

بررسی ترکیبات و خصوصیات شیمیایی عصاره گل گندم روی رده سلولی سرطان کولون و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی

چکیده

دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۱ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۱ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۹/۳۰

زمینه و هدف: گیاه گل گندم (*Centaurea cyanus*) یکی از گیاهان بومی ایران است که از نظر طب سنتی دارای اهمیت است. هدف از این پژوهش، بررسی ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره گل گندم، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضدسرطانی و آنالیز بیان ژن‌های آپوپتوزی است.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی که از خرداد تا دی ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین انجام گرفت، ابتدا ترکیبات شیمیایی عصاره گل گندم توسط روش گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی مورد بررسی قرار گرفت. عصاره جهت بررسی اثرات ضدباکتریایی روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *سودوموناس آنروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* با روش کمترین غلظت مهارکنندگی مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین اثرات آنتی‌اکسیدانی آن با روش احیای رادیکال آزاد و اثرات ضدسرطانی آن با روش رنگ‌سنجی بررسی شد. در نهایت میزان بیان ژن‌های آپوپتوز *Bax* و *Bcl2* با روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: آنالیز ترکیبات شیمیایی عصاره تعداد ۱۹ ترکیب را نشان داد که بیشترین آن مربوط به n-هگزادکانوئیک اسید و لینولئیک اسید بودند. عصاره بیشترین تاثیر را روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آنروژینوزا* داشت. همچنین، که عصاره مورد مطالعه دارای اثر آنتی‌اکسیدانی ۵۰٪ برابر با ۰/۱۰۹/۰۷ mg/ml بود. علاوه بر آن، عصاره دارای سمیت سلولی ۵۰٪ معادل با ۰/۴۵±۰/۲۶ بود. نتایج Real-time PCR افزایش بیان ژن *Bax* ۰/۵۴±۰/۶۳ (P<۰/۰۵) و کاهش بیان *Bcl2* به میزان ۰/۳۸±۰/۷۲ (P<۰/۰۵) شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به نظر می‌رسد که عصاره گل گندم دارای اثرات چشمگیر ضد میکروبی و ضدسرطانی می‌باشد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان یکی از گیاهان بومی کشورمان پتانسیل استفاده در صنایع دارویی را داشته باشد.

کلمات کلیدی: گل گندم، گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی، خاصیت ضد میکروبی، آپوپتوز، Real-time PCR

امیر میرزایی^۱

شهره زارع کاریزی^{۲*}

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پیشوا-ورامین، ورامین، ایران.

* نویسنده مسئول: ورامین-پیشوا، شهرک نقش جهان،

دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، کدپستی

۷۴۸۹-۳۳۸۱۷

تلفن: ۰۲۱-۳۶۲۵۰۱۱

E-mail: shohrehzare@yahoo.com

مقدمه

به‌علت پیدایش عوارض نامطلوب و جانبی داروهای سنتتیک و عدم سازگاری آن‌ها با طبیعت انسان، بار دیگر توجه دانشمندان و پژوهشگران به گیاه‌درمانی و مواد مؤثره موجود در گیاهان دارویی معطوف گردیده است.^{۱،۲} همچنین، کم بودن عوارض جانبی داروهای گیاهی و گوناگونی ترکیبات مؤثره آن‌ها سبب شده است تا با وجود بودن داروهای شیمیایی، گیاهان دارویی از اهمیت ویژه‌ای خاصی برخوردار شوند. از این رو گرایش مطالعات بیولوژیک به‌سمت استفاده از گیاهان دارویی جهت موارد درمانی رو به افزایش است.^۳

از نقطه‌نظر تاریخی، گیاهان اهمیت فراوانی در طب سنتی دارند و پژوهش‌های وسیعی برای یافتن فراورده‌ها و مواد دارویی گیاهی از زمان‌های قدیم انجام شده است، اما نکته بااهمیت این است که درصد کمی از گونه‌های گیاهی به‌عنوان منبع ترکیبات دارویی مورد استفاده قرار گرفته‌اند.^۴ با توسعه سریع داروهای شیمیایی در سال‌های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی تا حد زیادی نادیده گرفته شده است، ولی

اشاره نمود که در طب سنتی کاربرد گسترده‌ای دارد. گل گندم گیاهی است یک‌ساله از خانواده کاسنی (Asteraceae) که در ایران، عراق، ترکیه و پاکستان و در برخی از کشورهای اروپایی یافت می‌شود.^{۱۷} گل‌های این گیاه دارای ترکیبات مؤثره مانند پروتوسیانین، مواد مومی و تانن‌ها می‌باشد.^{۱۸} تاکنون مطالعات زیادی در زمینه بررسی اثرات بیولوژیک گونه‌های جنس *Centaurea* انجام گرفته است.

هدف از این مطالعه بررسی فیتوشیمیایی ترکیبات تشکیل‌دهنده عصاره گل گندم با روش کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنجی جرمی (Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدباکتریایی آن می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی از خرداد تا دی ۱۳۹۵ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین انجام گرفت. ابتدا گیاه گل گندم از مرکز ذخایر زیستی ایران با شماره هرباریومی IBRCPI009829 تهیه شد. مواد گیاهی گردآوری شده پس از تمیز نمودن، در سایه خشک شده و توسط آسیاب پودر گردید و در شرایط بهینه و مناسب نگهداری شد. برای تهیه عصاره اتانولی، میزان ۴۰ g از گیاه را به ۱۰۰ ml از اتانول اضافه نموده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شد. عصاره به‌دست‌آمده توسط کاغذ صافی فیلتر شده و وارد دستگاه روتاری شد.

آنالیز گاز کروماتوگرافی متصل به طیف نگار جرمی (GC-MS) عصاره گیاه گل گندم با Agilent 6890 Gas Chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) انجام گرفت. نوع ستون DB-5، طول ستون ۳۰ m و قطر داخلی ۰/۲۵ mm بود و برای ردیابی از سامانه پوینزاسیون الکترونی با انرژی ۷۰ eV استفاده شد. برنامه‌ریزی حرارتی ستون از ۵۰ تا ۲۵۰ °C با سرعت افزایش دمای ۶ °C در دقیقه انجام گرفت. گاز حامل هلیوم ۹۹/۹۹٪ و مقدار تزریق ۱ μl و سرعت جریان گاز ۱۵ ml در دقیقه تنظیم شده بود. حجم ۱ μl از عصاره گیاه به دستگاه GC-MS تزریق شد و سپس نتایج به‌دست‌آمده از دستگاه بر اساس اندیس کواتس و مراجعه به فرهنگ طبیعی ترکیبات طبیعی مورد شناسایی قرار گرفت.

تفسیر طیف‌های GC-MS با استفاده از دیتابیس‌های National Institute Standard and Technology (NIST) که بیش از ۶۲۰۰۰

امروزه پژوهش و گسترش داروهای جدید با منشای گیاهی به‌عنوان یک راهکار مناسب و اقتصادی اهمیت خاصی پیدا کرده است، به‌طوری‌که هم‌اکنون بیش از ۳۰٪ داروهای گیاهی، در بیمارستان‌ها و کلینیک‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند.^{۱۹} از آنجایی که گیاهان دارویی در کشور ما فراوان می‌رویند، بررسی اثرات بیولوژیک آن‌ها می‌تواند گامی مثبت در شناسایی و استفاده بهینه از این ثروت ملی با ارزش باشد.^۹

همچنین از نقطه‌نظر بالینی، استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌های باکتریایی منجر به پیدایش ایزوله‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک گردیده است که هر روز بر تعداد آن‌ها افزوده می‌شود. پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تلاش برای یافتن به عوامل ضد میکروبی جدید را ضروری می‌کند.^{۱۰} همچنین، گیاهان و ترکیبات برگرفته از آن‌ها شامل اسانس‌ها و عصاره‌ها علاوه بر دارا بودن خواص آنتی‌باکتریال، دارای توانی بالقوه جهت استفاده در درمان بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان هستند، درحالی‌که عوارض جانبی این ترکیبات در مقایسه با داروهای شیمیایی کمتر است.^{۱۱}

به‌طور کلی، سرطان اولین علت مرگ‌ومیر در کشورهای توسعه‌یافته و دومین علت مرگ در کشورهای درحال توسعه است. تنوع و گستردگی شیوع سرطان در طول سال‌های گذشته موجب ایجاد روش‌های متنوع درمانی شده است، اما با وجود تلاش‌های فراوان در زمینه پیشگیری و درمان سرطان، این بیماری رشد فزاینده‌ای داشته و همچنان یک عامل مرگ‌ومیر در کل جهان می‌باشد.^{۱۲} سرطان کولون یکی از رایج‌ترین سرطان‌ها به‌شمار می‌رود، و این نوع سرطان در مردان پس از سرطان ریه به‌عنوان شایع‌ترین نوع سرطان است.^{۱۳،۱۴}

امروزه از روش‌های مختلف جراحی، شیمی‌درمانی و پرتو درمانی جهت درمان سرطان استفاده می‌شود، ولی یکی از معایب و عوارض جانبی این روش‌ها از بین بردن سلول‌های سالم می‌باشد که این امر باعث شده است که پژوهش‌گران به‌سمت روش‌های جدید درمان با کاهش عوارض جانبی پیش روند.^{۱۵،۱۶} یکی از روش‌های درمان که به‌تازگی مطالعات زیادی روی آن‌ها انجام شده است، استفاده از گیاهان و عصاره‌های آن‌ها برای درمان سرطان است. از جمله این گیاهان می‌توان به گیاه گل گندم (*Centaurea cyanus*)

انکوبه شد. پس از این مدت، میزان رشد میکروبی با میزان جذب در طول موج ۶۲۰ nm خوانده شد و میزان MIC تعیین گردید.

به منظور بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه گل گندم، روش مهار رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) انجام شد. ابتدا عصاره با غلظت‌های ۰/۲۵، ۱، ۱/۲۵، ۱/۵، ۲ ساخته شد و سپس عصاره با حجم برابر از محلول DPPH (Merck, Darmstadt, Germany) با غلظت ۱ mg/ml مخلوط گردید. پس از مدت زمان ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ °C، میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۱۵ nm خوانده و درصد مهار رادیکال DPPH براساس فرمول زیر محاسبه شده و در نهایت میزان IC50 مشخص گردید.

$Inhibition(\%) = \frac{[Ab-As]}{[Ab]} \times 100$: جذب شاهد، As: جذب نمونه لازم به یادآوری است که در این تست از آسکوربیک اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. جهت انجام تست سمیت سلولی رده سلولی سرطان کولون (HT29 cell line) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری شد. ابتدا سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 (Biosera, Bellbrook Industrial Estate, UK) غنی شده با ۱٪ (v/v) پنی‌سیلین - استرپتومایسین و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum, FBS) کشت داده شدند و در دمای ۳۷ °C و ۵٪ رطوبت قرار داده شدند.

به منظور بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره گیاه گل گندم از روش رنگ‌سنجی Microculture tetrazolium test, MTT (Sigma Aldrich, Germany) استفاده شد. ابتدا غلظت‌های ۱/۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/ml از عصاره گیاه گل گندم در فاصله زمانی ۲۴ ساعت بر روی رده سلولی سرطانی کولون (HT29) در پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای تیمار شدند. پس از گذشت زمان فوق، محتوای چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای به دقت خارج شد و به آن رنگ MTT اضافه شد و به مدت چهار ساعت تحت شرایط ۵٪ CO₂ و دمای ۳۷ °C انکوبه شدند. سپس رنگ MTT، جداسازی شد و محتویات چاهک‌ها در ایزوپروپانول حل گردید. در نهایت جذب نمونه‌ها با استفاده از ELISA reader (Organon Teknika, Boxtel The Netherlands) در طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد و میزان کشتندگی سلول توسط فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰ × (جذب نوری سلول‌های کنترل/جذب نوری سلول‌های تیمار شده) = میزان بقای سلولی

الگو دارد، انجام شد. طیف‌های جرمی ناشناخته با طیف‌های شناخته‌شده موجود در کتابخانه NIST مقایسه شد. نام، وزن مولکولی و ساختار ترکیب مواد جداسازی شده تایید شد.

عصاره گیاهی خشک‌شده با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ mg/ml تهیه شد و به وسیله فیلتراسیون با فیلترهای ۴۵ میکرومتری استریل شدند. بررسی تست ضد میکروبی عصاره توسط روش انتشار دیسک علیه سویه‌های باکتریایی *Staphylococcus aureus* ATCC 25923، *Klebsiella pneumoniae* ATCC 19615، *Streptococcus pyogenes* ATCC 13883 و *Pseudomonas aureoginosa* ATCC 27853 انجام گرفت. ابتدا ۱۰۰ μl از سوسپانسیون باکتری‌های فوق در محیط کشت مولر هیتتون آگار کشت داده شد. دیسک‌های بلانک (Antibiotics) paper disk، Padtan Teb Inc., Tehran, Iran) با ۱۰ μl از عصاره در غلظت‌های مدنظر آغشته گردید و روی محیط‌های مورد نظر قرار داده شد.

همچنین از آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به منزله نمونه استاندارد مثبت برای تعیین حساسیت هر گونه میکروب مورد آزمایش، استفاده شد. پلیت‌های محیط کشت حاوی دیسک در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فعالیت ضد میکروبی از طریق اندازه‌گیری هاله ممانعت از رشد تعیین شد. لازم به یادآوری است که این تست سه بار تکرار گردید.

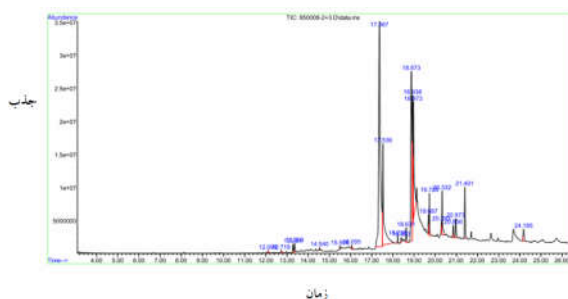
بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره توسط روش حداقل غلظت مهاری (MIC) انجام شد. MIC به کمترین غلظت از ترکیبات که رشد میکروارگانیسم را مهار می‌نماید، گفته می‌شود. بدین منظور، ابتدا باکتری‌های مدنظر در محیط کشت مایع به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ °C انکوبه شدند و به دنبال آن با استفاده لوله نیم‌مک‌فارلند رقیق شدند. سپس رقت‌های متوالی از عصاره گل گندم در محدوده غلظت ۳/۹-۵۰۰ mg/ml (۳/۹، ۷/۸، ۱۵/۶۲، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰) تهیه گردید. پس از آن پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای به کمک توزیع ۹۵ μl از محیط مولر هیتتون برات، ۵ μl از تلقیح میکروبی و ۱۰۰ μl از عصاره گل گندم با غلظت‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. چاهک آخر شامل ۹۵ μl محیط مولر هیتتون برات با ۵ μl از باکتری‌های منتخب در هر ردیف به منزله نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. محتویات هر چاهک روی شیکر به مدت ۶۰ ثانیه با دور ۱۰۰ rpm مخلوط گردید و سپس در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت

به طوری که نتایج تجربی به صورت انحراف از معیار SEM ± نشان داده شد.

یافته‌ها

آنالیز کروماتوگرام GC-MS عصاره گیاه گل گندم ۱۹ پیک را نشان داد که نشان‌دهنده وجود ترکیبات فیتوشیمیایی موجود در گیاه می‌باشد (نمودار ۱). با مقایسه طیف‌ها با داده‌های کتابخانه NIST، ۱۹ ترکیب شیمیایی شناسایی شد. از میان ترکیبات شناسایی شده *n*-Hexadecanoic acid (۳۶/۴۶۹٪) و *Linoleic acid* (۱۹/۳۰۶٪) دارای بیشترین درصد مواد تشکیل‌دهنده بودند. *n*-Hexadecanoic acid یا پالمیتیک اسید با فرمول شیمیایی $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ یک اسید چرب اشباع شده است که جرم مولی آن ۲۵۶/۴۲ g/mol است. شکل ظاهری این ترکیب، بلورهای سفید است. همچنین، اسید لینولئیک (*Linoleic acid*) یک اسید چرب با فرمول شیمیایی $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ است و شکل ظاهری این ترکیب، روغن بی‌رنگ است.

اثرات ضد میکروبی عصاره الکلی گیاه گل گندم با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ mg/ml انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره گیاه مدنظر روی تمامی باکتری‌های مورد مطالعه خاصیت ضد میکروبی دارد، به طوری که بیشترین هاله عدم رشد در غلظت ۲۰۰ mg/ml از عصاره به دست آمد. همچنین بیشترین قطر هاله عدم رشد برای باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به دست آمد و کمترین آن مربوط بود به باکتری کلبسیلا پنومونیه (جدول ۱).



نمودار ۱: کروماتوگرام GC-MS عصاره گل گندم

همان‌طور که در کروماتوگرام مشاهده می‌شود آنالیز GC-MS تعداد ۱۹ پیک را نشان می‌دهد که نشان‌دهنده ۱۹ ترکیب مختلف می‌باشد.

همچنین میزان دوز ۵۰٪ کشندگی (*IC50* یا *Half maximal inhibitory concentration*) نیز محاسبه شد.

میزان بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* با استفاده از روش Real-time PCR سنجیده شد. در ابتدا کل RNA سلول‌های تیمارشده و نشده با استفاده از RNA extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) براساس دستورکار آن استخراج شد و غلظت آن توسط Nanophotometer™ (Implen GmbH, München, Germany) اندازه‌گیری شد. ساخت مولکول‌های DNA مکمل با RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania) گرفت که در آن مخلوط واکنش حاوی ۵ μl بافر واکنش ۵x، ۱ μg RNA، ۰/۵ μl آغازگر شش نوکلئوتیدی تصادفی، ۱۰ میلی‌مولار)، الیگو dT، ۲ μl مخلوط داکسی نوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی‌مولار)، ۱ μl مهارکننده آنزیم RNase (۲۰ واحد در میکرولیتر)، ۱ μl آنزیم رونوشت‌برداری معکوس و آب مقطر دو بار تقطیر (تا حجم نهایی ۲۰ μl) بود. برنامه دمایی-زمانی به صورت ۲۵ °C به مدت پنج دقیقه (برای اتصال آغازگر)، ۴۲ °C به مدت ۶۰ دقیقه (ساخت cDNA)، ۷۰ °C به مدت پنج دقیقه (غیر فعال شدن رونوشت‌بردار معکوس) و ۴ °C به مدت پنج دقیقه (برای انجام گرفت. پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های هدف *Bcl2*، *Bax* بوده و ژن *GAPDH* به عنوان کنترل داخلی مورد استفاده قرار گرفت. توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف *Bax* به صورت 5'-TTGCTTCAGGGTTTCATCCAG-3' جلویی، ۶۸ °C دمای برگشتی، 5'-AGCTTCTGGTGGACGCATC-3' برگشتی، ۶۵/۳ °C دمای توالی آغازگرهای جلویی و برگشتی ژن هدف *Bcl2* به صورت 5'-TGTGGATGACTGAGTACCTGAACC-3' جلویی، ۶۷ °C دمای برگشتی، ۶۷/۳ °C دمای مرجع *GAPDH* به صورت 5'-CGTCTGCCCTATCAACTTTCG-3' جلویی، ۶۶/۹ °C دمای برگشتی، ۶۳/۴ °C دمای برگشتی، 5'-CGTTTCTCAGGCTCCCTCT-3' برگشتی، ۹۵ °C یک دقیقه، ۹۵ °C ۱۵ ثانیه، ۶۰ °C ۶۰ ثانیه انجام گرفت.

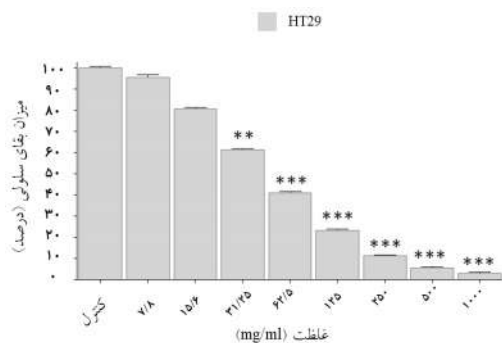
در این مطالعه تمامی تست‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد و نتایج توسط SPSS software, version 20 (IBM SPSS, Armonk, NY, USA) آنالیز گردید و $P < ۰/۰۵$ معنادار در نظر گرفته شد.

جدول ۱: نتایج تست اثر ضدباکتریایی عصاره گیاه گل گندم علیه برخی باکتری‌های پاتوژن

عصاره (mg/ml)	اندازه هاله عدم رشد باکتری‌های مورد مطالعه (mm)			
	استافیلوکوکوس اورئوس	استرپتوکوکوس پایوژنز	سودوموناس آنروژینوزا	کلبسیلا پنومونیه
۰	۰	۰	۰	۰
۲۵	۰/۲۸±۶/۸	۰/۲۲±۶/۲	۰/۸۹±۵/۵	۰/۵۶±۴
۵۰	۰/۷۶±۷/۴	۰/۶۴±۶/۹	۶/۵±۰/۷۲	۰/۲۸±۵/۱
۱۰۰	۰/۵۶±۹/۸	۰/۳۸±۷/۳	۰/۷۹±۶/۸	۰/۷۵±۵/۹
۲۰۰	۰/۶۶±۱۳/۷	۰/۶۵±۱۰/۴	۰/۴۹±۷/۱	۰/۶۴±۶/۶
آمی سیلین	۰/۳۲±۱۵/۶	۰/۷۱±۱۵/۳	۰/۹۸±۱۴/۲	۰/۵۲±۱۰/۵

جدول ۲: نتایج MIC عصاره گل گندم در سویه‌های منتخب

نام باکتری	MIC (mg/ml)
استافیلوکوکوس اورئوس	۳/۹
استرپتوکوکوس پایوژنز	۷/۸۱
سودوموناس آنروژینوزا	۱۵/۶
کلبسیلا پنومونیه	۳۱/۲۵



نمودار ۲: درصد بقای سلول‌های کولون در برابر غلظت‌های مختلف عصاره گل گندم در مدت زمان ۲۴ ساعت

نتایج به صورت درصد بقا در مقایسه با نمونه‌های کنترل گزارش شده است (* P<۰/۰۵, ** P<۰/۰۱, *** P<۰/۰۰۱, n=۳).

۲۳/۴۹±۰/۸۲ (P<۰/۰۰۱)، ۱۱/۲۱±۰/۳۳ (P<۰/۰۰۱)، ۵/۸۷±۰/۶۵ (P<۰/۰۰۱) و ۳/۰۶±۰/۹۷ (P<۰/۰۰۱) درصد شد (نمودار ۲). نتایج نشان داد که عصاره گیاه گل گندم در غلظت ۱۰۰۰ mg/ml بیشترین مهار تکثیر سلولی را داشته است که از نظر آماری معنادار است (P<۰/۰۰۱)، در حالی که غلظت‌های ۷/۸ و ۱۵/۶ mg/ml نسبت به گروه کنترل اختلاف معناداری را نشان ندادند و از نظر آماری معنادار نبوده است (P>۰/۰۵). همچنین میزان مهار ۵۰٪ (IC₅₀) برای عصاره در مدت زمان ۲۴ ساعت در رده سلولی سرطانی کولون، ۲۶۷۰±۰/۴۵ mg/ml محاسبه شد.

تغییر در بیان ژن‌های آپوپتوزی *Bax* و *Bcl2* در سلول‌های سرطانی کولون (HT29) تیمار شده با غلظت IC₅₀ عصاره با استفاده

همچنین، نتایج حاصل از MIC عصاره الکلی گیاه گل گندم در جدول ۲ آمده است. همان‌طور که در جدول نشان داده شده است، میزان MIC عصاره برای باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استرپتوکوکوس پایوژنز*، *سودوموناس آنروژینوزا* و *کلبسیلا پنومونیه* به ترتیب ۳/۹، ۷/۸۱، ۱۵/۶ و ۳۱/۲۵ mg/ml بود.

نتایج اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره گیاه گل گندم نشان داد که عصاره مدنظر دارای IC₅₀=0.109 ±0.07 mg/ml اثر آنتی‌اکسیدانی می‌باشد، در صورتی که نمونه استاندارد آسکوربیک اسید دارای اثر آنتی‌اکسیدانی ۰/۵۰٪ مهارکنندگی IC₅₀= 0.03±0.0001 mg/ml بود.

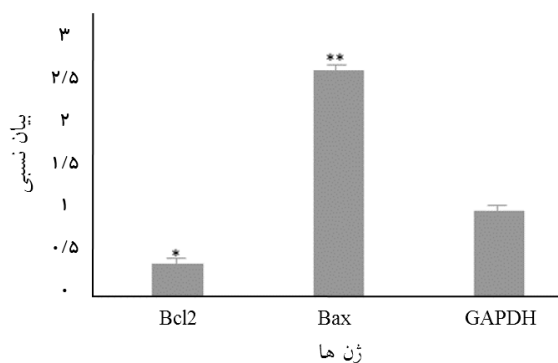
تیمار سلول‌های سرطانی کولون (HT29) با غلظت‌های مختلف از عصاره با استفاده از تست MTT طی مدت زمان ۲۴ ساعت انجام شد. تیمار سلول‌های سرطان کولون با غلظت‌های ۷/۸، ۱۵/۶، ۳۱/۲۵، ۶۲/۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ mg/ml از عصاره گل گندم طی مدت ۲۴ ساعت به ترتیب سبب کاهش بقای سلول‌ها به میزان ۹۵/۶۲±۰/۹۱ (P>۰/۰۵)، ۸۰/۷۹±۰/۴۸ (P>۰/۰۵)، ۶۱/۳۸±۰/۸۸ (P<۰/۰۱) و ۴۱±۱/۴ (P<۰/۰۰۱).

Linoleic acid و (۳۶/۴۶۹٪) است. n-هگزادکانوئیک اسید (n-Hexadecanoic acid) یا پالمیتیک اسید با فرمول شیمیایی $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ ، یک اسید چرب اشباع شده است و مطالعات نشان می‌دهد که این ترکیب دارای خاصیت آنتی‌باکتریال و ضدسرطانی می‌باشد.^{۲۰} همچنین، اسید لینولئیک (Linoleic acid) یک اسید چرب با فرمول شیمیایی $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{O}_2$ است و گزارشات نشان داده است که این ترکیب دارای خاصیت آنتی‌باکتریال می‌باشد.^{۲۱}

مطالعات مختلفی در سرتاسر جهان در زمینه بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گونه‌های مختلف جنس *Centaurea* به انجام رسیده است. *Yayli* و همکاران اسانس *Centaurea sessilis* و *Centaurea armena* را با روش گاز کروماتوگرافی طیف‌سنج جرمی (GC-MS) مورد بررسی قرار دادند. چهل ترکیب در اسانس این دو گیاه شناسایی شد به طوری که Taxons β -eudesmol بیشترین و اصلی‌ترین ترکیب شناسایی شده بود. در ادامه فعالیت ضد میکروبی اسانس این گیاهان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسانس این گیاهان فعالیت ضدباکتریایی متوسط در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارد، اما هیچ فعالیت ضد قارچی مشاهده نشد.^{۲۲}

در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۶، ترکیبات اسانس گیاه *Centaurea choulettiana* Pomel را با روش GC-MS مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که اسانس این گیاه دارای ۴۰ ترکیب می‌باشد که بیشترین ترکیب مربوط به ترکیبات کربونیلی (۳۲/۶۱٪) و کمترین مقدار مربوط به ترکیبات هیدروکربنی (۲۴/۶٪) است.^{۳۳} یکی از دلایلی که ممکن است ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره‌های یک جنس از یک گیاه ولی گونه‌های مختلف متفاوت باشد، می‌تواند به دلیل نوع منطقه جغرافیایی و محل رشد این گیاه باشد.

یکی دیگر از اهداف این مطالعه بررسی اثرات ضدباکتریایی عصاره گل گندم بود. نتایج ضد میکروبی مطالعه ما نشان داد که عصاره گل گندم بیشترین تاثیر را روی باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* و کمترین تاثیر را روی *کلبسیلا پنومونیه* دارد. به طور کلی خواص آنتی‌باکتریال عصاره‌های گیاهی روی باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی بیشتر می‌باشد که می‌تواند به دلیل وجود غشای پلی ساکارییدی خارجی باکتری‌های گرم منفی باشد و سبب محدود شدن نفوذ عصاره به درون این لایه می‌گردد. یکی از مکانیسم‌های مهم



نمودار ۳: میزان بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax* نسبت به کنترل

نسبت بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax* به ژن مرجع در رده سلولی سرطان کولون تیمار شده به میزان کاهش و 0.38 ± 0.072 ($P < 0.05$) کاهش و 2.63 ± 0.054 ($P < 0.05$) افزایش طی ۲۴ ساعت مشاهده شد.

از روش Real-time PCR پس از ۲۴ ساعت ارزیابی شد. تکثیر اختصاصی قطعات ژنی مورد نظر، عدم جفت شدن آغازگرها و عدم تکثیر قطعات غیر اختصاصی برای هر ژن با استفاده از منحنی ذوب تعیین شد. همچنین، نسبت بیان ژن‌های *Bcl2* و *Bax* به ژن مرجع در رده سلولی سرطان کولون تیمار شده به میزان 0.38 ± 0.072 ($P < 0.05$) کاهش و 2.63 ± 0.054 ($P < 0.05$) افزایش در مدت ۲۴ ساعت مشاهده شد (نمودار ۳).

بحث

استفاده از داروهای گیاهی همیشه در طب سنتی برای انواع بیماری‌ها توصیه شده است و یکی از کاربردهای گیاهان دارویی استفاده از خاصیت ضدتوموری و خاصیت ضدباکتریایی آن‌ها است.^{۱۹} در این مطالعه تلاش شد که اولین گزارش مربوط به شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی عصاره گیاه گندم، بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدباکتریایی آن در شرایط آزمایشگاهی ارائه شود. در این مطالعه، ابتدا عصاره گیاه گل گندم توسط روش ماسراسیون تهیه گردید و سپس عصاره جهت شناسایی ترکیبات فیتوشیمیایی آن تحت آنالیز GC-MS قرار گرفت. نتایج GC-MS نشان داد که ۱۹ ترکیب اصلی تشکیل‌دهنده ۹۹/۹۹٪ کل عصاره می‌باشد و بیشترین ترکیب آن مربوط به n-Hexadecanoic acid

کشندگی IC50 برابر با ۱۴ و ۱۸/۳ µg/ml می‌باشد.^{۲۸} با توجه به نتایج مطالعه ما به نظر می‌رسد که عصاره گیاه *Centaurea cyanus* دارای میزان کشندگی چشمگیر بوده و یکی از دلایل اثرات سیتوتوکسیک آن می‌تواند وجود ترکیباتی مانند Oleic acid, Linoleic acid و 1,2- Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester در عصاره این گیاه باشد، به طوری که مطالعات نشان داده است که این ترکیبات دارای اثرات ضدسرطانی می‌باشند. همچنین وجود ترکیبات آنتی‌اکسیدان نیز می‌تواند دلیل محکم‌تری برای اثبات آن باشد.^{۲۹}

در پژوهش کنونی اثرات آپوپتوزی عصاره گیاه گل گندم بر روی رده سلولی کولون توسط روش Real-time PCR مورد مطالعه قرار گرفت. به طور کلی القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا آپوپتوز یکی از رویکردهای مهم در درمان سرطان به‌شمار می‌رود. مسیر مرگ سلولی می‌تواند شامل فعال‌سازی رویدادهای پروآپوپتوتیک در سلول باشد که با نفوذپذیری غشا اندامک میتوکندری توسط پروتئین‌های Bax و Bak شروع شده و موجب آزادسازی سیتوکروم c از آن و در نهایت فعال شدن کاسپاز ۹ و سپس کاسپاز سه می‌شود. علاوه بر این پروتئین‌های Bcl1 و Bcl2 با قرار گرفتن در سطح شبکه اندوپلاسمی، میتوکندری و هسته از کنار هم قرار گرفتن پروتئین‌های Bax و Bak جلوگیری می‌نماید بنابراین فعالیت ضد آپوپتوزی نشان می‌دهند.^{۳۱}

در پژوهش کنونی اثرات عصاره گیاه گل گندم در افزایش بیان ژن پروآپوپتوتیک Bax و کاهش بیان ژن Bcl2 در سلول‌های سرطانی کولون و القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نشان داده شد. بنابراین بررسی‌های بیشتری لازم است تا بتوان اثبات کرد که آیا پروتئین‌های mRNA این ژن‌ها می‌تواند مدرکی برای نقش آن در پیش‌گویی اختصاصی و دقیق‌تر پاسخ سرطان به درمان باشد؟

در نهایت پیشنهاد می‌شود که اثرات سیتوتوکسیک و ضدباکتریایی عصاره گل گندم در شرایط *In vivo* و مدل‌های موشی انجام گیرد تا بتوان از این عصاره به‌عنوان یک ترکیب دارویی کاندید مورد استفاده قرار داد. به‌طور کلی، نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره گیاه گل گندم دارای اثرات ضدباکتریایی، سیتوتوکسیک و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بنابراین به‌احتمالی بتوان این عصاره را به‌عنوان کاندید دارویی ضدسرطانی و ضد میکروبی استفاده کرد و به مراکز دارویی پیشنهاد کرد.

ضدمیکروبی عصاره گل گندم می‌تواند خاصیت آگزیزی برخی از ترکیبات این عصاره می‌باشد که موجب نفوذ آن به لیپیدهای غشای سلول‌های باکتری می‌شود و ساختمان سلولی را مختل می‌کند و موجب خروج و نشست یون‌ها و دیگر محتویات سلولی می‌شود.^{۲۴}

مطالعات مختلفی در مورد خاصیت ضدباکتریایی عصاره‌های جنس گیاه *Centaurea* انجام شده است. Cansaran و همکاران، خواص ضدباکتریایی عصاره‌های هگزانی، متانولی و اتیل استاتی *Centaurea cankiriense* را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی قسمت گل این گیاه دارای بیشترین میزان فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد.^{۲۵} Astari و همکاران خاصیت ضدباکتریایی عصاره گیاه *Centaurea cadmea Boiss* را روی باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *سالمونلا تیفی موربوم*، *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هگزانی این گیاه بیشترین تاثیر را روی باکتری *انتروکوکوس فکالیس* دارد،^{۲۶} در صورتی که پژوهش کنونی نشان داد که عصاره الکی *Centaurea cyanus* بیشترین تاثیر را روی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *سودوموناس آئروژینوزا* دارد.

همچنین، از نقطه نظر سمیت سلولی، نتایج مطالعه ما نشان داد که اثر کشندگی سلول‌ها توسط عصاره گل گندم، بستگی به زمان و غلظت آن دارد، به طوری که مقدار IC50 محاسبه شده برای آن ۲۶/۰۴±۰/۴۵ mg/ml علیه رده سلولی سرطانی کولون بود که نشان‌دهنده قدرت کشندگی این عصاره است. مطالعات مختلفی روی بررسی اثرات سمیت سلولی عصاره گیاهان این جنس روی رده‌های سلولی سرطانی مختلف انجام گرفته است. Behzad و همکاران میزان سمیت سلولی عصاره دو گونه از *Centaurea* به نام *Centaurea aucheri* و *Centaurea pseudoscabiosa subsp pseudoscabiosa* را روی رده‌های سلولی سرطان سینه (MCF7)، سرطان کبد (HepG2) و سرطان کولون (HT29) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این عصاره به ترتیب دارای غلظت کشندگی IC50 برابر با ۹۸/۱۵، >۱۰۰ mg/ml >۱۰۰ روی رده‌های سلولی بودند.^{۲۷} Erel و همکارانش اثرات سیتوتوکسیک عصاره *Centaurea calolepis* را روی رده سلولی سرطان پوست و سینه (BT-549) مورد مطالعه قرار دادند. نتایج این مطالعه نشان داد که این عصاره به ترتیب دارای غلظت

گیاه گل گندم" در مقطع کارشناسی ارشد در سال ۱۳۹۵ می‌باشد که با حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین اجرا شده است.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی ترکیبات فیتوشیمیایی، اثرات ضدباکتریایی و ضدسرطانی عصاره

References

1. Azab A, Nassar A, Azab AN. Anti-inflammatory activity of natural products. *Molecules* 2016;1;21(10). pii: E1321.
2. Ullah N, Nadhman A, Siddiq S, Mehwish S, Islam A, Jafri L, et al. Plants as Antileishmanial Agents: Current Scenario. *Phytother Res* 2016;30(12):1905-1925.
3. Salimifar M, Fatehi-Hassanabad Z, Fatehi M. A review on natural products for controlling type 2 diabetes with an emphasis on their mechanisms of actions. *Curr Diabetes Rev* 2013;9(5):402-11.
4. Memvanga PB, Tona GL, Mesia GK, Lusakibanza MM, Cimanga RK. Antimalarial activity of medicinal plants from the Democratic Republic of Congo: A review. *J Ethnopharmacol* 2015;169:76-98.
5. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* 2012;6(11):1-5.
6. Kong JM, Goh NK, Chia LS, Chia TF. Recent advances in traditional plant drugs and orchids. *Acta Pharmacol Sin* 2003;24(1):7-21.
7. Mantle D, Lennard TW, Pickering AT. Therapeutic applications of medicinal plants in the treatment of breast cancer: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *Adverse Drug React Toxicol Rev* 2000 Aug;19(3):223-40.
8. Wang H, Khor TO, Shu L, Su ZY, Fuentes F, Lee JH, et al. Plants vs. cancer: a review on natural phytochemicals in preventing and treating cancers and their druggability. *Anticancer Agents Med Chem* 2012;12(10):1281-305.
9. Sharifi-Rad J, Mnayer D, Tabanelli G, Stojanović-Radić ZZ, Sharifi-Rad M, Yousaf Z, et al. Plants of the genus *Allium* as antibacterial agents: From tradition to pharmacy. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2016;62(9):57-68.
10. Sharma A, Flores-Vallejo RD, Cardoso-Taketa A, Villarreal ML. Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *J Ethnopharmacol* 2016;S0378-8741(16)30246-X.
11. Mirabi P, Alamolhoda SH, Esmailzadeh S, Mojab F. Effect of medicinal herbs on primary dysmenorrhoea- a systematic review. *Iran J Pharm Res* 2014;13(3):757-67.
12. Fleet JC, DeSmet M, Johnson R, Li Y. Vitamin D and cancer: a review of molecular mechanisms. *Biochem J* 2012;441(1):61-76.
13. Tariq K, Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med* 2016;13(1):120-35.
14. Carethers JM, Jung BH. Genetics and genetic biomarkers in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology* 2015;149(5):1177-1190.e3.
15. Valsecchi ME, Díaz-Cantón E, de la Vega M, Littman SJ. Recent treatment advances and novel therapies in pancreas cancer: a review. *J Gastrointest Cancer* 2014;45(2):190-201.
16. Thota R, Pauff JM, Berlin JD. Treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma: a review. *Oncology (Williston Park)* 2014;28(1):70-4.
17. Kuš PM, Jerković I, Tuberoso CI, Marijanović Z, Congiu F. Cornflower (*Centaurea cyanus* L.) honey quality parameters: chromatographic fingerprints, chemical biomarkers, antioxidant capacity and others. *Food Chem* 2014;142:12-8.
18. Park JB. Synthesis, biological activities and bioavailability of moschamine, a safflomide-type phenylpropenoic acid amide found in *Centaurea cyanus*. *Nat Prod Res* 2012;26(16):1465-72.
19. Tagboto S, Townson S. Antiparasitic properties of medicinal plants and other naturally occurring products. *Adv Parasitol* 2001;50:199-295.
20. Mohadjerani M, Hosseinzadeh R, Hosseini M. Chemical composition and antibacterial properties of essential oil and fatty acids of different parts of *Ligularia persica* Boiss. *Avicenna J Phytomed* 2016;6(3):357-65.
21. Dilika F, Bremner PD, Meyer JJ. Antibacterial activity of linoleic and oleic acids isolated from *Helichrysum pedunculatum*: a plant used during circumcision rites. *Fitoterapia* 2000;71(4):450-2.
22. Yayli N, Yaşar A, Güleç C, Usta A, Kolaylı S, Coşkunçelebi K, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from *Centaurea sessilis* and *Centaurea armena*. *Phytochemistry* 2005;66(14):1741-5.
23. Azzouzi D, Mekkiou R, Chalard P. Essential Oil composition of *Centaurea choulettiana* Pomel (Asteraceae) from Algeria. *Int J Pharma Phyto Res* 2016;8(9):1545-8.
24. Nyirimigabo E, Xu Y, Li Y, Wang Y, Agyemang K, Zhang Y. A review on phytochemistry, pharmacology and toxicology studies of *Aconitum*. *J Pharm Pharmacol* 2015;67(1):1-19.
25. Cansaran A, Dogan NM, Acar G. Antimicrobial activity of various extracts of *Centaurea cankiriense* A. Duran and H. Duman. *Afr J Micro Res* 2010;4(8):608-612.
26. Astari KA, Erel SB, Koksakal C. Antimicrobial and cytotoxic activities of roots of *Centaurea cadmea* Boiss. *Planta Med* 2011;77:77-82.
27. Behzad S, Pirani A, Mosaddegh M. Cytotoxic activity of some medicinal plants from hamedan district of iran. *Iran J Pharm Res* 2014;13(Suppl):199-205.
28. Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, et al. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cinic for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharm Biol* 2011;49(8):840-9.
29. Field CJ, Schley PD. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids. *Am J Clin Nutr* 2004;79(6 Suppl):1190S-8S.

Study of chemical composition and characteristics of *Centurea cyanus* extract on colon cancer cell line and analysis of apoptosis gene expression

Amir Mirzaie Ph.D.¹
Shoreh Zare Karizi Ph.D.^{2*}

1- Young Researchers and Elite Club, East Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2- Department of Biology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

* Corresponding author: Islamic Azad University, Varamin-Pishva Branch, Naghsh-e Jahan, Pishva, Varamin, Iran. Tel: +98 21 36725011 E-mail: shohrehzare@yahoo.com

Abstract

Received: 01 Aug. 2016 Revised: 11 Dec. 2016 Accepted: 19 Dec. 2016 Available online: 20 Dec. 2016

Background: *Centaurea cyanus* is an endemic and well-known herbal medicine in Iran, is an annual flowering plant in the family of Asteraceae. The flowers are the part used in modern herbal medicine and are considered to have tonic, stimulant and emmenagogue properties, with action similar to that of blessed thistle. The aim this study was to investigate the phytochemical constituents of *C. cyanus* extract, its antioxidant, anti-tumor and anti-bacterial activities.

Methods: This experimental study was conducted from June to January of 2015 in Islamic Azad University of Varamin, Iran. At first, the phytochemical components of *C. cyanus* extract was analyzed using gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) method. Subsequently, the antibacterial potential of the extract was evaluated against 4 pathogenic bacteria including *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* via minimum inhibitory concentration (MIC) method. Moreover, the anti-oxidant and anti-tumor activities of extract on colon cancer cell line (HT29) were investigate using DPPH and MTT colorimetric methods, respectively. Finally, the *Bax* and *Bcl2* apoptosis gene expression level was analyzed by quantitative Real-time PCR technique.

Results: GC-MS analysis of *C. cyanus* extract was shown 19 major components and the most frequent component was belonged to n-Hexadecanoic acid (36.4%) and Linoleic acid (19.3%). The maximum antibacterial activity of extract was observed on *S. aureus* and *P. aeruginosa* isolates. The antioxidant activity of the extract was 0.109±0.07 mg/ml. Moreover, the MTT results show that extract had IC₅₀= 26.04±0.45 on HT29 cell line. The Real-time PCR results showed the expression level of *Bax* and *Bcl2* was significantly increased and decreased respectively in colon cancer cell line (2.63±0.54 (P< 0.05), 0.38±0.72 (P< 0.05)).

Conclusion: The results of this study show that the extract had significant anti-bacterial and anti-cancer effects and it appear that the extract has potential uses for pharmaceutical industries

Keywords: anti-bacterial properties, apoptosis, *centurea cyanus*, gas chromatography-mass spectrometry, real-time polymerase chain reaction.