک رابطه غیرخطی بین میزان مواجهه و زنده‌مانی ســـلولی وجود دارد. به‌طور مشـــابه، در مطالعات دیگر نیز گزارش شـــده اســـت که اثر هلیکوباکترپیلوری بر ســـلول‌های اپی‌تلیال معده به‌صورت دوز-وابسته بوده و در سطوح بالاتر مواجهه، کاهش معنی‌دار در زنده‌مانی سلولی رخ می‌دهد (۲۶).

اهمیت روش MTT در مطالعات سیتوتوکسیک مربوط به حساسیت بالا، فراهم نمودن امکان بررسی اثر وابسته به دوز و زمان ترکیبات دارویی یا گیاهی را در سـلول‌های سـرطانی اسـت (۲۷). بر اسـاس نتایج حاصـل از آزمون زیست سلولی (شکل۵-A و B)، هر دو ترکیب گیاه سنبله نقره‌ای یعنی عصـاره و اسـانس آن اثرات سـیتوتوکسـیک وابسته به غلظت و زمان بر سلول‌های AGS نشان دادند. در غلظت‌های پایین، زنده‌مانی سلولی برابر با ۱۰۰ درصد بود کـه بیـانگر این اســـت کـه در این محـدوده، میزان ترکیبات فعال برای ایجاد اختلال در مســـیرهای حیاتی سـلولی مانند چرخه سـلولی یا عملکرد میتوکندری کافی نبوده است. این موضوع با گزارش‌های قبلی هم‌خوانی دارد که نشـــان می‌دهند بســـیاری از عصـــاره‌های گیاهی در دوزهای پایین اثرات سـیتوتوکسـیک قابل توجهی ندارند و تنها در غلظت‌های بالاتر وارد فاز القای مرگ ســـلولی می‌شـــوند (۲۸). در تیمار ســـلول‌های AGS با عصـــاره‌ی گیاهی (شـــکل۵-A)، کاهش زنده‌مانی ســـلولی از حدود ۲mg/ml آغاز شـــده و در بازه ۲۰ تا ۴۰ mg/ml به ۴۰ الی ۶۰ درصـد رسـیده اسـت که می‌تواند ناشـی از افزایش غلظت ترکیبات فنولی، فلاونوئیدی و ســایر متابولیت‌های ثانویه باشـد. این ترکیبات معمولاً از طریق القای اسـترس اکسـیداتیو، آسـیب DNA و فعال‌سازی مسیرهای آپوپتوز (مانند Caspase-dependent pathways) باعث کاهش بقاء ســـلولی می‌شـــوند (۲۹). افزایش اثر در ۷۲ ســـاعت نســـبت به ۲۴ ســـاعت نیز نشـــان‌دهنده ماهیت time-dependent این آسـیب و تجمع تدریجی اثرات سـمی در سـلول اسـت. Jassbi و همکاران (۲۰۱۴)، با بررسـی تأثیر عصاره جنس *Stachys* بر سـلول‌های سـرطانی بیان کردند که این ترکیبات اثرات سیتوتوکسیک وابسته به دُز و زمان دارند و این اثر عمدتاً از طریق القای اسـترس اکسـیداتیو و فعال‌سـازی مسـیرهای آپوپتوزی رخ می‌دهد (۳۰)، که این نتایج با یافته‌های حاضـر در این پژوهش مطابقت دارد. در مورد اسانس (شکل۵-B)، نیز اثر سیتوتوکسیک شدیدتر از عصاره آن مشاهده شد که از ۵ الی ۱۰ µl/ml آغاز شده و در ۴۰ الی ۶۰ µl/ml به حدود ۵۰ درصد یا کمتر رسید. این تفاوت می‌تواند به ماهیت لیپوفیلیک ترکیبات اسانس و توانایی بالاتر آن‌ها در عبور از غشای سلولی و اختلال در یکپارچگی غشاء نسبت داده شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که اسانس‌های گیاهی به دلیل حضور ترپنوئیدها، اثرات قوی‌تری در القای مرگ سلولی نسبت به عصاره‌های آبی یا هیدروالکلی دارند (۳۱). Noruzpour و همکاران (۲۰۲۴)، گزارش کردند که اســـانس گیاه مورینگا () اثر سـیتوتوکسـیک شـدیدتری نسـبت به عصـاره بر روی لاین های سلول سرطانی دارند و این موضوع به حضور غنی‌تر ترپنوئیدهای فرّار نسـبت داده شـد که قادر به اختلال در عملکرد میتوکندری و القای مرگ ســـلولی وابســـته به کاســـپاز هســـتند (۳۲). این یافته نیز با نتایج این مطالعه هم‌راسـتا اسـت، جایی که اسـانس در غلظت‌های پایین‌تر نســـبت به عصـــاره موجب کاهش قابل توجه زنده‌مانی سـلول‌های AGS شـد. وابسـتگی اثر عصاره و اسـانس گیاه ســـنبله نقره‌ای به دُز و زمان احتمالاً ناشـــی از افزایش تدریجی دســـترســـی و تجمع ترکیبات زیســـت‌فعال در سـلول‌ها اسـت. به‌طوری‌که در غلظت‌ها و زمان‌های بالاتر، این ترکیبات با شـدت بیشـتری با سـاختارهای سـلولی برهم‌کنش داشـته و منجر به تشـدید پاسـخ‌های سـلولی می‌شوند. علاوه‌براین، در حضور هلیکوباکترپیلوری، افزایش

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

استرس اکسیداتیو می‌تواند این اثرات را تقویت کرده و در نهایت به کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلولی منجر گردد. این الگو بیانگر یک پاسخ وابسته به دوز و زمان در تعامل بین ترکیبات گیاهی و سیستم سلولی است. تفاوت مشاهده‌شده در فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین اسانس و عصاره گیاه سنبله نقره‌ای را می‌توان به تفاوت در ترکیب شیمیایی آن‌ها نسبت داد، به‌طوری‌که اسانس‌ها به‌دلیل دارا بودن ترکیبات فرار مانند ترپن‌ها و فنول‌ها، توانایی بیشتری در مهار رادیکال‌های آزاد دارند. این ویژگی می‌تواند در کاهش استرس اکسیداتیو القاشده توسط هلیکوباکترپیلوری و در نتیجه بهبود زنده‌مانی سلول‌های AGSنقش داشته باشد. در مقابل، عصاره به‌دلیل فقدان چنین ترکیبات مؤثری، اثر آنتی‌اکسیدانی ضعیف‌تری نشان داده و احتمالاً از نظر محافظت سلولی کارایی کمتری دارد. بنابراین، ارتباط مستقیمی بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و شدت اثرات سیتوتوکسیک مشاهده‌شده قابل استنباط است.

نتیجه‌گیری کلی

در مجموع، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای دارای فعالیت ضدباکتریایی قابل توجهی علیه هلیکوباکترپیلوری بوده و این اثر به‌صورت وابسته به غلظت افزایش می‌یابد. هم‌چنین، هر دو ترکیب اثرات سیتوتوکسیک وابسته به دُز و زمان بر سلول‌های AGS نشان دادند، به‌طوری‌که اسانس در مقایسه با عصاره از شدت اثر بیشتری برخوردار بود. این تفاوت احتمالاً به ماهیت لیپوفیلیک و حضور ترکیبات فرّار فعال در اسانس مربوط است که نفوذپذیری بالاتری در غشای سلولی دارند. علاوه‌براین، ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پاسخ‌های سلولی نشان داد که اسانس با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر می‌تواند در تعدیل استرس اکسیداتیو نقش مؤثرتری ایفا کند. در مدل هم‌کشتی، پاسخ سلولی تحت تأثیر شدت مواجهه با باکتری و ترکیبات گیاهی بوده و یک تعامل پیچیده بین اثرات آسیب‌زا و محافظتی مشاهده شد. به‌طور کلی، این یافته‌ها نشان‌دهنده پتانسیل گیاه سنبله نقره‌ای به‌عنوان یک منبع طبیعی برای توسعه ترکیبات ضد هلیکوباکتری و عوامل مؤثر بر مسیرهای سلولی مرتبط با سرطان معده است. با این حال، انجام مطالعات تکمیلی برای شناسایی دقیق مکانیسم‌های مولکولی و ارزیابی در شرایط درون‌تنی ضروری به نظر می‌رسد. از سویی نیز تغییرات مورفولوژیک مشاهده‌شده در سلول‌های AGS، شامل تبدیل شکل دوکی به کروی پس از تیمار با عصاره و اسانس گیاه سنبله نقره‌ای، می‌تواند به‌عنوان نشانه‌ای غیرمستقیم از فعال شدن مسیرهای مرگ برنامه‌ریزی‌شده در نظر گرفته شود. با این حال، با توجه به عدم انجام آزمون‌های اختصاصی مانند فلوسایتومتری، نمی‌توان به‌طور قطعی وقوع آپوپتوز را تأیید نمود. از این‌رو، انجام مطالعات تکمیلی شامل ارزیابی نشانگرهای مولکولی آپوپتوز در کنار روش‌های کمی، به‌عنوان مسیرهای پیشنهادی برای تحقیقات آینده توصیه می‌شود.

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می کنند که هیچ تضاد منافعی ندارند.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اردبیل که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نماییم.

منابع :

1. Borka Balas R, Meliț LE, Mărginean CO. Worldwide prevalence and risk factors of Helicobacter pylori infection in children. Children. 2022;9(9):1359.
2. Malfertheiner P, Camargo MC, El-Omar E, Liou J-M, Peek R, Schulz C, *et al*.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

Helicobacter pylori infection. Nature reviews Disease primers. 2023;9(1):19.

3. Yuan C, Adeloye D, Luk TT, Huang L, He Y, Xu Y, *et al*. The global prevalence of and factors associated with Helicobacter pylori infection in children: a systematic review and meta-analysis. The Lancet Child & Adolescent Health. 2022;6(3):185-94.
4. Lee Y-C, Dore MP, Graham DY. Diagnosis and treatment of Helicobacter pylori infection. Annual review of medicine. 2022;73:183-95.
5. Shirani M, Pakzad R, Haddadi MH, Akrami S, Asadi A, Kazemian H, *et al*. The global prevalence of gastric cancer in Helicobacter pylori-infected individuals: a systematic review and meta-analysis. BMC infectious diseases. 2023;23(1):543.
6. Ilic M, Ilic I. Epidemiology of stomach cancer. World journal of gastroenterology. 2022; 8 (12):1187
7. Elbehiry A, Marzouk E, Abalkhail A. Unraveling Helicobacter pylori: insights into pathogenesis, immune evasion, and progress toward effective vaccination. Vaccines. 2025;13(7):725.
8. Abdi S, Ataei S, Abroon M, Sanaye PM, Abbasinazari M, Farrokhian A. A comprehensive review of the role of complementary and dietary medicines in eradicating Helicobacter pylori. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. 2022;21(1):e127030.
9. Hamedani MP, Aram F, Hadjiakhoondi A, Samadi N, Tavakoli S ,Kiashi F, *et al*. Elucidation of apigenin derivatives from ethyl acetate fraction of Stachys byzantina with potent antioxidant and anti-Staphylococcus aureus properties. Traditional and Integrative Medicine. 2023:156-63.
10. Lima JAdS, Leite VC, Silva JP ,Ferrarez MA, Bahia GD, Rezende LVN, et al. Stachys byzantina K. Koch in the treatment of skin inflammation: A comprehensive evaluation of its therapeutic properties. ACS Omega. 2024;9(50):49899-912.
11. Molaeipour P, Ramezanzadeh M, Ramezanzadeh B. Stachys byzantina extract: A green biocompatible molecules source for graphene skeletons generation on the carbon steel for superior corrosion mitigation. Bioelectrochemistry. 2022;143:107970.
12. Dias SLG, Raspe DT, Júnior OdOS, Agneis MLG, Seiva FRF, Garcia VAdS, *et al*. Ethanolic Extract of Stachys byzantina Leaf: Optimization of Ultrasonic Probe-Assisted Extraction and Characterization. Plants. 2025;14(23):3636.
13. Mujtaba A, Ibrahim MS, Parveen S, Sarwar N, Alsagaby SA, Raza MA, *et al*. Comparative analysis of diagnostic techniques for Helicobacter pylori infection: Insights for effective therapy. Journal of Cellular and Molecular Medicine. 2025;29(6):e70487.
14. Hanidah U, Nabilla FA, Azkadhafina F, Hidayat TA, Putri NF, Zahra PA, *et al*. Antibiotics sensitivity test diffusion and dilution methods. Journal of Research in Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2023;2(1):38-47.
15. Kim Y-R, Boonyanugomol W, An W-j, Phuong TM, Park J-S, Shin M-K, *et al*. Regulation in the Expression of Virulence Factors of Helicobacter pylori by the Interaction between AGS Cells and H. pylori. Journal of Bacteriology and Virology. 2022;52(4):160-9.
16. Septya EN, Amelia R, Suharyani I. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) Extract of NADES Nail Henna Leaves Against Bacillus Cereus Bacteria. Consilium Sanitatis: Journal of Health Science and Policy. 2023;1(1):1-8.
17. Noruzpour M, Zakaria RA, Zare N, Bourang S, Ebrahimi HA, Granados-Principal S. Delivery of *Moringa oleifera* extract via PLA-PEG-FA/chitosan-PLA NPs into breast cancer cell lines. BioNanoScience. 2025;15(2):287.
18. Noruzpuor M, Asghari Zakaria R, Zare N, Ebrahimi HA, Parsa H, Bourang S. Green synthesis of metal nanoparticles using aqueous extract of *Moringa oleifera* L. and investigating their antioxidant and antibacterial properties. Applied Chemistry Today. 2024;19(71):283-302.
19. Egbe P, Umeaku C, Iheukwumere I, Iheukwumere C, Onwuasoanya U, Ezenwata I, *et al*. Helicobacter pylori Inhibition by Medicinal Plant Extracts :An *In Vitro*

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳
DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

Assessment. IPS Journal of Drug Discovery Research and Reviews. 2025;3(1):32-7.

20. Erhonyota C, Edo GI, Onoharigho FO. Comparison of poison plate and agar well diffusion method determining the antifungal activity of protein fractions. Acta Ecologica Sinica. 2023;43(4):684-9.
21. Karonen M. Insights into polyphenol–lipid interactions: Chemical methods, molecular aspects and their effects on membrane structures. Plants. 2022;11(14):1809.
22. Nourbakhsh F, Lotfalizadeh M, Badpeyma M, Shakeri A ,Soheili V. From plants to antimicrobials: Natural products against bacterial membranes. Phytotherapy Research. 2022;36(1):33-52.
23. Karaoglan ES, Gormez A, Yilmaz B, Kaci FN, Ozgen U. Composition and bioactivity of essential oil from Stachys macrostachya (Wend.) Briq. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 2021;93(3):e20200641.
24. Liu S, Liu J, Wang Y, Deng F, Deng Z. Oxidative Stress: Signaling Pathways, Biological Functions, and Disease. MedComm (2020). 2025;6(7):e70268.
25. Menaker RJ, Ceponis PJ, Jones NL. Helicobacter pylori induces apoptosis of macrophages in association with alterations in the mitochondrial pathway. Infect Immun. 2004;72(5):2889-98.
26. Alzahrani S, Lina TT, Gonzalez J, Pinchuk IV, Beswick EJ, Reyes VE. Effect of Helicobacter pylori on gastric epithelial cells. World J Gastroenterol. 2014;20(36):12767-80.
27. Selvakumaran J, Jell G. 20 - A guide to basic cell culture and applications in biomaterials and tissue engineering. In: Hench LL, Jones JR, editors. Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering: Woodhead Publishing; 2005. p. 215-26.
28. Uğur D, Güneş H, Güneş F, Mammadov R. Cytotoxic Activities of Certain Medicinal Plants on Different Cancer Cell Lines. Turk J Pharm Sci. 2017;14(3):222-30.
29. Carvour M, Song C, Kaul S, Anantharam V, Kanthasamy A, Kanthasamy A. Chronic low-dose oxidative stress induces caspase-3-dependent PKCdelta proteolytic activation and apoptosis in a cell culture model of dopaminergic neurodegeneration. Ann N Y Acad Sci. 2008;1139:197-205.
30. Jassbi AR, Miri R, Asadollahi M, Javanmardi N, Firuzi O. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (Stachys) plants. Pharm Biol. 2014;52(1):62-7.
31. Raina R, Verma PK, Peshin R, Kour H. Potential of Juniperus communis L as a nutraceutical in human and veterinary medicine. Heliyon. 2019;5(8):e02376.
32. Noruzpour M, Asghari Zakaria R, Zare N, Ebrahimi HA, Parsa H, Bourang S. Investigating the anticancer properties of the essential oil and aqueous extract of Moringa oleifera and its biosynthesized metal nanoparticles on MCF-7 and BT-549 cell lines. Iranian Journal of Breast Diseases. 2024;17(1):59-83.

مقاله پژوهشی، صفحات ۱۱۷-۱۳۳

DOI: 10.22034/cmr.2026.8742.3344

Investigation of the Effect of the Extract and Essential Oil of *Stachys byzantina* on the Viability of Gastric Cancer AGS Cells in a Co-Culture System with *Helicobacter pylori*

Hashem Yaghoubi*, Haleh Mokabber

Department of Biology, Ard.C., Islamic Azad University, Ardabil, Iran.

*Corresponding Author Email: yaghoubi_h@iau.ac.ir

Abstract

Helicobacter pylori is one of the major causes of gastrointestinal ulcers and gastric cancer and plays a significant role in chronic gastric mucosal inflammation and the progression of ulcer-related diseases. In this context, the medicinal plant *Stachys byzantina*, due to its antioxidant, antimicrobial, and anticancer properties, has attracted attention as a potential therapeutic candidate. The aim of this study was to investigate the effect of the extract and essential oil of *S. byzantina* on the viability of *H. pylori* and gastric adenocarcinoma (AGS) cells under co-culture conditions. After confirming the presence of *H. pylori* using urease and catalase tests, the methanolic extract and essential oil of the plant were obtained. Following the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of these compounds against the bacterial strain, the viability of AGS cells in co-culture with *H. pylori* was assessed using the MTT assay, and antioxidant activity was evaluated using the DPPH method. One-way ANOVA was used for statistical analysis, and all experiments were performed in triplicate with a significance level of $p< 0.05$. The agar well diffusion assay showed that the highest antimicrobial activity of the *S. byzantina* extract was observed at 40 mg/ml. MIC and MBC results demonstrated that the methanolic extract inhibited *H. pylori* growth at 25 mg/ml but did not exhibit a complete bactericidal effect, whereas the essential oil inhibited bacterial growth at 30 µl/ml and achieved complete eradication at 60 µl/ml. MTT assay results indicated that co-culture of *H. pylori* and AGS cells did not significantly affect AGS cell viability. In contrast, both the extract and essential oil of *S. byzantina* induced a significant, dose- and time-dependent reduction in AGS cell viability, with the essential oil showing stronger cytotoxic effects. Additionally, DPPH assay results revealed that the essential oil possessed considerable antioxidant activity.

Keywords: Essential oil, Co-culture system, *Stachys byzantine*, *Helicobacter pylori*, AGS