بررسی فعالیت ضد سرطانی و ضد میکروبی عصاره های رزماری، اسپند و قهوه بر رده سلول های سرطانی و باکتری های بیماری زای با منشاغذایی

علی شریف زاده[1*]، فرانک عالی[2]، سایه وهابی[3]

۱.دانشیار، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۲. کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

۳. دانشجوی دکترای دامپزشکی،دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی،شهرکرد، ایران.

***نویسنده مسئول:** *sharifzadeh@iaushk.ac.ir*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۰/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۱

چکیده

علیرغم پیشرفت های سه دهه گذشته در درمان سرطان (شیمی درمانی ، پرتودرمانی و ...)، مقاومت به شیمی درمانی هنوز به عنوان یک معضل اصلی در درمان بیماران مبتلا به سرطان است. هدف از این تحقیق بررسی مقایسه ای عصاره های هیدروالکلی رزماری، اسپند و قهوه بر مهار رشد سلول های رده سلولی سرطان پستان انسان (MCF7) در مقایسه با سلول فیبروبلاست پوست انسان (HDF) وتعیین میزان مهار رشد این عصاره ها بر باکتری های بیماری زای جداشده از مواد غذایی بود. در این تحقیق اثر عصاره های هیدروالکلی رزماری، اسپند و قهوه با غلظت های متفاوت ۲۵۰ و ۱۲۰ و ۶۰ میکروگرم در هر میلی لیتر) بر رده های سلولیMCF7 و HDF بررسی گردید. رده های سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰درصد FBS و ۱درصد پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شده و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد حاوی ۵ درصد دی اکسید کربن و ۹۵درصد رطوبت قرار گرفت. از روش استانداردMTT برای برآورد توانایی زیستی سلول ها در مجاورت عصاره های فوق بهره گرفته شد. هم چنین از روش MIC نیز برای تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره ها بر باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* جدا شده از مواد غذایی استفاده گردید. بر اساس نتایج MTT، عصاره های رزماری، اسپند و قهوه بر حسب غلظت و زمان دارای فعالیت ضدسرطانی بر علیه رده سلولی MCF7 می باشد. در حالی که روی سلول سالم HDF اثر خاصی نشان ندادند. هم چنین عصاره های این گیاهان در غلظت های مختلف دارای اثر مهاری بر رشد باکتری های بیماریزای جداشده از مواد غذایی بود. با توجه به یافته های این تحقیق می توان پیشنهاد نمود که عصاره این گیاهان با غلظت مناسب قابلیت استفاده به عنوان یک مکمل غذایی مناسب برای مهار رشد سلول های سرطانی و مهار رشد باکتری های بیماریزای جدا شده از مواد غذایی را دارا می باشد.

کلید واژه ها: رزماری، اسپند، قهوه، رده سلول سرطانی، باکتری بیماری زا.

مقدمه

در تمام جهان سرطان یکی از معضلات اساسی محسوب می شود. هر ساله بیش از ۱۰ میلیون موارد جدید سرطان شناسایی و بیش از ۲۰ میلیون نفر در دنیا با تشخیص سرطان زندگی می کنند (Petersen., 2009). بروز سالانه سرطان ها در ایران حدود ۷۰۰۰۰ مورد و مرگ و میر در حدود ۳۰۰۰۰ نفر است و با توجه به افزایش امید به زندگی و افزایش درصد سالمندی در کشور انتظار می رود که در دهه های آینده میزان بروز آن به طور قابل توجهی افزایش یابد (حیدری و همکاران، ۱۳۸۸). سرطان پستان از شایع ترین انواع سرطان در بین زنان بوده که علیرغم پیشرفت های بسیار در مورد تشخیص زود هنگام و درمان مناسب این بیماری هنوز هم جان عده زیادی از زنان را در معرض خطر قرار داده است (Erkan et al., 2008). در کشور ما نیز آمارسرطان پستان در حال افزلیش بوده ودر مقایسه با سایر نقاط دنیا ، در زنان جوان (حداقل یک دهه زودتر از زنان سایر کشورها) بیشتر مشاهده می گردد (محقی و همکاران ،۱۳۹۰). بر اساس آمار منتشره از وزارت بهداشت و درمان

هم اکنون سرطان پستان شایع ترین سرطان در بین زنان بوده به شکلی که حدود ۲۵درصد کل سرطان های زنان را شامل شده و پس از سرطان ریه دومین سرطان کشنده محسوب می گردد . طبق اعلام نظر کارشناسان از هر هشت زن ایرانی یک نفر شانس ابتلا به سرطان پستان را دارا می باشد. تا کنون درمان قطعی سرطان به جهت پیچیدگی مکانیسم و وجود عوامل متعدد در شکل گیری آن یافت نشده و مصرف داروهای ضدسرطان مرسوم نیز منتج به ایجاد مقاومت دارویی در سلول های سرطانی شده است (Siegel et al., 2013). متاسفانه بسیاری از داروهای ضدسرطان بر سلول های طبیعی بدن نیز اثر کشندگی دارند، مضاف بر آن که بسیاری از داروهای شیمیایی باعث مشکلات گوارشی، کلیوی و .... می گردند (Holohan et al., 2013).

گیاهان دارویی به علت همراه داشتن ترکیبات مفید دیگری همراه با ترکیبات دارویی، از عوارض جانبی کمتری نسبت به داروهای شیمیایی برخوردارند. برخی از گیاهان دارویی می توانند اثرات خود را در مراحل مختلف رشدسلول های سرطانی اعمال نموده ویکی از گزینه های جدی برای پیشگیری و یا درمان سلول های سرطانی محسوب گردند. از عوامل اصلی در سرطان، استرس اکسیداتیو ناشی از رادیکال های آزاد بوده و این در حالی است که این گیاهان غالبا حاوی ترکیبات آنتی اکسیدان می باشند (Karimoi et al., 2006). در طی ۵ دهه گذشته مطالعات زیادی روی اثرات گیاهان دارویی برانواع سرطان صورت گرفته است. عصاره برخی از این گیاهان در کنترل سلول های سرطانی مؤثر می باشد (Terpinc et al., 2009).

علاوه بر خاصیت آنتی اکسیدانی و اثر ضدسرطانی، عصاره برخی از گیاهان دارویی دارای مواد مؤثری بر علیه میکروب ها ازجمله باکتری ها بوده که برحسب اقلیم جغرافیایی، روش عصاره گیری و .... میزان اثر متفاوت می‌باشد (Oliveria et al., 2019). از میان حلال های آبی، هیدروالکلی، کلروفرم و .... حلال های الکلی جهت عصاره گیری و استخراج عوامل ضدمیکروبی در گیاه مناسب تر است (قربانپور و همکاران، ۱۳۹۵).

رزماری (*Rosmarinus officinalis*) ازجمله گیاهان دارویی با بوته ای معطر و از خانواده نعناعیان بوده که در بیشتر مناطق دنیا از جمله نواحی مختلف کشور پرورش داده می شود و یکی از گیاهانی است که خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی داشته ودر دو دهه اخیر خواص ضدسرطانی آن نیز مورد توجه قرار گرفته است (همتا و همکاران،۱۳۹۰). علیرغم آن که بیشترین عصاره در برگ های این گیاه وجود دارد ولی ساقه وگل گیاه نیز حاوی مقادیر کمی عصاره می باشند. ترکیبات پلی فنلی و ترینوئیدی موجود در گیاه شامل رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، کارنوسول کارنوسونیک اسید، کامفور پولگون ۱و۸-سینول و ایزوبورنیل استات بوده که در مهار رادیکال های آزاد نقش ایفا می کنند (Terpinc et al., 2009).

قهوه (*Coffee*) نیز یکی از منابع آنتی اکسیدان است که در پیشگیری از انواع سرطان موثر است . نوشیدن چندین فنجان قهوه در روز خطر ابتلا به سرطان روده را کاهش می دهد . براساس نتایج محققان میزان ابتلا به سرطان روده در افرادی که چهار فنجان قهوه در روز مصرف می نمایند، ۱۵ درصد کمتر از سایرین می باشد . نوشیدن قهوه میتواند خطرسرطان پروستات مهاجم وپیشرونده رانیزکاهش دهد. هم چنین احتمال ابتلا به سرطان های پیش رونده در مردانی که زیاد قهوه می نوشند، ۶۰ درصد کمتر از مردانی است که اصلا مصرف نمی کنند (Bruck *et al*., 2001).

اسپند (*Peganum harmala*) نیز گیاهی بدون کرک است که در مناطق مختلف آسیا و برخی مناطق مختلف ایران یافت می شود. دانه های اسپند در طب سنتی ایران کاربرد داشته و ازپودر دانه های آن در درمان تومورهای جلدی و زیر جلدی استفاده شده است. اثرات ضد میکروبی، ضدقارچی، ضدتوموری و مهار کننده فعالیت

مونوآمینواکسیدازی از جمله اثرات دیگر دانه های اسپند می باشد(Ganz et al., 2009).

مطالعه حاضر با هدف ارزیابی مقایسه ای اثر ضد سرطانی و ضدباکتریایی عصاره های هیدروالکلی رزماری، اسپند و قهوه صورت پذیرفت تادر تحقیقات آتی بتوان از این عصاره ها به عنوان مکمل های غذایی بهره گرفت.

روش کار

آماده سازی عصاره های گیاهی

در این بررسی نمونه های گیاهان دارویی رزماری، دانه اسپند وقهوه تهیه و سپس توسط کارشناس هرباریوم مرکز تحقیقات جهاد کشاورزی شهرستان شهرکرد مورد شناسایی و نمونه هرباریومی آن به شماره ۳۴۱۴،۳۴۵۴ و ۳۳۵۰۴ به ترتیب در هرباریوم مرکزتحقیقات ثبت ونگهداری گردید. نمونه ها ی رزماری با آب مقطر شسته و به قطعات کوچک تر خردشد. سپس نمونه های اسپند و قهوه نیز به صورت جداگانه توسط آسیاب خانگی پودر گردید. ۵۰ گرم از هریک از پودرها را به صورت مجزا در بالن ریخته و به آن ۴۰۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درجه افزوده تا ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۱۶۰ دور در دقیقه تکان بخورد. عصاره حاصل از این مرحله صاف و مجددا روی مقادیر باقیمانده اتانل ۷۰ درجه اضافه ومرحله قبل تکرار گردید. عصاره های جمع آوری شده در این دو مرحله در دستگاه تقطیر در خلا در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد و با شرایط ۷۰ دور در دقیقه تا زمانی که حجم باقیمانده به یک پنجم حجم اولیه برسد تقطیر و پس از آن محتویات مخزن به داخل پتری دیش منتقل و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در آون خشک گردید . از عصاره حاصله با فسفات بافر سالین (PBS) رقت های ۲۵۰ ، ۱۲۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی لیتر تهیه و با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید. در نهایت عصاره های رقیق شده در میکروتیوب های استریل تا زمان مصرف در فریزر نگهداری شدند .

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی باکتریایی عصاره ها به روش میکروبراث دایلوشن(MIC)

در این آزمایش ابتدا ، چند پرگنه از کشت تازه باکتری های بیماریزای جداشده از مواد غذایی در تحقیقات قبلی (استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی) به محیط کشت مولر – هینتون براث منتقل و پس از گرمخانه گذاری ، کدورتی معادل با نیم مک فارلند تهیه گردید. حساسیت باکتری ها نسبت به عصاره آماده شده با استفاده از روش رقیق سازی در میکروپلیت به شکل جداگانه برای هر باکتری بررسی شد . در این آزمایش ابتدا رقت های مختلف عصاره ، در محیط مولر هینتون براث در میکروپلیت ها تهیه و سپس ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتری با کدورت نیم مک فارلند بود به چاهک ها اضافه گردید. سپس آزمایشات مشابه برای کنترل مثبت (محیط کشت حاوی باکتری و بدون عصاره) و کنترل منفی (محیط کشت دارای عصاره و بدون باکتری) نیز انجام شد. میکروپلیت ها سپس به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری گردید. کمترین رقت از عصاره که کدورتی در آن مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی گزارش گردید.

کشت رده های سلولی MCF7 وHDF

رده های سلولی فوق از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیطRPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱درصد آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین کشت داده شدند. فلاسک های کشت سلول در این مرحله در انکوباتور دارای ۵درصد دی اکسید کربن و۹۵درصد رطوبت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض می گردید.

ارزیابی سمیت سلولی با روش MTT

در این مرحله از فلاسک هایی که با تراکم ۸۰ درصد پر شده بودند ، استفاده گردید. ابتدا محیط کشت از سطح

سلول ها برداشته شده و با افزودن ۱ میلی لیتر تریپسین به مدت ۳ دقیقه و سپس اضافه کردن همین حجم محیط به منظور خنثی کردن اثر تریپسین، همه سلول ها از کف فلاسک جدا گردید. این سوسپانسیون سلولی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد . مایع بالای رسوب دور ریخته و به رسوب ۱ میلی لیتر محیط کشت اضافه گردید . با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از شیرابه سلولی و افزودن همین مقدار تریپان بلو در سطح لام نئوبار، تعداد سلول های زنده شمارش گردید. تعداد ۱۰/۰۰۰ سلول از این سوسپانسیون سلولی پس از محاسبه به هر چاهک از میکرو پلیت های ۹۶ چاهکی افزوده و ۱۸۰میکرولیترمحیط کشت به آن اضافه گردید. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از غلظت های مختلف عصاره ها به چاهک ها اضافه گردید. در این تحقیق ، عصاره های رزماری ، اسپند و قهوه با غلظت های ۶۰ و ۱۲۰ و ۲۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر به سلول های MCF7 و HDF اضافه شد. گروه دیگری از سلول ها به عنوان شاهد، بدون افزودن عصاره های گیاهی، مورد آزمایش قرار گرفتند و هر آزمایش در چهار تکرار انجام شد. پس از گذشت زمان های ۲۴، ۴۸و ۷۲ ساعت، محیط روی سلول ها تعویض گردید. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه و ۴ ساعت در تاریکی در انکوباتور Co2 دار، گرمخانه گذاری شد. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدرژناز میتوکندری سلول های زنده ، محلول زرد رنگ MTT را به کریستال های بنفش رنگ فورمازان که در آب غیر محلول می باشد تبدیل نمود.

در مرحله بعد محیط را خالی نموده و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه جهت حل کردن تکان داده شد تا کریستال های فورمازان حل گردد.در مرحله آخر با طول موج۴۹۲ وسپس ۶۳۰ نانومتر در دستگاه الایزا ریدر جذب نوری قرائت گردید. در نهایت درصد زنده بودن سلول ها پس از تقسیم جذب نوری(OD) سلول های تیمار نسبت به سلول های شاهد در عدد ۱۰۰ضرب و محاسبه گردید. نتایج حاصل با استفاده از نسخه ۲۲ نرم افزار آماریSPSS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

سنجش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

عصاره های استخراج شده از عصاره رزماری، اسپند و قهوه در آزمایش میکروبی علیه دو نوع باکتری گرام مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس) وگرام منفی (اشریشیا کلی) مورد آزمایش قرار گرفته و مشخص گردید که عصاره گیاه اسپند، رزماری و قهوه به ترتیب تا غلظت های ۱۲۰میکروگرم در هر میلی لیتر، ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر و ۱۲۰میکروگرم در هر میلی لیتر برعلیه اشریشیاکلی و تا رقت های ۶۰ میکروگرم در هر میلی لیتر، ۱۲۰ میکروگرم در هر میلی لیتر و۲۵۰ میکروگرم در هر میلی لیتر برعلیه استافیلوکوکوس اورئوس موثر واقع شده است (جدول۱و۲).

جدول۱- نتیجه OD آزمون تعیین حساسیت میکروبی (MIC) عصاره های رزماری ، اسپند و قهوه بر باکتری های *E.Coli*

غلظت (میکروگرم درمیلی لیتر)	رزماری	اسپند	قهوه	کنترل مثبت	کنترل منفی
۶۰	۰.۱۷۶ ±۰.۰۰۶۲۱۸	۰.۱۶۴ ±۰.۰۰۶۳۴۱	۰.۱۸۵ ±۰.۰۰۶۲۱۸	۰.۲۰۲ ±۰.۰۸۳۱۵۶	۰.۱۰۶ ±۰.۰۰۳۲۲۴
۱۲۰	۰.۱۶۵ ±۰.۰۰۶۲۱۸	۰.۱۱۸ ±۰.۰۰۶۲۱۸	۰.۱۲۱ ±۰.۰۰۶۳۳۰	۰.۲۱۰ ±۰.۰۸۳۱۹۰	۰.۱۰۱ ±۰.۰۰۳۱۱۴
۲۵۰	۰.۱۱۶ ±۰.۰۰۵۰۹۹	۰.۱۱۳ ±۰.۰۰۵۱۱۷	۰.۱۱۸ ±۰.۰۰۵۱۴۱	۰.۲۰۸ ±۰.۰۸۳۲۸۴	۰.۱۰۷ ±۰.۰۰۳۳۱۰

جدول۲- نتیجه OD آزمون تعیین حساسیت میکروبی (MIC) عصاره های رزماری، اسپند و قهوه بر باکتری های *S.aureus*

کنترل منفی	کنترل مثبت	قهوه	اسپند	رزماری	غلظت (میکروگرم درمیلی لیتر)
۰.۱۴۶ ±۰.۰۰۳۳۱۷	۰.۳۸۳ ±۰.۰۲۳۹۹۴	۰.۲۱۵ ±۰.۰۰۶۲۱۸	۰.۱۶۴ ±۰.۰۰۵۳۵۸	۰.۲۵۶ ±۰.۰۰۶۳۲۸	۶۰
۰.۱۵۱ ±۰.۰۰۳۲۶۵	۰.۳۹۴ ±۰.۰۲۲۵۹۱	۰.۱۹۸ ±۰.۰۰۶۳۳۰	۰.۱۱۸ ±۰.۰۰۶۱۹۴	۰.۱۶۵ ±۰.۰۰۶۵۴۱	۱۲۰
۰.۱۴۸ ±۰.۰۰۳۲۹۰	۰.۳۸۶ ±۰.۰۲۳۸۸۵	۰.۱۱۸ ±۰.۰۰۵۲۱۵	۰.۱۱۳ ±۰.۰۰۵۱۱۲	۰.۱۱۶ ±۰.۰۰۵۰۹۹	۲۵۰

تاثیر سمیت سلولی عصاره های رزماری، اسپند و قهوه بر رده سلولی سرطانی MCF7

نتایج مربوط به سمیت سلولی عصاره حاصل از رزماری بر سلول سرطانی MCF7 محاسبه گردید. آن چه که نتایج این آزمایش نشان می دهد ، این است که تعداد سلول های رده سلولی سرطان پستان انسان تحت تیمار با غلظت های مختلف عصاره رزماری در هر سه زمان انکوباسیون ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در هر سه گروه (بر اساس غلظت) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. آنالیز آماری با کاربرد آزمون t ، نشان داد که هر چند تراکم سلولی در سلول های تحت تیمار با غلظت ۶۰ میکروگرم برمیلی لیتر نسبت به گروه کنترل، پایین تر (حدودا کمتراز ۵۰درصد) بود اما در هیچکدام از زمان های انکوباسیون این اختلاف تراکم معنی دار نبود . نتایج بررسی آماری در مورد غلظت ۱۲۰ میکروگرم برمیلی لیتر نشان داده که کاهش تراکم در سلول های تحت تیمار نسبت به گروه شاهد ، فقط در زمان ۴۸ و۷۲ ساعت با احتمال ۹۹درصد معنی‌داربود ($p<0.01$) . آنالیز آماری در خصوص غلظت ۲۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر موید تاثیر معنی دار ($p<0.05$) عصاره رزماری در تمام زمان های انکوباسیون بر روی سلول های سرطانی نسبت به گروه شاهد بود.

آنالیز آماری در خصوص تاثیر عصاره اسپند و قهوه بر تراکم سلولی دو گروه سلول های MCF7 تیمار و شاهد نیز، موید این است که هر چند تراکم سلولی در غلظت ۶۰ میکروگرم برمیلی لیتر در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد پایین تر بود اما این میزان اختلاف درمورد اسپند برخلاف قهوه در سطح معنی داری قرار نگرفت. در مورد غلظت های ۱۲۰ اسپند نیز برخلاف قهوه مجددا در دو گروه تیمار و شاهد، میانگین تراکم سلولی تقریبا نزدیک به هم بوده واختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. آنالیز آماری در خصوص غلظت میکروگرم برمیلی لیتر ۲۵۰ اسپند و قهوه موید تاثیر معنی داری ($p<0.05$) این عصاره ها در تمام زمان های انکوباسیون بر روی سلول های سرطانی نسبت به گروه شاهد بود.

عصاره رزماری مشابه عصاره های اسپند و قهوه سمیت سلولی وابسته به دوز بر روی سلول های سرطانی پستان داشت به طوری که با افزایش غلظت عصاره این فعالیت بیشتر گردید .

تاثیر سمیت سلولی عصاره های رزماری، اسپند و قهوه بر رده سلولی طبیعیHDF

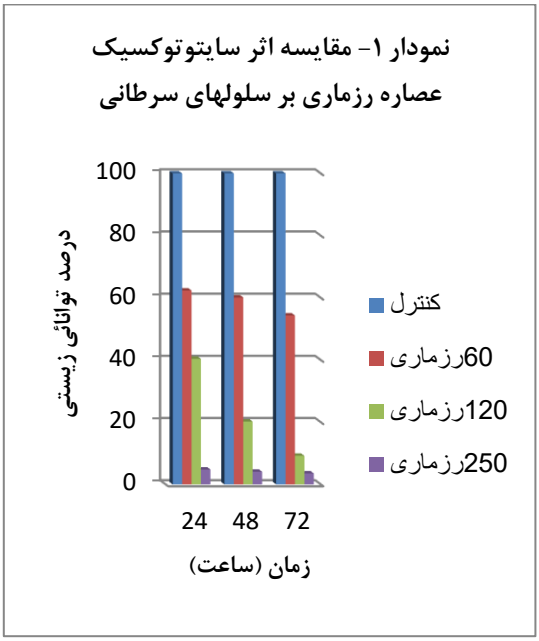
نتایج مربوط به سمیت سلولی عصاره حاصل از رزماری بر سلول های HDF نیز به عنوان گروه شاهد بررسی گردید. نتایج این آزمایش پس از آنالیز آماری با روش آزمون t مستقل، نشان داد که تفاوت میانگین تراکم سلولی بین گروه های کنترل وعصاره رزماری درهیچ کدام ازغلظت های ۱۲۰،۲۵۰و۶۰ میکروگرم برمیلی لیتر همچنین هیچ کدام از زمان های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت معنی‌دارنبود.نتایج تاثیر میزان سمیت عصاره

اسپند و قهوه بر سلول های HDF، با استفاده از آزمون آماری t مستقل ارزیابی گردید.میانگین تراکم سلولی درعصاره اسپند درغلظت ها و زمان های انکوباسیون مختلف هرچند در گروه تیمار نسبت به کنترل بالاتر بوده، اما این تفاوت ها معنی‌دارنبود.

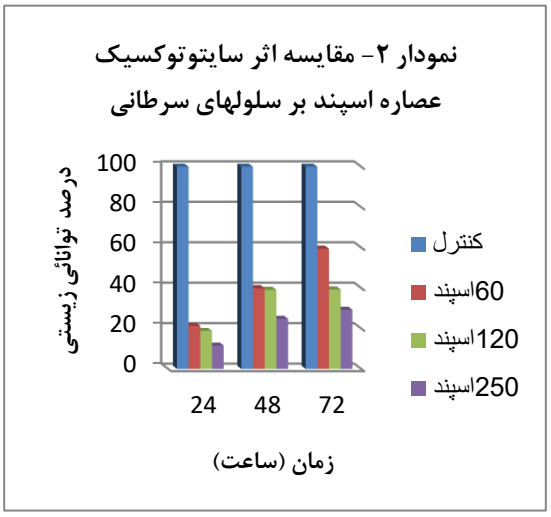
بررسی درصد توانایی زیستی

در نهایت مقدار IC50 نمونه ها که بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰درصد مهار رشد سلول های سرطانی می شود محاسبه ونتایج حاصل از تیمار سلول ها با غلظت های ۶۰ و ۱۲۰ و ۲۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر عصاره ها در زمان های ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه ودرصد توانایی زیستی عصاره ها تعیین ودر نمودارهای ۱و۲ و۳ ترسیم گردید.

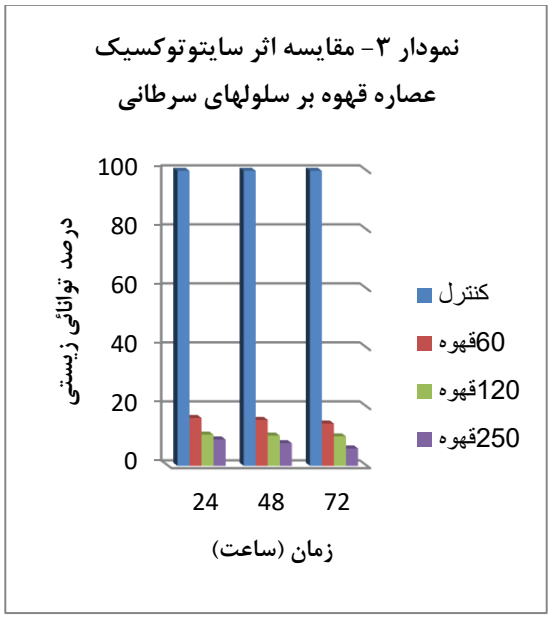
همانطور که در نمودار ها ملاحظه می شود، درصد توانایی زیستی عصاره ها با متغیر های غلظت و زمان وابسته بوده به شکلی که با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون، توانایی زیستی به شکل قابل توجهی کاهش می یابد.



نمودار ۱- درصدتوانایی زیستی غلظت های مختلف عصاره رزماری (میکروگرم برمیلی لیتر) در زمان های مختلف انکوباسیون (کنترل مبین غلظت صفر عصاره می باشد).



نمودار ۲- درصدتوانایی زیستی غلظت های مختلف عصاره اسپند (میکروگرم برمیلی لیتر) در زمان های مختلف انکوباسیون (کنترل مبین غلظت صفر عصاره می باشد).



نمودار ۳- درصد توانایی زیستی غلظت های مختلف عصاره قهوه (میکروگرم برمیلی لیتر) در زمان های مختلف انکوباسیون (کنترل مبین غلظت صفر عصاره می باشد).

بحث

براساس نتایج این تحقیق قهوه نسبت به رزماری واسپند اثر سایتو توکسیک بیشتری برسلول های سرطانی پستان (MCF7) دارا می باشد . اثرات سایتوتوکسیک القا شده توسط این عصاره با زمان و غلظت ارتباط مستقیم داشته به طوری که قابلیت زیست پذیری سلول ها با افزایش غلظت بیشتر وبا افزایش زمان کاهش می یابد. بنابراین

می توان نتیجه گرفت که عصاره اتانولی قهوه ممکن است اثرات قابل توجهی دردرمان سرطان پستان داشته باشد. قهوه هرچند بهترین منبع برای دریافت آنتی اکسیدان در بدن نیست اما براساس یافته های برخی محققین در پیشگیری از انواع سرطان موثر است . کارشناسان نوشیدن چندین فنجان قهوه را در روز برای جلوگیری از سرطان روده توصیه کردند.دو نوع چربی در دانه های قهوه وجود دارد که خاصیت محافظت از کبد در برابر خطر ابتلا به سرطان را دارد. هم چنین کافئین قهوه نیز در کاهش خطر ابتلا به سرطان پوست موثر می باشد (Bruck et al., 2001). محققین نشان دادند که مصرف قهوه می‌تواند بر روی سیستم بدنی بدن اثر گذاشته و احتمال ابتلا به سرطان سینه را کاهش دهد. در این مطالعات خانم‌های یائسه با مصرف دو فنجان قهوه در روز خطر ابتلا به سرطان را تا حدود ۳۰ درصد و خانم‌هایی که پیش از یائسگی هستند با مصرف منظم ۳ تا ۴ فنجان در روز خطر ابتلا به سرطان را تا ۳۸ کاهش می‌دهند. ارتباط بسیار نزدیک پیشرفت سرطان با التهاب و استرس اکسیداتیو از یک سو و دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی و ضد التهابی در قهوه باعث شده است تا این گیاه به عنوان عوامل ضد بدخیمی سلولی مطرح گردد.

نتایج این تحقیق در مورد عصاره رزماری نیز با نتایج سایر محققین همخوانی دارد به طوری که تجویز خوراکی عصاره رزماری از طریق افزودن به آب آشامیدنی توانسته است اندازه تومور را در موش سوری کاهش دهد . هم چنین افزایش بیان پروتئین های پیش آپوپتوزی از جمله BAX نیز در مورد رزماری گزارش گردیده است (Moore et al., 2016., Petiwala et al., 2014). اثر آنتی اکسیدانی عصاره رزماری در سلول های سرطانی کولون و لوسمی نیز نشان داده شده است . هم چنین اثر ضد سرطانی این عصاره بر رده های مختلف سلول های سرطان کولون، پانکراس، پروستات، ریه، مثانه و کبد نیز بیان شده است. در مدل های حیوانی نیز اثر ضدسرطانی بررسی گردیده است. آنتی اکسیدان ها با از بین بردن رادیکال های آزاد ، سلول ها را از آسیب اکسیداتیو و مرگ سلولی در امان نگاه می دارد. فیتو استرول ها ، فلاونوئیدها ، کاروتنوئیدها و ترینوییدها ترکیبات شیمیایی دارای خواص آنتی اکسیدانی در این گیاهان بوده که ضمن جذب رادیکال های آزاد و تحریک دستگاه ایمنی مسیرهای متابولیک مرتبط با گسترش سرطان را نیز مهار می کند (González et al., 2014).

در مورد عصاره اسپند نیز در این تحقیق اثرات مهار رشد سلول های سرطانی مشاهده گردید . در تحقیقات مشابه نیز اثرات عصاره آلکالوئیدی اسپند بر کاهش تکثیر سلولی سلول های سرطانی کبد و پوست بررسی گردیده است (فروزنده و همکاران ،۱۳۹۳) . تاثیر مواد موثره اسپند نیز بر رده های سلولی سرطانی مقاوم به دارو نیز تحقیق شده است (Ishida et al., 1999). Hussam در سال ۲۰۱۰ و Hamsa در سال ۲۰۱۱ اثرات سیتو توکسیک این عصاره را بر سرطان حنجره و ملانوم پوست بررسی نمودند. هم چنین تحقیقات مشابهی در مورد سلول های سرطانی گردن رحم اپی تلیال گردن رحم و روده نیز انجام گردیده است (Hussam et al., 2010., Hamsa et al., 2011). هارمول و مشتقات آلکالوئیدی این گیاه با ممانعت از تقسیم سلولی از رشد سلول های لوسمیک ممانعت وبرخی مشتقات دیکر از عملکرد آنزیم توپوایزومراز ممانعت می نماید. آلکالوئیدهای تجمع یافته در دانه گیاه عمده ترین ترکیب فعال آن بوده که اثر ضدسرطانی داشته واین اثر در رده های سلولی متعددی بررسی گردیده است (Jimenez et al., 2008). در خصوص اثر ضدمیکروبی این عصاره های گیاهی نیز تاکنون تحقیقات وسیعی صورت پذیرفته است. (Santoyo et al., 2006; Da Silveira et al., 2014). هرچند که به شکل مرسوم از دود اسپند برای ضدعفونی استفاده می گردد ولی اثر عصاره اسپند برباکتری های بیماریزا نیز بررسی گردیده است (Abdulridha et al., 2019). این اثرهم درمورد دانه اسپند و هم در مورد برگ آن نشان داده شده است (Iranshahy et al, 2019).

هم چنین در مورد رزماری نیز بررسی های مشابهی وجود دارد (Oliveria et al.,2019). در تحقیق حاضر نیز مشابه نتایج سایر محققین تمامی عصاره ها البته در غلظت های متفاوت دارای فعالیت مهاری در مقابل باکتری های بیماریزای جداشده از مواد غذایی نشان داده شده است به شکلی که در برخی تحقیقات قابلیت استفاده از این عصاره ها به عنوان نگهدارنده مواد غذایی نیز تایید گردیده است (He et al., 2010)

امروزه سرطان به عنوان یک مشکل اساسی در کشور به حساب می آید به طوری که پس از بیماری های قلبی عروقی و تصادفات در جایگاه سوم مرگ و میر محسوب می شود. لازم به ذکر است که تنها ۱۰- ۵ درصد سرطان ها به علت مشکلات ژنتیکی به وجود می آیند (Chin et al., 2005) و ۹۵-۹۰ درصد آن ها به علت عوامل محیطی وسبک زندگی ایجاد می گردد، به نحوی که ۳۰-۲۵ درصد از همه موارد سرطان در آمریکا ناشی از استعمال تنباکو، ۳۵-۳۰درصد مربوط به رژیم غذایی ،۲۰-۱۵درصد ناشی از عفونت ها ،۲۰-۱۰درصد مربوط به چاقی و ۱۵-۱۰درصد سایر عوامل است (Anand et al., 2008). از آن جا که هم اکنون شیمی درمانی پرکاربردترین روش در بین شایع ترین روش های درمان سرطان (جراحی و پرتو درمانی) بوده و مقاومت سلول های سرطانی نسبت به دارو، عوارض جانبی حاصل از شیمی درمانی به همراه هزینه بالای این روش می باشد (Honardoost et al., 2016). لذا پیشنهاد ترکیبی از روش های درمانی برای بیماران می‌گردد. هم اکنون به تدریج اکثر پزشکان رویکرد جدیدی نسبت به طب مکمل داشته و از گیاه درمانی برای کمک به روند درمان بهره می گیرند (عبدالمالکی و همکاران،۱۳۹۶).

نتیجه گیری کلی

از آن جا که نوع فعالیت فیزیکی و رژیم تغذیه ای می توانند ریسک ابتلا به سرطان را تحت تاثیر قرار دهد و با توجه به آن که تاکنون از این منظر مطالعه ای در مورد مقایسه خواص ضد سرطانی عصاره های هیدرو الکلی این عصاره ها بر سلول های سرطانی پستان به همراه اثر ضدباکتریایی بر باکتری های بیماریزای با منشا غذایی صورت نگرفته بود این تحقیق صورت پذیرفت تا بتوان در تحقیقات آتی از این عصاره ها به عنوان نگهدارنده مواد غذایی برای همه مردم وبه خصوص بیماران مبتلا به سرطان بهره گرفت.

منابع

۱. حیدری، سعیده.، سلحشوریان، آسیه.، رفیعی، فروغ.، حسینی، فاطمه .(۱۳۸۸). ارتباط حمایت اجتماعی درک شده از سوا منابع حمایتی مختلف و اندازه شبکه اجتماعی با کیفیت زندگی بیماران مبتلا به سرطان. نشریه دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه علوم پزشکی ایران، دوره ۲۲ ، شماره ۶۱ ، صفحه ۲۲-۱۵ .

۲. عبدالمالکی، نازنین.، جوانی جونی، فاطمه.، عبدالمالکی، زهره .(۱۳۹۶). ارزیابی فعالیت ضدسرطانی عصاره گیاه رزماری و تابش اشعه گاما بر رده های سلولی سرطان پستان و سلول های فیبروبلاست . مجله پژوهش های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۲، صفحه ۳۶-۲۳ .

۳. فروزنده، فروزان.، سلیمی ، سعیده.، نقش، نوشین.، زمانی، نسیم.، جهانی ، سمیه. (۱۳۹۳) . بررسی اثر ضدسرطانی عصاره هیدروالکلی دانه گیاه اسپند بر روی سلول های کارسینومای اپی تلیال گردن رحم انسان. مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد ، دوره ۱۶، شماره ۴، صفحه ۸-۱ .

۴. قربانپور، محمد.، جاهدی، حجت.(۱۳۹۵). مطالعه اثر ضد میکروبی عصاره های مختلف اسپند ، رزماری و برگ بو استخراج شده با امواج فراصوت ، مجله بهداشت مواد غذایی، دوره ۶، شماره ۲، صفحه ۴۲-۲۳.

۵. محقی، نسیم.، افشاری، جلیل.، بروک، اعظم. (۱۳۹۰) . بررسی اثر سمیت سلولی عصاره آبی زنجبیل تازه بر سلول های سرطان پستان، فصلنامه دانشگاه علوم

پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد ، دوره ۱۷، شماره ۳، صفحه ۳۴-۲۸ .

۶. همتا، احمد.، پروینی، پیوند. (۱۳۹۰). بررسی خواص ضدسرطانی تاکسول و عصاره های هیدروالکلی و آبی رزماری بر سلول های سرطان پستان القاشده در رت. مجله علمی سلول و بافت، جلد۲، شماره ۲، صفحه ۱۲۶-۱۱۷.

7. Abdulridha M, Abdulhussein H,Alyaseen F,Hassan B. 2019 . Phytochemical and Antibacterial activity of the *PEGNUM HARMALA* seeds and its alkaloids. *Plant Arch.* 19 (1):1439-1444.

8. Anand P. Kunnumakara A.B. Sundaram C. Harikumar K.B. Tharakan S.T Lai O.S.2008. Cancer is a preventable disease that require major lifestyle changes. Pharm Res. 22(9): 2097-116.

9. Bruck R. Shirin H. Aeed H. Matas Z. Hochman A. Pines M .2001. Prevention of hepatic cirrhosis in rats by hydroxyl radical scavengers. J Hepato .35(4):457-464.

10. Chin T. Tan S.H. Lim S.E. Iau W.P. Yong S.W, Wong S.C.2005. Acceptance, motivators, and barriers in attending breast cancer genetic counseling in Asians. Cancer Detec Prev. 29(5): 412-18.

11. Da Silveira S.M. Luciano F.B. Fronza N. Cunha A. Scheuermann G.N. and Werneck Vieira C.R. 2014. Chemical composition and antibacterial activity of Laurusnobilis essential oil towards foodborne pathogens and its application in fresh Tuscan sausage stored at 7 °C, Food Sci and Tech. 59(1): 86-93

12. Erkan N. Ayranci G. Ayranci E. 2008.Antioxidant activities of rosemary (Rosmarinus Officinalis L.) extract, blackseed (Nigella sativa L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. Food Chem .110(1): 76-82

13. Ganz P.A. 2009. Survivorship: adult cancer survivors. Prim Care. 36(4):721-741

14. González-Vallinas M. Molina S. Vicente G. Zarza V. Martín-Hernández R. 2014. Expression of MicroRNA-15b and the Glycosyltransferase GCNT3 Correlates with Antitumor Efficacy of Rosemary Diterpenes in Colon and Pancreatic Cancer. PLoS ONE. 9: e98556.

15. He L. Liu Y. Mustapha A. and Lin M. 2010. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against Botrytis cinerea and Penicilliumexpansum. Microbiol Res. 166 (3):207-215

16. Hamsa T.P. Kuttan G.2011. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. J Chin Med. 6(1): 11.

17. Holohan C. Van Schaeybroeck S. Longley D.B. Johnston P.G.2013. Cancer drug resistance: anevolving paradigm. Nat Rev Cancer .13(10): 714-26.

18. Honardoost M.A.S. Horyeh A. Rajaei F.2013. Apoptosis: programmed cell death. J of Med Sci. 17(3): 48-57

19. Hussam Eden M. Maeda H. Zaid Abdul A.2010. Cytotoxic Effect of Peganum harmala L. Extractand Induction of Apoptosis on Cancerous Cell Line. Iraqi J Cancer Med Genet. 15(3): 1-16

20. Iranshahy M. Fazly Bazzaz. Haririzadeh G. Abootorabi Z. Mohamadi A., Khashyarmanesh Z. 2019. Chemical composition and antibacterial properties of Peganum harmalaL AJP. 9(6): 530-537

21. Ishida J. Wong H.K. Baston K.F. Hu C.Q. Lee K.H.1999. Anti-tumor agents cytotoxicity of harmine and β- carbolin analoges. Bioorg Med Chem Lett. 9(23): 3319-24.

22. Jimenez J. Rivero N. L. Rodrıguez R.2008. Cytotoxicity of the b-carboline alkaloids harmine and harmaline in human cell assays in vitro. Exp Mol Pathol. 60(4): 381–89.

23. Karimoi H.M. Pourdehghan M. Faghihzadeh S. Montazeri A. Milani J.M.2006. The Eeffects of Group Counseling on Symptom Scales of Life Quality in Patients with Breast Cancer Treated by Chemotherapy. J Kermanshah University of Med Sci (Behbood) .10(1):10-22

24. Moore J. Megaly M. Macneil A.J. Klentrou P. Tsiani E. 2016. Rosemary extract reduces Akt/mTOR/p70S6K activation and inhibits proliferation and survival of A549 human lung cancer cells. Biomed. Pharma. 83:725–732.
25. Oliveria J. Camergo S. Dias L. 2019. Rosmarinus officinalis L. (rosemary) as therapeutic and prophylactic agent. J bio med sci. 26(5): 1-22
26. Petersen P.2009. Oral cancer prevention and control- the approach of the world health organization. Oral Oncology. 45(4-5): 454-60.
27. Petiwala S.M Berhe S. Li G. Puthenveetil A.G. Rahman O. Nonn L. Johnson J.J. 2014. Rosemary Rosmarinus officinalis) Extract Modulates CHOP/GADD153 to Promote Androgen Receptor Degradationand Decreases Xenograft Tumor Growth. PLoS ONE. 9: e89772.
28. Santoyo S. Lloría R. Jaime L. Ibañez E. Seoráns F.J. and Reglero G. 2006. Supercritical fluid extraction of antioxidant and antimicrobial compounds from Laurusnobilis L. chemical and functional characterization. Euro Food Res and Tech. 222: 565–571.
29. Siegel R. Naishadham D. Jemal A.2013. Cancer statistics. Cancer J of Clin. 63(1):11-30.
30. Terpinc P. Bezjak M. Abramoviĉ H. A.2009. kinetic model for evaluation of the antioxidant activity of several rosemary extracts. Food Chem. 115(2): 740-4.

The survey of anticancer and anti-microbial properties of *Rosmarinus officinalis L, Peganum harmala L* and *Coffee* extracts on cell viability of cancer cells and pathogenic bacteria in foods

Sharifzadeh A[1*], Aali F[2], Vahhabi S[3]

1. Department of veterinary medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.
3. Veterinary Student, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran.

***Corresponding author:** *sharifzadeh@iaushk.ac.ir*

Received: 01 January 2020 Accepted: 30 March 2020

Abstract

Despite significant advances in radiation therapy and cancer treatments in the past 30 years, resistance to chemotherapy is a major obstacle in the recovery of patients with cancer. Resistance to chemotherapy drugs inhibits the recovery process. This study aims to evaluate the anticancer activity of the hydroalcolic extracts of *Rosemary, Peganum,* and *Coffee* on growth inhibition of MCF-7 cell line and determine the rate of growth inhibition of pathogenic bacteria isolated from food. We examined cytotoxicity effects of three different concentrations (60,120,250 µg/ml) of *Rosemary, Peganum,* and *Coffee* extracts on MCF-7and HDF cell lines. The cell lines were grown in RPMI supplemented with 10% FBS, 1% penicillin, and streptomycin. The cells were allowed to incubate at 37ºC in an atmosphere that contained 5% CO2 and 95% humidity. The standard MTT assay was performed to estimate cell viability after treatment by *Rosemary, Peganum,* and *Coffee* extracts. The extracts were also used with MIC on Staphylococcus aureus and E. coli bacteria isolated from food. The results of the MTT assay showed that the *Rosemary, Peganum* and *Coffee* extracts had time-and concentration-dependent anticancer activities on the MCF-7cell line compared to HDF cells statistically significant ($p<0.01$). As the *Rosemary* extract had more effect on the control of cell proliferation than the other two extracts. Also, these extracts at different concentrations had an inhibitory effect on food pathogenic bacterial growth. Our results have suggested that these plants extract is a potential candidate, either alone at pre-determined doses, for the dietary supplement suitable for the inhibitory effect on food pathogenic bacterial growth and cancer cell lines.

Keywords: *Rosemary, Peganum, Coffee*, cancer cell line, pathogenic bacteria.