Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants
ISSN: 2322-3235 (Print), 2783-4697 (Online) http:// http://ecophytochemical.gorganiau.ac.ir

Doi:10.30495/ejmp.2022.1951443.1677
Dor:20.1001.1.23223235.1401.10.3.5.3

Phytochemical, antimicrobial and cytotoxicity effects of *Rosa persica* L. extracts in North Khorasan province

Ali Koohestanian[1], Maryam Tatari[2*], Maliheh Samadi Kazemi[3], Ahmad Asgharzadeh[4], Seyedeh Faezeh Taghizadeh[5]

[1]PhD student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shirvan branch, Islamic Azad University, Shiravan, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Agriculture, Faculty of Agriculture, Shirvan branch, Islamic Azad University, Shiravan, Iran, Email: maryamtatari@yahoo.com
[3]Assistant Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Bojnord Branch, Islamic Azad University, Bojnord, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Agriculture, Shirvan branch, Islamic Azad University, Shiravan, Iran
[5]Postdoctoral, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Serial 39, 10th year, Number 3, Autumn 2022 (41-55)

Article type:
Research Full Paper

Article history
Received: 01-02-2022
Revised: 24-05-2022
Accepted: 11-06-2022

Keywords
Antibacterial
Cytotoxicity
MIC
MBC
Rosa persica L.

Abstract

The aim of this study was to Phytochemical, antimicrobial and cytotoxicity effects of *Rosa persica* L. extracts in a complete randomized design with three replications. *R. persica* L. was collected from Shirvan city located in North Khorasan province in the late summer of 2019 . The methanol, petroleum ether, ethyl acetate and water extracts were prepared by maceration method and were analyzed by using the liquid chromatography-mass spectrometer system, it was determined that the methanolic extract had the highest amounts of rosmarinic acid compounds. Antimicrobial effects of different extracts were investigated by determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bactericidal concentration (MBC). Antimicrobial assays against *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* showed that in all treatments, gram-negative bacteria were more resistance in compare to gram positive bacteria. In all extracts, the most sensitive strain was *S. aureus* with MIC and MBC of 10.89±0.13 and 19.34±0.33 µg/ml in the methanolic extract, respectively. Methanolic extracts of aerial parts had significantly stronger antimicrobial effects, respectively. Based on the results of cytotoxicity of different extracts on MCF-7, DU-145, PC3, A2780, C26, U-87-MG, MDA-MB-231, and Hela, it was found that Methanolic extract had the most cytotoxic effects on all cell lines studied. The lowest effects of cytotoxicity were related to the aqueous extract of aerial parts. In all treatments and cell lines, the IC_{50} was less than 400 µg/ml. The biochemical and biological activities of *R. persia* may be related to its phenolic compounds, so further studies is recommended.

Please cite this article as Ali Koohestanian, Maryam Tatari, Maliheh Samadi Kazemi, Ahmad Asgharzadeh, Seyedeh Faezeh Taghizadeh. 2022. Phytochemical, antimicrobial and cytotoxicity effects of *Rosa persica* L. extracts in North Khorasan province. *Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants*. 10(3): 41-55.

© 2022. All Rights Reserved

فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی
شاپا: (چاپی) ۳۲۳۵-۲۳۲۲ (آنلاین) ۲۷۸۳-٤٦٩٧، http://ecophytochemical.gorganiau.ac.ir
Doi: 10.30495/ejmp.2022.1951443.1677
Dor: 20.1001.1.23223235.1401.10.3.5.3

بررسی فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی و عملکرد سمیت سلولی عصاره‌های مختلف گیاه دارویی *Rosa persica* L. در خراسان شمالی

علی کوهستانیان[۱]، مریم تاتاری[۲*]، ملیحه صمدی کاظمی[۳]، احمد اصغرزاده[٤]، سیده فائزه تقی‌زاده[٥]

۱.دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران
۲.استادیار، گروه زراعت، دانشکده کشاورزی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران، رایانامه: maryamtatari@yahoo.com
۳.استادیار، گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد بجنورد، دانشگاه آزاد اسلامی، بجنورد، ایران
٤.استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، واحد شیروان، دانشگاه آزاد اسلامی، شیروان، ایران
٥.پسا دکترا، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

سال دهم، شماره ۳۹، پاییز ۱٤۰۱ / صفحات: ۵۵-٤۱

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱۱/۱۲
تاریخ بازنگری: ۱٤۰۱/۰۳/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۳/۲۱

واژه‌های کلیدی:
آنتی باکتریال
رز ایرانی (*Rosa persica* L.)
حداقل غلظت مهارکنندگی
حداقل غلظت کشندگی
سمیت سلولی
فیتوشیمی

چکیده

این مطالعه با هدف شناسایی و تعیین مقدار متابولیت‌های ثانویه، بررسی ضدمیکروبی و سمیت سلولی در عصاره‌های مختلف اندام هوایی گیاه دارویی رز ایرانی (*Rosa persica* L.) به روش کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتر جرمی (LC- MS/MS)[1] در یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. گیاه رز ایرانی از شهرستان شیروان واقع در استان خراسان شمالی در اواخر تابستان سال ۱۳۹۹ جمع آوری شد و عصاره‌های متانولی، پترولیوم اتری، اتیل استاتی و آبی از اندام هوایی آن به روش خیساندن تهیه گردید. با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مایع- اسپکترومتر جرمی مشخص شد که عصاره متانولی دارای بالاترین مقادیر ترکیبات رزمارینیک اسید بود. بررسی اثرات آنتی میکروبی عصاره‌های مختلف به روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی انجام شد. نتایج بررسی عملکرد عصاره‌ها بر سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس[2]، استافیلوکوکوس اپیدرمیس[3]، میکروکوکوس لوتئوس[4]، باسیلوس سرئوس[5]، سدوموناس اوروژینوزا[6]، سالمونلا تیفی[7]، سراشیا مارسسنز[8]، اشرشیا کلی[9]، کاندیدا آلبیکنس[10]، آسپرژیلوس نایجر[11] نشان داد که در همه

1. Liquid Chromatograph-Mass Spectrometer
2. *Staphylococcus aureus*
3. *Staphylococcus epidermidis*
4. *Micrococcus luteus*
5. *Bacillus cereus*
6. *Pseudomonas aeruginosa*
7. *Salmonella typhi*
8. *Serratia marcescens*
9. *Escherichia coli*
10. *Candida albicans*
11. *Aspergillus niger*

استناد: علی کوهستانیان، مریم تاتاری، ملیحه صمدی کاظمی، احمد اصغرزاده، سیده فائزه تقی‌زاده. (۱٤۰۱). بررسی و مقایسه فیتوشیمیایی، ضدمیکروبی و عملکرد سمیت سلولی عصاره‌های مختلف گیاه دارویی *Rosa persica* L. خراسان شمالی. *فصلنامه اکوفیتوشیمی گیاهان دارویی*، ۱۰ (۳)، ۵۵-٤۱.

تیمارها باکتری‌های گرم منفی در مقایسه با گرم مثبت مقاومت بیشتری را از خود نشان دادند. در تمامی عصاره‌ها، حساس‌ترین سویه، استافیلوکوکوس اورئوس بود که به ترتیب با حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برابر ۰/۱۳±۱۰/۸۹و ۰/۳۳±۱۹/۳٤ میکروگرم بر میلی‌لیتر در عصاره متانولی بیشترین اثر را داشت. عصاره متانولی اندام هوایی به ترتیب دارای اثرات آنتی میکروبی معنی دار قوی تری بودند. بر اساس نتایج سمیت سلولی عصارهای مختلف بر روی سلول‌های MCF-7، DU-145، PC3، A2780، C26، U-87-MG، MDA-MB-231 و Hela عصاره متانولی دارای بیشترین اثرات سمیت سلولی بر روی تمام رده‌های سلولی مورد مطالعه بود. کمترین اثرات سمیت سلولی مربوط به عصاره آبی اندام هوایی بود. در تمام تیمارها و رده‌های سلولی، IC50 کمتر از ٤۰۰ µg/ml بود. فعالیت‌های بیوشیمیایی و بیولوژیکی *R. persica* ممکن است به ترکیبات فنلی آن مربوط باشد، بنابراین مطالعات بیشتر توصیه می‌شود. نتایج نشان داد که گیاه مورد مطالعه در این تحقیق غنی از اسیدهای فنلی است که می‌تواند از بسیاری از آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد جلوگیری کند.

مقدمه

در سال‌های اخیر مقاومت دارویی در بسیاری از باکتری‌های پاتوژن به طور قابل توجهی افزایش یافته است. امروزه عفونت‌های باکتریایی بیشتر از گذشته است که به نظر می‌رسد یکی از علت‌های آن همین مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها باشد. ترکیبات ضدمیکروبی به‌دست آمده از گیاهان با مکانیسم‌هایی متفاوت از آنتی‌بیوتیک‌ها، باکتری‌ها را حذف می‌کنند که این مساله در درمان عفونت‌های ناشی از سویه‌های مقاوم میکروبی از نظر بالینی حائز اهمیت است. طی سالیان متمادی گیاهان دارویی اساس و حتی در برخی موارد تنها وسیله درمان محسوب می‌شدند و در عین حال مواد اولیه آن‌ها در صنعت داروسازی مورد استفاده قرار می‌گرفت (El Omari et al., 2019). امروزه مهمترین درمان موجود برای سرطان شیمی‌درمانی است که علاوه بر اثرات جانبی متعدد، مقاومت دارویی هم در بیمار ایجاد می‌کند. برخی از گیاهان نقش محافظتی و درمانی در سرطان دارند و برخی دیگر نیز اثرات جانبی ناشی از شیمی‌درمانی و رادیوتراپی را کاهش می‌دهند و به علاوه از نظر اقتصادی هم مقرون به صرفه هستند (Emami et al., 2017).

تیره گلسرخ[1] یکی از خانواده‌های متنوع و پرجمعیت از نظر گونه‌های گیاهی است. گونه‌های مختلف جنس رز [2] ارزشمندترین جنس‌های موجود در خانواده رزاسه هستند. توسعه کشت این گیاه به دلیل کاربردهای فراوانی که در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی- بهداشتی دارد، می تواند تاثیر بسزایی در اشتغال زایی و رفع نیازهای صنایع مختلف داخلی و نیز در صادرات غیر نفتی کشور داشته باشد (Ayati et al., 2018). گونه‌های دارویی جنس رز، دارای ترکیباتی نظیر ویتامین ث، پلی‌فنل، کاروتنوئیدها، کربوهیدرات‌ها، اسیدهای چرب هستند. در پژوهشی خصوصیات فیتوشیمیایی میوه‌های رز در جنوب غرب و شمال ایران نیز مورد بررسی قرار گرفت. طبق این پژوهش‌ها تفاوت‌های معنی داری بین مناطق مختلف به لحاظ مواد موثره مشاهده گردید، به‌طوری‌که بیشترین مقادیر در منطقه رودبار گزارش شد (Nejatbakhsh et al., 2016).

مطالعات زیادی به روی ترکیبات موثره گیاه رز انجام شده است از آن میان می‌توان به پژوهشی که اثرات این ترکیبات را به روی رده‌های مختلف سلول‌های سرطان کبد پرداخته است اشاره نمود. سزکویی‌ترپن‌های مستخرج از اسانس رز دارای اثرات سایتوتوکسیک در رده‌های سلولی سرطان کلون هستند (Mármol et al., 2017). در تحقیقات نشان داده شده است که اثرات درمانی گیاه رز به عنوان یک عامل ضد سرطانی و ضد التهاب با خصوصیات تنظیم کنندگی سیستم ایمنی همبستگی دارد. نتایج حاصل از پژوهش‌هایی که به روی اثرات آنتی‌تومور عصاره‌های ارقام مختلف رز در محیط درون شیشه‌ای صورت گرفت نشان داد که این ارقام علاوه بر کاهش رشد سلول‌های سرطانی دارای اثرات آنتی‌متاستاز نیز می‌باشند (Chen et al., 2015). نتایج آزمایش اثرات ضد سرطانی عصاره اتیل‌استاتی میوه‌ی رز به روی رده سلولی B16F10 نشان داد که تکثیر سلول‌های سرطانی را بیش از ۵۰ درصد کاهش یافته است. هم چنین در مطالعه دیگری که به روی رده‌ی سلولی Vero انجام شد اثر مهارکنندگی عصاره اتانولی میوه رز مشاهده شد (Jiménez et al., 2016).

استخراج ترکیبات موثر این گیاه بستگی به نوع حلال، مدت زمان و دمای استخراج، ساختار شیمیایی ترکیبات دارد. از این رو بایستی با در نظر گرفتن هدف مورد نظر و دستیابی به بالاترین میزان بهره‌وری نسبت به انتخاب نوع حلال و روش استخراج اقدام کرد

1. Rosaceae

2. *Rosa* spp.

(Sadraei et al., 2013). با بررسی فیتوشیمیایی گیاهان می‌توان از مواد اولیه آن‌ها در صنعت داروسازی و از جمله در درمان انواع سرطان‌ها استفاده نمود. علی‌رغم گزارش‌های متعدد در مورد اثرات دارویی رزها، اما تاکنون مطالعات فیتوشیمیایی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و سمیت سلولی به روی اندام هوایی گیاه رز ایرانی (*R. persica*) انجام نشده است. از این رو، تحقیق حاضر با هدف بررسی مقادیر ترکیبات متابولیت‌های ثانویه (به روش کروماتوگرافی مایع)، اثرات ضدمیکروبی (بر اساس تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی) و سمیت سلولی (به روش MTT) عصاره‌های متانولی، پترولیوم اتری، اتیل استاتی و آبی اندام‌های هوایی رز ایرانی انجام شد.

مواد و روش‌ها

برداشت نمونه‌ها: این پژوهش در سال‌های ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیروان و دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شد. در این رابطه، پس از بررسی منابع علمی، فلور، منابع و اطلاعات محلی و جستجو در پایگاه‌های ثبت هرباریوم (RP/11243) و مراکز ذیربط، نمونه‌های اندام هوایی گیاه رز ایرانی از شهرستان شیروان واقع در استان خراسان شمالی جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها در هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد شناسایی شدند.

آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی: اندام هوایی رز ایرانی به محیط سایه و به دور از نور مستقیم، منتقل و به مدت ۱۵ روز خشک شدند. نمونه‌های خشک شده جهت انجام عملیات عصاره گیری و آزمایشات فیتوشیمیایی و بیولوژیکی در بسته‌بندی‌هایی خشک و دور از نور نگهداری تا زمانی که به آزمایشگاه‌های مربوطه منتقل شدند.

عصاره گیری: جهت عصاره‌گیری از روش خیساندن استفاده شد. ۴۰۰ گرم از پودر خشک شده گیاه، طی سه مرحله هر بار با یک لیتر حلال متانول به‌مدت زمان ۲۴ ساعت عصاره‌گیری شد. بعد از سه بار عصاره‌گیری، عصارهٔ حاصل با روتاری در دمای زیر ۵۰ درجه تغلیظ شد پس از تغلیظ به آن مقداری آب اضافه نموده و به‌ترتیب حلال‌های پترولیوم اتر، اتیل استات و آب اضافه شد. عصاره خشک شده بخش هوایی به‌طور جداگانه در ۵۰ میلی لیتر متانول/ آب حل شد و بعد وارد دکانتور شده و توسط حلال‌های پترولیوم اتر، اتیل استات و آب عصاره‌های مختلف جدا سازی شد. عصاره‌ها بر اساس عمل دو فاز شدن آن‌ها و با توجه به تفاوت قطبیتشان از هم جدا شدند، سپس عصاره‌های به‌دست آمده توسط دستگاه روتاری حذف حلال شده و با دستگاه فریز درایر کاملاً خشک شدند. این عصاره‌ها جهت بررسی اثرات بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند، این عصاره‌ها در فریزر و دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Shakeri et al., 2019).

شناسایی و تعیین مقدار متابولیت‌های ثانویه به روش LC-MS/MS: روش LC/MS یک تکنیک آنالیتیکال آزمایشگاهی قدرتمند است که ترکیبی از قدرت کروماتوگرافی مایع با ویژگی‌های شناسایی و تشخیص طیف سنج جرمی می‌باشد. کروماتوگرافی مایع LC اجزای یک نمونه را تفکیک کرده و سپس آنها را برای شناسایی به یک اسپکترومتر جرمی MS معرفی می‌کند. این شناساگر یون‌های باردار را ایجاد و شناسایی می‌کند. به‌طورکلی اجزای یک نمونه در کروماتوگراف مایع بر اساس وزن مولکولی و تفاوت در تمایل آنها به فاز متحرک و ثابت جدا می‌شوند که منجر به قطعه قطعه شدن نمونه شده و آنیونی شدن آنها با از دست دادن یون‌های H^+ اتفاق می‌افتد. پس از

آن نمونه به محفظه خلاء طیف سنج جرمی منتقل می‌شود. ۲ میلی گرم عصاره در یک میلی‌لیتر آب/ متانول (۵۰/ ۵۰ درصد، V/V) تهیه شد و سپس به‌مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. نمونه از طریق یک فیلتر غشاء ۰/۲۰ میکرومتر قبل از تزریق فیلتر شد. دمای محفظه نمونه ۱۰ درجه سانتی‌گراد، دمای ستون ٤٠ درجه سانتی‌گراد، حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر و سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. همچنین زمان جداسازی کروماتوگرافی ۵۰ دقیقه بود. دمای محفظه نمونه ۱۰ درجه سانتی گراد، دمای ستون ٤٠ درجه سانتی گراد، حجم تزریق ۱۰ میکرولیتر، سرعت جریان ۰/۵ میلی لیتر بر دقیقه، محدوده طول موج ٤٠٠-۲۱۰ نانومتر، فازها: **A:** ۰/۱٪ اسید فرمیک در آب و **B :** استو نیتریل، مشخصات ستونUPLC ® BEH C18، ۲/۱× ۱۰۰ میلی متر، ۱/۷ میکرومتر، زمان جداسازی کروماتوگرافی ۵۰ دقیقه. در این تکنیک با بهره گیری کامل از اصول کروماتوگرافی با استفاده از ذرات کوچکتر در ستون، با افزایش سرعت جریان فاز متحرک باعث کاهش زمان آنالیز شده و با افزایش کیفیت کروماتوگرام‌ها باعث افزایش حساسیت تکنیک شده است (Shakeri et al., 2019).

آزمون‌های آنتی میکروبی

تهیه سوش‌های باکتری و محلول ۰/۵ مک‌فارلند: ٤ باکتری گرم مثبت، ٤ باکتری گرم منفی و دو قارچ شامل: استافیلوکوکوس اورئوس[1]، استافیلوکوکوس اپیدرمیس[2]، میکروکوکوس لوتئوس[3]، باسیلوس سرئوس[4]، سدوموناس اوروژینوزا[5]، سالمونلا تیفی[6]، سراتیا مارسسنز[7]، اشرشیا کلی[8]، کاندیدا آلبیکنز[9]، آسپرژیلوس نیجر[10] از انیستیتو پاستور ایران تهیه شد. برای تهیه محلول ۰/۵ مک‌فارلند، ۰/٦ میلی‌لیتر کلرید باریم ۰/۰٤۸ مولار با ۹۹/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۳٦ نرمال مخلوط شد (Taghizadeh et al., 2019).

تلقیح میکروبی: باکتری‌ها ۲٤ ساعت قبل و قارچ ٤۸ ساعت قبل روی محیط سوی بین کازیین دایجست اگار کشت داده شدند و گراگذاری شدند. برای تهیه کشت تازه از کشت ذخیره میکروب‌ها استفاده شد. سپس با استفاده از نرمال سالین سوسپانسیونی از آنها با کدورت لوله نیم مک فارلند تهیه شد. از این سوسپانسیون قطره قطره به داخل لوله‌های حاوی نرمال سالین استریل ریخته و با ورتکس کاملاً مخلوط تا کدورتی معادل کدورت محلول ۰/۵ مک‌فارلند بدست آید. این کدورت معادل 10^8 CFU/ml است. چون برای آزمایش‌ها نیاز به غلظت 10^6 CFU/ml است، باید یک میلی‌لیتر از لوله 10^8 CFU/ml برداشته و به لوله حاوی نه میلی‌لیتر نرمال سالین استریل اضافه و مخلوط کرد. غلظت حاصل 10^8 CFU/ml شده که با تکرار به غلظت مطلوب رسید (Taghizadeh et al., 2019).

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی: بعد از آماده‌سازی غلظت‌های عصاره و سوسپانسیون میکروبی، از پلیت‌های ۲٤ خانه دارای چهار ستون (A، B، C و D) و ٦ ردیف (۱ تا ٦) استفاده شد. محلول جنتامایسین و نیستاتین به‌عنوان کنترل مثبت بکار رفتند. خانه‌های A، B و C به غلظت‌های مختلف عصاره اختصاص یافت. به این صورت که در ردیف یک از این ستون‌ها میزان ۱ میلی‌لیتر از غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و این کار تا ردیف شش که در آن غلظت ۰/۳۱۲

1. (*Staphylococcus aureus* (PTCC (Persian Type Culture Collection) 1431)
2. *Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1435)
3. (*Micrococcus luteus* (ATCC (American Type Culture Collection) 9341)
4. *Bacillus cereus* (PTCC 1247)
5. (*Pseudomonas aeruginosa* (PTCC 1074)
6. *Salmonella typhi* (PTCC 1609)
7. *Serratia marcescens* (PTCC 1267)
8. (*Escherichia coli* (ATCC 1533))
9. (*Candida albicans* (ATCC 10231)
10. (*Aspergillus niger* (ATCC 16404))

میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ریخته پایان پذیرفت. سپس به هر یک از خانه‌ها ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی 10^6 CFU/ml اضافه شد. به خانه‌های D1 و D2، دو میلی‌لیتر از محیط کشت برای بررسی استریلیته محیط کشت اضافه گردید. خانه‌های D3 و D4 برای کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. از این رو در آن‌ها یک میلی‌لیتر از محلول پنج میکروگرم بر میلی‌لیتر جنتامایسین و ۰/۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون میکروبی مورد آزمایش اضافه شد. برای آزمایش کاندیدا محلول ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کتوکونازول جایگزین جنتامایسین استفاده شد. کنترل منفی هم در خانه‌های D5 و D6 قرار گرفت. به آنها یک میلی‌لیتر از محیط کشت و ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. بعد از آماده‌سازی، پلیت‌هایی که به باکتری اختصاص یافتند، ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پلیت مربوط به قارچ ٤۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت این زمان به هر یک از خانه‌های پلیت‌ها مقدار یک میلی‌لیتر از محلول نمک تترازولیوم به غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه گردید و مجدداً پلیت‌ها به مدت سه ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. این آزمایش‌ها در سه روز مختلف تکرار شدند. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی، پلیت حاوی محیط کشت آگاردار جامد را به ٤ قسمت مساوی تقسیم کرده، سپس از خانه‌های پلیت ۲٤ خانه مربوط به هر میکروب که هیچ رشدی در آنها مشاهده نشده بود به وسیله یک لوپ استریل برداشته و به‌صورت زیگزاگ در یک قسمت از پتری‌دیش کشت داده شد. بعد از مدت زمان لازم برای انکوباسیون هر قسمتی که در آن رشدی مشاهده نشده بود، کمترین غلظت آن، به عنوان حداقل غلظت کشندگی مشخص شد (Taghizadeh et al., 2020).

آزمون‌های سمیت سلولی

کشت سلولی: برای کشت رده سلولی مورد نظر ابتدا یک کرایوتیوب از سلول مورد نظر از ازت مایع خارج شد و در زیر هود لامینار، ۱۰ میلی لیتر از محیط کشت در یک فالکون ۱۵ میلی لیتری ریخته شد و در بن ماری ۳۷ درجه قرار داده شد تا ذوب شود، سپس محتوای سلول کرایوتیوب به فالکون اضافه شد. سپس فالکون به مدت ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm سانتیفیوژ شد، سپس مایع رویی از پلیت سلولی جدا گردیده و دور ریخته شد. در مرحله بعد ۱ میلی لیتر محیط کشت آماده به سلول‌ها اضافه شد. حدود ۵-٤ میلی لیتر محیط کشت کامل که از قبل تهیه شده بود در یک فلاسک کوچک ریخته شد و سلول‌های داخل لوله فالکون با استفاده از سمپلر به آن اضافه شد. سپس فلاسک در انکوباتور ۳۷ درجه حاوی ۵ درصد CO_2 قرار داده شد (Shakeri et al., 2019).

کشت سلول در پلیت و تیمار کردن: هر رده سلولی در پلیت مجزا کاشته شد به این صورت که برای هر رده و برای هرکدام از عصاره‌های ۳ بار تکرار انجام شد. تعداد 10^4 از سلول‌ها به پلیت‌های ۹٦ خانه جهت انجام تست رزازورین منتقل گردید. محیط کشت کامل به عنوان بلانک در نظر گرفته شد، در چاهک‌های مربوط به کنترل منفی و مثبت مانند بقیه چاهک‌ها سوسپانسیون سلولی به همراه محیط کشت کامل ریخته شد. حال سه پلیت مربوط به هر رده به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و واجد CO_2 ۵ درصد انکوبه گردید. پس از ساخت غلظت‌های مختلف عصاره‌ها و دوکسوروبیسین (به‌عنوان کنترل مثبت) با در نظر گرفتن سه چاهک برای هر نمونه ۱۰۰ میکرولیتر از هر کدام را با استفاده از سمپلر داخل چاهک ریخته شد. برای بالا بردن میزان تکرار برای هر رده سلولی از هر نمونه گیاه، سه

پلیت در نظر گرفته شد، همچنین در هر یک از پلیت‌ها برای هر کدام از غلظت‌ها سه چاهک استفاده شد. در چاهک‌های مربوط به کنترل مثبت و منفی و بلانک ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه ریخته شد. سپس پلیت‌ها با فویل آلومینیومی پوشانده شده و به‌مدت ٤٨ ساعت در انکوباتور ۵ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. بعد از گذشت ٤٨ ساعت، در محیط کم نور، ۲۰ میکرولیتر (یک دهم حجم موجود در هر چاهک)، رنگ رزازورین به چاهک‌ها اضافه شد. سپس به‌مدت ٦-٤ ساعت پلیت‌ها مجددا در انکوباتور واجد CO_2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، جذب نوری آن‌ها در طول موج ۵۷۰ و ٦۰۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. برای اطمینان از وضعیت سلول‌ها بعد از قرائت در دستگاه، پلیت‌ها زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت (Shakeri et al., 2017).

تهیه استوک عصاره متانولی و عصاره‌های گیاهی: برای تهیه غلظت‌های مختلف از عصاره‌های متانولی، اتیل استات، پترولیوم اتری و آبی ۲۵ میلی گرم از هر عصاره که کاملاً خشک شده را داخل میکروتیوب ریخته با ۵۰۰ میکرولیتر از DMSO حل شد، غلظتی که به‌دست می‌آید، ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر می‌باشد که به‌عنوان استوک اصلی در نظر گرفته شد. از روی استوک غلظت‌های ۱۰۰،۲۰۰،٤۰۰ و ۸۰۰ ساخته شد. از آنجایی که در هر چاهک پلیت ۹٦ خانه مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت همراه سلول وجود دارد، که باعث کم شدن غلظت عصاره در داخل چاهک می‌شود، در ابتدا غلظت‌ها دو برابر ساخته شد (Azadmanesh et al., 2021).

تهیه استوک کنترل مثبت: در این آزمایش دوکسوروبیسین بعنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. بدین‌منظور ۱، ۲، ٤ میلی‌گرم از پودر دوکسوروبیسین با ترازوی دقت ٤ صفر وزن شد، و در ۲ سی‌سی DMSO حل شد. در مرحله به حجم رساندن نهایی، از محیط کشت به جای DMSO استفاده شد (Graziano et al., 2015).

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات به‌صورت کاملاً تصادفی با چهار تیمار حلال متانول، پترولیوم اتر، اتیل استات و آب و در ۳ تکرار انجام و برای تجزیه و تحلیل آماری از نرم‌افزار JMP 8 (SAS Campus Drive, Cary, NC 27513) استفاده شد. مقایسه میانگین با آزمون LSD در سطح احتمال ۵٪ انجام شد.

نتایج

شناسایی و تعیین مقدار متابولیت‌های ثانویه: متابولیت‌های ثانویه مطابق با زمان نگهداری و داده‌های طیفی جرم (m/z)، تعیین شدند (جدول ۱ و شکل ۱). استانداردهای کالیبراسیون و غلظت آنالیز با استفاده از منحنی کالیبراسیون استانداردهای خالص محاسبه شد. محلول استوک هر یک از استاندارد کالیبراسیون خالص (۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر) در متانول تهیه شد و رقت‌های متوالی در ٦ سطح مختلف برای منحنی کالیبراسیون ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر از ترکیب استاندارد انجام شد. نتایج به صورت میلی گرم در هر کیلوگرم عصاره خالص بیان شد. متابولیت‌های ثانویه که در عصاره‌ها ارزیابی شدند به صورت میانگین ± انحراف استاندارد بر حسب میکروگرم بر گرم ارائه شده است (جدول ۱). همچنین نتایج نشان داد که در عصاره متانولی که دارای بالاترین مقادیر متابولیت‌های ثانویه بود به ترتیب ترکیبات رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، ۳- هیدروکسی بنزوئیک اسید و ۲- هیدروکسی سینامیک اسید بیشترین مقادیر را به خود اختصاص دادند.

جدول ۱: تعیین مقدار متابولیت‌های ثانویه به روش LC-MSMS عصاره‌های مختلف اندام هوایی رز ایرانی (*R. persica*)

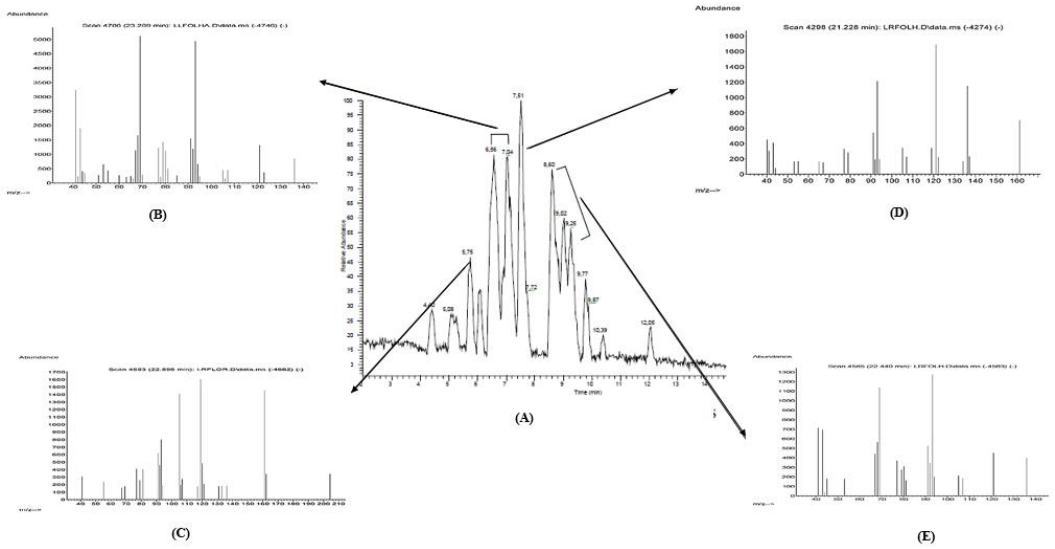
	متابولیت‌های ثانویه	متانول	پترولیوم اتر	اتیل استات	آب
۱	Malic acid	۰/۰۷ ±۰/۰٤	۳/۰۲ ±۰/۱۳	۰/۲۵±۰/۰۵۸	۰/۰٦ ±۰/۰٤
۲	Quinic acid	۰/۰۷±۰/۱۳	۵/۱۲ ±۰/۲۰	۰/٤٦±۰/۰۲۸	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰
۳	Succinic acid	۵/۰۷ ±۰/۱۳	٤/۱۱ ±۰/۱۰	٤/۵۲±۰/۹۰۲	۰/۰۰٤ ±۰/۰۰
٤	Citric acid	۰/۰٤±۰/۰۰۳	۱/۰۷ ±۰/۲۱	۵/۱۰±۰/۳۹	۰/۱۱ ±۰/۰۱
۵	Pyrogallol	۰/۰۱±۰/۰۰۰۲	۱/٤۳ ±۰/۱۵	۰/۰۲۳± ۰/۰۰۰	۰/۲۱ ±۰/۰۵
٦	Gallic acid	۰/۰۷±۰/۰۰۲	۱/۷٦ ±۰/۲۲	۰/۰۱٦± ۰/۰۰	۰/۱۳ ±۰/۰۲
۷	Pyrocatechol	۰/۱٤±۰/۰۰۷	۲/٦۹ ±۰/۱۱	۰/۰۰٦۹ ±۰/۰۰	۰/۳۲ ±۰/۰۱
۸	3-4-Hydroxybenzoic acid	۱/۱۵± ۰/۰٦	۳/۳۸ ±۰/٤۱	۰/۰۵٦±۰/۰۰	۰/۱۲ ±۰/۰٤
۹	Catechin	۰/۰۰۰۲± ۰/۰۰۰۰۳	۲/٤۹ ±۰/۱۲	۰/۰۰۰۷± ۰/۰۰	۰/۱۵ ±۰/۰۲
۱۰	Chlorogenic acid	۰/۲۸± ۰/۰۱	۱/۲۷ ±۰/٤۲	۱/۳۵±۰/۱۰	۰/۲۱ ±۰/۱۰
۱۱	4-hydroxybenzoic acid	۲/۸٦±۰/۲٤	۰/۵۵ ±۰/۰۱	۰/۰٦۹±۰/۰۰۵	۰/٤۱ ±۰/۰۳
۱۲	3-Hydroxybenzoic acid	۳۵/۳٦±۲/۸۰	۸/۰۷ ±۰/۳٤	۰/۵۳ ±۰/٤۸	۰/۲۲ ±۰/۰۱
۱۳	Esculetin	۰/۸۸±۰/۰۰۰۵	۱/٤٤ ±۰/۲۱	۰/۰۳۰±۰/۰۰۱	۰/۳۰ ±۰/۰۲
۱٤	Vanillic acid	۰/۷۵±۰/۰۲۹	۰/۵٤ ±۰/۰۵	۰/۰۹۹±۰/۰۲۸	۰/۵۰ ±۰/۰۳
۱۵	Syringic acid	۰/۱۰±۰/۰۰۲	۳/۱۱ ±۰/۱۰	۰/۰۳۹±۰/۰۰۱	۰/٤۷ ±۰/۰۲
۱٦	Caffeic acid	٦۹/٦۷±۵/۵٤	۰/۳۷ ±۰/۰۵	۳/۰۱±۰/۰٤٤	۰/۳۳ ±۰/۰۲
۱۷	Epicatechin	۰/۰۰۰٤±۰/۰۰۰۲	۰/۰۳ ±۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۳ ±۰/۰۰	۰/۷٦ ±۰/۰۲
۱۸	4-Hydroxycinnamic acid	۱/۵۸±۰/۰۸۰	٦/۱۰ ±۰/۰۲	۰/۰۸۰±۰/۰۰۳	۰/۵۵ ±۰/۰۱
۱۹	3-Hydroxycinnamic acid	۲/۱٤± ۰/۰۸	۵/۰۱ ±۰/۰۳	۰/۱۲±۰/۰۱	۰/۸٦ ±۰/۰۳
۲۰	Rutin	۰/۵۳±۰/۰٤	۱/۲۲ ±۰/۰۲	۰/٦٦±۰/۰۰۸	۰/۷۰ ±۰/۰۲
۲۱	Sinapic acid	۰/۰۱٦±۰/۰۰۱	۰/۰۷ ±۰/۰۰۲	۰/۰۰۰۹±۰/۰۰	۰/۵۸ ±۰/۰۱
۲۲	Ferulic acid	۰/٤۱ ± ۰/۰۰۰۸	۰/۱۷ ±۰/۰۵	۰/۰۱ ± ۰/۰۰۷	۰/۲۲ ±۰/۰۱
۲۳	2- Hydroxycinnamic acid	۲۳/٤٦ ± ۲/۱۲	۱/۰٤ ±۰/۱۸	۱۵/۱۲ ± ۱/۹۹	۰/۹۰ ±۰/۱۰
۲٤	Tannic acid	۰/۰۷۳±۰/۰۱	۱/۰۰ ±۰/۰٤	٤/۰٦± ۲/۱۰	۰/۸۲ ±۰/۰۳
۲۵	Naringin	۰/۰۱±۰/۰۰۲	٤/۲۷ ±۰/۳۲	۰/۹٦±۰/۰۱۷	۰/۳۵ ±۰/۰۱
۲٦	Benzoic acid	۳/۲٦ ±۰/۰۱۹	۱/۰۲ ±۰/۱۳	۰/٦٦±۰/۰۵٤	۰/۸٤ ±۰/۰٤
۲۷	Quercitrin	۰/۳۲±۰/۰٤	۰/۱۷ ±۰/۰۵	۰/۰۲۵±۰/۰۰۸	۰/۹۰ ±۰/۰۵
۲۸	Hesperidin	۰/۷۸±۰/۵۱	۱/۲۲ ±۰/٤۳	۱/۰۳ ±۰/۲۵	۰/٦٦ ±۰/۰۲
۲۹	Rosmarinic acid	۷۵/۵۰±۱/۰٤	٦/۲۱ ±۰/۱۰	۳٤/٤۰±۰/٦۹	۱۰/۳۷ ±۰/۰۵
۳۰	4-Hydroxycoumarin	۷/۲۱±۰/۱۵	۲/٦۷ ±۰/۲۱	۵/۲۱±۰/۰۹۵	۰/۵۹ ±۰/۰۱
۳۱	Salicylic acid	۰/۰۲±۰/۰۰۰۰۷	۰/۰۲ ±۰/۰۰	۰/۰۰۳±۰/۰۰۰۱	۰/۷۰ ±۰/۰۳
۳۲	Resveratrol	۰/۰۵±۰/۰۰۳	۰/۰۰۰۱ ±۰/۰۰	۰/۰۱±۰/۰۰۰۰٤	۰/٤۳ ±۰/۰۲
۳۳	Luteolin	۰/۰۰۷±۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰	۰/۰۰۵±۰/۰۰۲	۰/۲۱ ±۰/۰۱
۳٤	Quercitin	۰/۰۱۲±۰/۰۰۱	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰	۰/۰۰۱±۰/۰۰۱	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰
۳۵	Naringenin	۰/۱۱±۰/۰۰۰٦	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰	۰/۰۳±۰/۰۰٤۱	۰/۰۱۸ ±۰/۰۰۷
۳٦	Hesperetin	۰/۰۱±۰/۰۰۹	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰	۰/۰۰۹ ± ۰/۰۰	۰/۰٦۷ ±۰/۰۲
۳۷	Kaempferol	۰/۰۱± ۰/۰۰٤	۰/۰۰۱ ±۰/۰۰	۰/۰۳۸ ± ۰/۰۱	۰/۰۱۱ ±۰/۰۳

جدول ۲: حداقل غلظت مهار کنندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های اندام هوایی رز ایرانی (*R. persica*)

عصاره	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus epidermidis*	*Micrococcus luteus*	*Bacillus cereus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella typhi*	*Serratia marcescens*	*Escherichia coli*	*Candida albicans*	*Aspergillus niger*
متانول	۱۰/۸۹±۰/۱۳	۱۲/۰۰±۱/۰۰	۲۰/۰۰±۱/۲۱	۲۵/۰۰±۱/۰۰	۹۰/۰۰±۲/۰۰	۱۰۲/۳۲±۱/۶۵	۱۱۵/۰۲±۱/۵۴	۱۳۰/۹۲±۱/۴۳	۳۰/۰۰±۱/۰۰	۵۰/۰۰±۱/۳۲
پترولیوم اتر	۲۰/۰۵±۰/۵۹	۲۳/۵۰±۱/۰۰	۳۰/۰۰±۱/۰۰	۴۴/۰۰±۱/۰۵	۱۰۰/۲۱±۱/۳۲	۱۲۴/۱۰±۱/۳۲	۱۵۷/۰۰±۱/۰۰	۱۷۴/۱۰±۱/۰۰	۵۳/۰۰±۱/۰۰	۷۹/۰۰±۱/۴۵
اتیل استات	۱۸/۳۲±۱/۵۰	۱۹/۰۵±۱/۵۰	۲۳/۰۰±۳/۰۰	۳۵/۰۰±۱/۰۰	۹۵/۰۰±۱/۰۰	۱۱۵/۳±۱/۰۰	۱۳۵/۰۰±۱/۴۴	۱۸۰/۰۰±۱/۰۰	۴۴/۰۰±۱/۲۳	۶۵/۵۰±۱/۲۱
آب	۲۳/۵۰±۱/۰۰	۲۶/۰۰±۱/۰۰	۵۵/۰۰±۱/۰۰	۶۰/۰۰±۱/۱۰	۱۲۰/۵۴±۱/۵۰	۱۴۸/۱۰±۱/۴۳	۱۶۰/۸۱±۱/۷۲	۱۹۱/۵۰±۱/۱۰	۶۱/۰۰±۱/۴۰	۸۶/۱۰±۱/۵۰
جنتامایسین	–	–	–	–	۸/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۱/۰۰	–	–
نیستاتین	–	–	–	–	–	–	–	–	۴/۰۰±۰/۶۰	۴/۰۰±۰/۶۰

جدول ۳: حداقل غلظت کشندگی (میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های اندام هوایی رز ایرانی (*R. persica*)

عصاره	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus epidermidis*	*Micrococcus luteus*	*Bacillus cereus*	*Pseudomonas aeruginosa*	*Salmonella typhi*	*Serratia marcescens*	*Escherichia coli*	*Candida albicans*	*Aspergillus niger*
متانول	۱۹/۳۴±۰/۳۳	۱۹/۹۰±۱/۳۲	۲۴/۱۳±۰/۱۰	۴۴/۲۱±۱/۳۲	۱۱۰/۱۰±۱/۰۰	۱۲۸/۴۲±۱/۰۰	۱۳۰/۴۲±۱/۰۰	۱۹۰/۱۲±۱/۰۰	۳۵/۰۰±۱/۳۳	۶۶/۰۰±۱/۰۰
پترولیوم اتر	۲۳/۴۳±۰/۵۳	۲۴/۱۰±۱/۹۰	۳۹/۱۳±۱/۰۰	۵۶/۰۰±۱/۶۰	۱۲۰/۴۳±۱/۲۱	۱۶۰/۵۰±۱/۰۰	۱۷۲/۵۰±۱/۵۰	۱۹۸/۰۰±۱/۵۰	۶۳/۰۰±۱/۰۰	۹۰/۵۰±۱/۰۰
اتیل استات	۲۱/۰۲±۱/۰۰	۲۲/۶۵±۱/۰۰	۲۸/۰۳±۰/۰۰	۵۰/۰۰±۱/۰۰	۱۱۲/۲۰±۱/۳۲	۱۵۰/۰۰±۱/۵۵	۱۶۰/۰۰±۱/۰۰	۱۹۲/۵۰±۱/۰۰	۵۰/۱۰±۱/۵۵	۸۰/۵±۱/۰۰
آب	۲۵/۹۰±۱/۰۱	۲۷/۰۵±۱/۰۲	۶۴/۹۲±۰/۰۰	۹۰/۰۰±۳/۱۰	۱۵۱/۸۱±۲/۰۰	۱۷۰/۹۰±۲/۰۰	۱۸۵/۰۱±۱/۳۰	۲۰۰/۵۰±۲/۱۰	۷۰/۰۰±۱/۰۰	۹۹/۹۰±۱/۰۰
جنتامایسین	–	–	–	–	۱۶/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۱/۰۰	۸/۰۰±۱/۰۰	–	–
نیستاتین	–	–	–	–	–	–	–	–	۱۶/۰۰±۱/۵۰	۱۶/۰۰±۱/۵۰



شکل ۱: کروماتوگرام LC (A)، کروماتوگرام MS تجزیه عصاره متانولی (A)، کروماتوگرام MS تجزیه عصاره پترولیوم اتری (C)، کروماتوگرام MS تجزیه عصاره اتیل استاتی (D) و کروماتوگرام MS تجزیه عصاره آبی (E).

اثرات آنتی‌میکروبی عصاره‌های اندام هوایی: عصاره‌های مختلف اندام هوایی گیاه رز ایرانی اثرات متفاوتی روی سویه‌های میکروبی باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها از خود نشان دادند. اما نکته مشترک آن حساس‌تر بودن باکتری‌های گرم مثبت نسبت به گرم منفی‌ها در پاسخ‌دهی به هر عصاره بود. در تمامی عصاره‌ها، حساس‌ترین سویه، *Staphylococcus aureus* بود که به‌ترتیب با حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برابر ۱۰/۸۹±۰/۱۳ و ۱۹/۳٤±۰/۳۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر در عصاره متانولی بیشترین اثر را داشت. باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری را از خود نشان دادند. به‌طوری‌که حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای سویه *Pseudomonas aeruginosa* در عصاره متانولی به‌ترتیب ۹۰/۰۰±۲/۰۰ و ۱۱۰/۱۰±۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. همچنین حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی برای عصاره متانولی قارچ *Candida albicans* به‌ترتیب ۳۰/۰۰±۱/۰۰ و ۳۵/۰۰±۱/۲۳ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای عصاره متانولی قارچ *Aspergillus niger* به‌ترتیب ۵۰/۰۰±۱/۳۲ و ٦٦/۰۰±۱/۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردید (جدول ۲ و ۳).

جدول ٤: نتایج حاصل از اثرات سمیت سلولی (IC_{50}) (میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های اندام هوایی رز ایرانی (*R. persica*)

عصاره	MCF-7	DU-145	PC3	A2780	C26	U-87-MG	MDA-MB-231	Hela
متانول	۱۹/٤٤±۰/۰۱	۱٤/۰۹±۱/۳	۱۷/۰۵±۱/۳٤	۳۸/٤٤±۱/۱۱	۱۸/٤۰±۱/۲٤	۱۰/۰۷±۰/۱۳	۸۰/۵۵±۱/۳۳	۳۳/٦۲±۱/۲۳
پترولیوم اتر	۳۳/۲۱±۰/۰۵	٦۵/۸۳±۱/۳	۳٦/٤٤±۱/۹۰	۵۰/۸۹±۱/۳٤	٤۱/۳٤±۱/۱۱	٤۲/۲٦±۱/۰۳	۹۵/۱۲±۱/۲٤	۷۲/۲٦±۱/۰۳
اتیل استات	۲۱/٤۰±۱/۳۲	۳٦/۱۲±۱/۳	۲۸/۲۲±۱/٤۵	٤۱/۱۲±۱/۲۲	۵۱/٤۵±۱/۲۳	۳۰/۱۳±۱/٤٤	۹۰/۳۷±۲/۱۱	٦۸/۳٤±۲/۲۱
آب	۵٦/۷٦±۰/۰۵	۷۹/٦٦±۱/۱	۹۰/٤۵±۱/٦۰	۷۰/۳۵±۱/۳٤	٦۹/۹۲±۰/۵۳	۵۱/۲۲±۱/۳۳	۱۰۰/۰۰±۲/٤۱	۹۰/۳۷±۳/۱۱
دوکسورو بیسین	۱/٤۲±۰/۰۵	۰/۳۲±۰/۰۲	۰/۲۰±۰/۰۲	۰/۲۰±۰/۰۲	۰/۱۵±۰/۰۱	۰/۳۰±۰/۰۵	۰/۳٤±۰/۰٤	۰/۲۵±۰/۰۳

اثرات سمیت سلولی عصاره‌های اندام هوایی: مطالعه اثرات سمیت عصاره‌های اندام هوایی بر روی رده‌های سلولی سرطانی نشان داد که میان شاخص IC_{50} آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به طوری که کمترین شاخص IC_{50} (۰/۱۳±۱۰/۰۷) میکروگرم بر میلی‌لیتر مربوط به عصاره متانولی در رده سلولی U-87-MG بود (جدول ٤).

بحث

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، مقادیر متابولیت‌های ثانویه (جدول ۲) در عصاره متانولی اندام هوایی گیاه رز ایرانی به‌طور معنی‌داری بیشتر بود. همچنین در بررسی اثرات بیولوژیکی عصاره‌های مختلف گیاه نتایج نشان دادند که اثرات آنتی‌میکروبی (جدول‌های ۲ و ۳) و سمیت سلولی (جدول ٤) عصاره‌های مختلف حاصل از این اندام به‌طور معنی‌داری با یکدیگر تفاوت داشتند. به طوری که عصاره متانولی دارای اثرات آنتی میکروبی بیشتری در برابر سوش‌های میکروبی گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها بود. در حالی که باکتری‌های گرم منفی مقاومت بیشتری را از خود نشان دادند که این مقاومت در واقع نشان‌دهنده مقاومت آن‌ها در برابر ترکیب‌های آب‌گریز (هیدروفوبیکی) است (Djenane et al., 2012). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که عصاره‌های مختلف اندام هوایی گیاه رز ایرانی اثرات معنی داری بر روی سلول‌های MCF-7، DU-145، PC3، A2780، C26، U-87-MG، MDA-MB-231 و Hela داشتند. بر اساس نتایج آزمون سمیت سلولی (روش MTT)، عصاره متانولی دارای بیشترین اثرات سمیت سلولی بر روی تمام رده‌های سلولی مورد مطالعه بود. برای بررسی اثرات گیاهان از عصاره‌های مختلف استفاده می‌شود تا متابولیت‌های گیاهی را استخراج کنند. به علت پیچیدگی خصوصیات شیمیایی حلال‌ها و ساختار متنوع و ترکیب مواد گیاهی، چگونگی رفتار سیستم‌های حلال حاوی مواد گیاهی متفاوت است و همین امر پیش‌بینی عملکرد آن‌ها را مشکل کرده است. هیچ حلالی قادر به استخراج همه متابولیت‌های ثانویه که دارای قطبیت و مقادیر انحلال متفاوت باشند، نیست. از این رو در این تحقیق از حلال‌های آب (خیلی قطبی)، متانول، اتیل‌استات (نسبتاً قطبی) و پترولیوم اتر (غیرقطبی) استفاده شد. عصاره متانولی حاوی طیف وسیعی از ترکیبات قطبی و نسبتا غیر قطبی می‌باشد. در مطالعه‌ای که بر روی میوه گل رز صورت گرفت نتایج مشابه تحقیق ما به دست آمد به این صورت که محتوای کل فنل عصاره متانولی میوه رز بیشتر از عصاره بوتانولی آن بود (Mármol et al., 2017).

گل رز اثرات ضد باکتریایی قوی علیه انواع زیادی از باکتری‌ها شامل آئروموناس[1]، باسیلوس[2]، انتروباکتر[3]، انتروکوکوس[4]، اشریشیا[5]، کلبسیلا[6]، مایکوباکتریوم[7]، پروتئوس[8]، سالمونلا[9]، سودوموناس[10]، استافیلوکوکوس[11] و یرسینیا[12] دارد (Ayati et al., 2018). بررسی‌های انجام شده در مورد خواص ضد باکتریایی گیاه رز نشان داد که این گیاه در مقابل باکتری‌های بیماری زا و مولد فساد مثل اشرشیا کلی[13] و سدوموناس[14] موثر است. به طوری که استفاده از آن

1. *Aeromonas*
2. *Bacillus*
3. *Enterobacter*
4. *Enterococcus*
5. *Escherichia*
6. *Klebsiella*
7. *Mycobacterium*
8. *Proteus*
9. *Salmonella*
10. *Pseudomonas*
11. *Staphylococcus*
12. *Yersinia*
13. *Escherichia coli*
14. *Pseudomonas aeruginosa*

در مقادیر ٦٠ -١٢٠ میلی گرم بر لیتر و مقادیر ٣٦٠ میلی گرم بر لیتر باعث کاهش ٢-٤ سیکل لگاریتمی و کاهش بیش از ٦ سیکل لگاریتمی در جمعیت میکروبی می‌شود (Cheng et al., 2016). در مطالعه دیگری نیز مشخص گردید که مقاوم‌ترین سویه باکتری در برابر گیاه رز، اشرشیا کلی[1] است (Sarabhai et al., 2015). در تحقیقی دیگر خواص ضد میکروبی پودر رز همراه با اسید استیک به روی سه باکتری اشرشیا کلی[2]، سالمونلا[3] و لیستریا[4] اثبات شد. بر اساس این مطالعه غلظت‌های ١٠ تا ٢٠ درصد پودر این گیاه همراه با ١ درصد یا بیشتر اسید استیک دارای خواص سینرژیستی ضدمیکروبی می‌باشد (Nikolova et al., 2016). در مطالعه دیگر اثر بازدارندگی و ضدقارچی گروه ایزوتیوسیانات موجود در رز را در مقابل قارچ اشرشیا کلی[5] بررسی کردند. در بررسی‌های انجام شده، بسته بندی‌های فعال ساخته شده از فیلم پلیمریزه با عصاره گل رز نسبت به گونه‌های گیاهی دیگر در مقادیر ٣/٥ میکروگرم بر میلی‌لیتر اثر ضدقارچی بیشتری در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٧ روز نشان داد (Ma et al., 2020). در مطالعه دیگری از میان باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمایش، اثرات عصاره‌های مختلف میوه رز در برابر باکتری گرم منفی اشرشیا کلی[6] و باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس[7] بیشتر بوده است. پژوهشی به منظور تعیین تاثیر عصاره اتانولی گل رز محمدی بر ٨ نمونه از باکتری‌های گرم مثبت و منفی به روش انتشار در چاهک انجام گرفت، نتایج حاصل به گونه ای بود که امکان کاربرد عصاره اتانولی در شرایط درون شیشه‌ای و شناسایی ماده موثره آن به عنوان یک ترکیب موثر ضد باکتریایی پیشنهاد گردید (Snene et al., 2017).

مطابق با اثرات ضد سرطانی رز در تحقیق حاضر، برخی مطالعات از اثرات ضدسرطانی عصاره *R. canina* به روی سلول‌های سرطان پروستات به نتیجه رسیده‌اند، به‌طوری که IC_{50} حاصل از تأثیر غلظت‌های مختلف سلول MCF7 نشان دهنده کاهش حیات سلول‌های سرطانی به‌صورت وابسته به غلظت بود (Zu et al., 2010). نتایج پژوهش دیگری نشان داد که عصاره متانولی میوه رز دارای بالاترین اثرات سیتوتوکسیک در برابر رده‌های سلولی SMMC-7721، HepG2، QGY-7703 و HepG2/ADM می‌باشد. بعد از آن به ترتیب عصاره اتیل استاتی دارای اثرات معنی دار سیتوتوکسیک در برابر رده سلولی HepG2/ADm بود. این ترکیبات موثره دارای اثراتی مشابه داروی کنترل سیسپلاتین داشتند (Sarabhai et al., 2015).

نتیجه‌گیری نهایی

این پژوهش به منظور تعیین مقادیر متابولیت‌های ثانویه عصاره‌های مختلف اندام رز ایرانی و ارزیابی مقادیر متابولیت‌های ثانویه به روش کروماتوگرافی مایع، بررسی خواص آنتی‌میکروبی و سمیت سلولی آن‌ها انجام گرفت. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داد که عصاره متانولی اندام هوایی افزایش معنی‌داری در مقادیر متابولیت‌های ثانویه نسبت به سایر عصاره‌های اتیل استاتی، پترولیوم اتری و آبی داشت. هم چنین نتایج نشان داد که عصاره متانولی بیشترین مقادیر فعالیت‌های بیولوژیکی را نیز به خود اختصاص دادند. در بررسی اثرات میکروبی عصاره‌ها بر روی تعداد ١٠ باکتری و قارچ مختلف، مشخص شد که عصاره

1. *Escherichia coli*
2. *Escherichia coli*
3. *Salmonella*
4. *Listeria*
5. *Escherichia coli*
6. *Escherichia coli*
7. *Staphylococcus aureus*

متانولی دارای بالاترین اثرات آنتی میکروبی بود. نتایج ارزیابی سمیت سلولی بر روی تعداد هشت رده سلول سرطانی نشان داد که اندام هوایی گیاه رز ایرانی دارای اثرات آنتی‌توموری معنی‌داری است. در پایان با توجه به بومی بودن گل رز ایرانی، سازگاری این گیاه به شرایط اقلیمی مناطق مختلف ایران، پرورش آسان و کم هزینه این گیاه، وجود انواع متعدد متابولیت‌های ثانویه گیاهی در آن، مطالعات حیوانی روی خواص ضد سرطانی ترکیبات این گیاه پیشنهاد می‌شود.

References

1. Ayati, Z., Amiri, M.S., Ramezani, M., Delshad, E., Sahebkar, A., Emami, S.A. 2018. Phytochemistry, traditional uses and pharmacological profile of Rose hip: A review. Current pharmaceutical design, 24: 4101-4124.
2. Azadmanesh, R., Tatari, M., Asgharzade, A ,.Taghizadeh, S.F., Shakeri, A. 2021. GC/MS profiling and biological traits of *Eucalyptus globulus* L. essential oil exposed to solid lipid nanoparticle (SLN). Journal of essential oil bearing plants, 24: 863-878.
3. Chen, Y., Liu, Z-J., Liu, J., Liu, L-K., Zhang, E-S., Li, W-L. 2015. Inhibition of metastasis and invasion of ovarian cancer cells by crude polysaccharides from *Rosa roxburghii* tratt in vitro. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 15(23):10351-4.
4. Cheng, B.C.Y., Fu, X.-Q., Guo, H., Li, T ,.Wu, Z.-Z., Chan, K., Yu, Z.-L. 2016. The genus *Rosa* and arthritis: Overview on pharmacological perspectives. Pharmacological research 114: 219-234.
5. Djenane, D., Aïder, M., Yangüela, J., Idir, L., Gómez, D., Roncalés, P. 2012. Antioxidant and antibacterial effects of *Lavandula* and *Mentha* essential oils in minced beef inoculated with *E. coli* O157: H7 and *S. aureus* during storage at abuse refrigeration temperature. Meat Science, 92: 667-674.
6. El Omari, K., Hamze, M., Alwan, S., Osman, M., Jama, C., Chihib, N.-E. 2019. In-vitro evaluation of the antibacterial activity of the essential oils of *Micromeria barbata*, *Eucalyptus globulus* and *Juniperus excelsa* against strains of *Mycobacterium tuberculosis* (including MDR), *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gordonae*. Journal of infection and public health, 12: 615-618.
7. Emami, A., Mousavi, Z., Ramezani, V., Shoeibi, S., Rastegar, H., Amirahmadi, M., Emami, I. 2017. Residue levels and risk assessment of pesticides in Pistachio nuts in Iran. Iranian Journal of Toxicology, 11: 1-6.
8. Graziano, M.C., Cuzzullin, G.C., Franco, H.O., Schwartz-Filho, E.D., de Andrade, F.C. 2015. Groppo statins and antimicrobial effects: simvastatin as a potential drug against *Staphylococcus aureus* biofilm, PLoS One, 10: 128-198.
9. Jiménez, S., Gascón, S., Luquin, A., Laguna, M, Ancin-Azpilicueta, C., Rodríguez-Yoldi, MJ. 2016. *Rosa canina* extracts have antiproliferative and antioxidant effects on caco-2 human colon cancer. PloS one. 11: 70-81.
10. Ma, Y., Wang, Y., Zhang, H., Sun, W., Li, Z., Zhang, F., Zhang, H., Chen, F., Zhang, H., An, J. 2020. Antimicrobial mechanism of strictinin isomers extracted from the root of *Rosa roxburghii* Tratt (Ci Li Gen). Journal of ethnopharmacology, 250: 112498.
11. Mármol I, Sánchez-de-Diego C, Jiménez-Moreno N, Ancín-Azpilicueta C, Rodríguez-Yoldi MJ. 2017. Therapeutic applications of rose hips from different *Rosa* species. International Journal of Molecular Sciences, 18(6):1137.
12. Nejatbakhsh F, Shirbeigi L, Rahimi R, Abolhassani H. 2016. Review of local herbal compounds found in the Iranian traditional medicine known to optimise male fertility. Andrologia, 48(8):850-9.
13. Nikolova, G., Karamalakova, Y., Kovacheva, N., Stanev, S., Zheleva, A., Gadjeva, V. 2016. Protective effect of two essential oils isolated from *Rosa damascena* Mill. and *Lavandula angustifolia* Mill, and two classic antioxidants against L-dopa oxidative toxicity induced in healthy mice.

Regulatory Toxicology and Pharmacology, 81: 1-7.
14. Sadraei, H., Asghari, G., Emami, S. 2013. Inhibitory effect of *Rosa damascena* Mill. flower essential oil, geraniol and citronellol on rat ileum contraction. Research in pharmaceutical sciences, 8(1):17.
15. Sarabhai, S., Harjai, K., Sharma, P., Capalash, N. 2015. Ellagic acid derivatives from *Terminalia chebula* Retz. increase the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to stress by inhibiting polyphosphate kinase. Journal of applied microbiology, 118: 817-825.
16. Shakeri, A., Akhtari, J., Soheili, V., Taghizadeh, S.F., Sahebkar, A., Shaddel, R., Asili, J. 2017. Identification and biological activity of the volatile compounds of *Glycyrrhiza triphylla* Fisch. & CA Mey. Microbial pathogenesis, 109: 39-44.
17. Shakeri, A., D'Urso, G., Taghizadeh, S.F., Piacente, S., Norouzi, S., Soheili, V., Asili, J., Salarbashi, D. 2019. LC-ESI/LTQOrbitrap/MS/MS and GC–MS profiling of *Stachys parviflora* L. and evaluation of its biological activities. Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, 168: 209-216.
18. Snene, A., El Mokni, R., Jmii, H., Jlassi, I., Jaïdane, H., Falconieri, D., Piras, A., Dhaouadi, H., Porcedda, S., Hammami, S. 2017. In vitro antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts of wild (*Daucus virgatus* (Poir.) Maire) from Tunisia. Industrial Crops and Products, 109: 109-115.
19. Taghizadeh, S.F., Rezaee, R., Mehmandoust, M., Badibostan, H., Karimi, G. 2020. Assessment of in vitro bioactivities of Pis v 1 (2S albumin) and Pis v 2.0101 (11S globulin) proteins derived from Pistachio (*Pistacia vera* L.). Journal of Food Measurement and Characterization, 14: 1054-1063.
20. Taghizadeh, S.F., Rezaee, R., Mehmandoust, M., Madarshahi, F.S., Tsatsakis, A., Karimi, G. 2019. Coronatine elicitation alters chemical composition and biological properties of Cumin seed essential oil. Microbial pathogenesis, 130: 253-258.
21. Yi, O., Jovel, E.M., Towers, G.N., Wahbe, T.R., Cho, D. 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of native *Rosa* sp. from British Columbia, Canada. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 58: 178-189.
22. Zu, Y., Yu, H., Liang, L., Fu, Y., Efferth, T., Liu, X., Wu, N. 2010. Activities of ten essential oils towards Propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells. Molecules, 15: 3200-3210.