Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

Evaluation of Antibacterial Properties and Cytotoxicity of Ethanolic Extract of *Alhagi Maurorum*

F. S. Motafeghi (PhD)[1], M. Shokrzadeh (PhD)[*1], H. Mohammadi (MSc)[2], Sh. Shokrzadeh [3], H. Razaghi (MSc)[4]

1.Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
2.Diabetes Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
3.Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
4.Department of Genetics, Nonprofit University of Sana, Sari, I.R.Iran.

Article Type

Research Paper

Received:
Sep 7th 2022
Revised:
Jan 24th 2023
Accepted:
Mar 15th 2023

ABSTRACT

Background and Objective: Cervical cancer is the fourth most common cancer in the world. The most important issue in cancer treatment is the destruction of cancer cells in the presence of normal cells. For this reason, it is necessary to use natural resources such as plants to treat cancer. The aim of this study is to evaluate the antibacterial effects of the ethanolic extract of *Alhagi maurorum* on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and cytotoxicity on HeLa cervical cancer cell line.

Methods: In this experimental study, first the ethanolic extract of *Alhagi maurorum* was prepared, and then the two standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 27853) were lyophilized by culturing in nutrient medium. In order to confirm the standard strains, biochemical tests were performed. Microdilution method was used to determine the minimum inhibitory concentration and after obtaining the minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal concentration was evaluated. Furthermore, the effects of the cytotoxicity of the extract at concentrations of 0.1, 10, 50, 100, 500 and 1000 µg/ml was evaluated on the HeLa cell line in a period of 48 hours using the MTT method and comparing its toxicity with the cisplatin group (positive control group).

Findings: Ethanol extract of *Alhagi maurorum* at a concentration of 50 µg/ml reduced the growth of cancer cells, and in the statistical comparison, 50, 500 and 1000 µg concentrations revealed significant differences ($p<0.05$). According to minimum inhibitory concentration results, the minimum growth inhibitory concentration of the extract on the standard strain of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* was reported to be 4000 and 16000 µg/ml, respectively, and according to minimum bactericidal concentration results, the minimum bactericidal concentration of the extract was found 4 times the minimum inhibitory concentration (16000 µg/ml) in *Staphylococcus aureus* (ATCC: 25923), but it was not lethal in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC: 27853).

Conclusion: The results of the study showed that the ethanolic extract of *Alhagi maurorum* affected HeLa cells through antioxidant activity and inhibited their growth, and according to minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration results, it was also shown that the most inhibitory effect was on the standard strain of Staphylococcus aureus while it showed no effects on the strain of *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: *Alhagi Maurorum Extract, Cell Viability, Staphylococcus Aureus, Pseudomonas Aeruginosa*.

Cite this article: Motafeghi FS, Shokrzadeh M, Mohammadi H, Shokrzadeh Sh, Razaghi H. Evaluation of Antibacterial Properties and Cytotoxicity of Ethanolic Extract of *Alhagi Maurorum*. *Journal of Babol University of Medical Sciences*. 2023; 25(1): 340-7.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

***Corresponding Author: M. Shokrzadeh (PhD)**
Address: Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, I.R.Iran.
Tel: +98 (11) 33543814. **E-mail:** mslamuki@gmail.com

Journal of
Babol University of Medical Sciences
مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل
e-ISSN: 2251-7170 p-ISSN: 1561-4107

ارزیابی خواص ضد باکتریایی و سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه خارشتر (*Alhagi maurorum*)

فرزانه السادات متفقی (PhD)[1]، محمد شکرزاده (PhD)[1*]،
حمیده محمدی (MSc)[2]، شقایق شکرزاده [3]، حسن رزاقی (MSc)[4]

۱. گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۲. مرکز تحقیقات دیابت، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۳. دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
۴. گروه ژنتیک، موسسه غیرانتفاعی سنا، ساری، ایران

نوع مقاله
مقاله پژوهشی

دریافت:
۱۴۰۱/۶/۱۶
اصلاح:
۱۴۰۱/۱۱/۴
پذیرش:
۱۴۰۱/۱۲/۲۴

چکیده

سابقه و هدف: سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در جهان است. مهمترین مسئله در درمان سرطان، تخریب سلول‌های سرطانی در حضور سلول‌های طبیعی است. به همین دلیل استفاده از منابع طبیعی مانند گیاهان برای درمان سرطان ضروری است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات ضد باکتریایی عصاره اتانولی گیاه خارشتر بر استافیلوکوکوس اورئوس و سودموناس آئروژینوزا و سمیت سلولی بر رده سلولی سرطان رحم Hela می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی، ابتدا عصاره اتانولی خارشتر تهیه شد و سپس احیای دو سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) و سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) لیوفریزه با کشت در محیط مغذی انجام شد. به منظور تایید سویه‌های استاندارد تست‌های بیوشیمیایی انجام شد. برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (Minimum Inhibitory Concentration) از روش میکرودایلوشن استفاده شد و بعد از به دست آوردن MIC، حداقل غلظت کشندگی (Minimum Bactericidal Concentration) مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثرات سمیت سلولی عصاره در غلظت‌های (۰/۱، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) بر روی رده سلولی HeLa در مدت زمان ۴۸ ساعت توسط روش MTT و مقایسه سمیت آن با گروه سیس پلاتین (گروه کنترل مثبت) بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره اتانولی گیاه خارشتر از غلظت ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رشد سلول‌های سرطانی را کاهش داده است که در مقایسه آماری غلظت‌های ۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم اختلاف معنی‌داری داشتند ($p<0/05$). طبق نتایج MIC حداقل غلظت مهاری رشد عصاره روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئورژینوزا به ترتیب ۴۰۰۰ و ۱۶۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر گزارش شد و طبق نتایج MBC حداقل غلظت کشندگی عصاره ۴ برابر MIC (۱۶۰۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر) در گونه استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) مشاهده گردید ولی در گونه سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) توانایی کشندگی نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی گیاه خارشتر از طریق فعالیت آنتی اکسیدانی بر سلول‌های Hela اثر کرده و سبب مهار رشد آنها شده است و طبق نتایج MIC و MBC هم نشان داده شد که بیشترین اثر مهارکنندگی روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس بوده و روی سویه سودوموناس آئورژینوزا اثری نداشته است.

واژه‌های کلیدی: عصاره خارشتر، زنده مانی سلولی، استافیلوکوکوس اورئوس، سودوموناس آئورژینوزا.

استناد: فرزانه السادات متفقی، محمد شکرزاده، حمیده محمدی، شقایق شکرزاده، حسن رزاقی. ارزیابی خواص ضد باکتریایی و سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه خارشتر (*Alhagi maurorum*). مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی بابل، ۱۴۰۲؛ ۲۵(۱): ۷-۳۴۰.

© The Author(S).
Publisher: Babol University of Medical Sciences

▣ این مقاله مستخرج از پایان نامه حسن رزاقی دانشجوی کارشناسی ارشد رشته ژنتیک و طرح تحقیقاتی به شماره گرنت ۱۷۱۲۶۱۸ موسسه غیرانتفاعی سنا می‌باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمد شکرزاده
آدرس: ساری، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی. تلفن: ۳۳۵۴۳۸۱۴-۰۱۱ رایانامه: mslamuki@gmail.com

مقدمه

سرطان دهانه رحم چهارمین سرطان شایع در جهان است (۱). به دلیل افزایش شیوع سرطان درمان‌های چند گانه مورد توجه می‌باشند. پاسخ اولیه به شیمی درمانی و جراحی عموماً مثبت است، اما بیماران عموماً از عود و برگشت تومور شکایت دارند (۲). مهمترین مسئله در درمان سرطان تخریب سلول‌های سرطانی در حضور سلول‌های طبیعی است. به همین دلیل استفاده از منابع طبیعی مانند گیاهان برای درمان سرطان ضروری است (۳). همچنین حذف عفونت‌های باکتریایی به ویژه عفونت‌های ناشی از سودوموناس آئورژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس که طیف وسیعی از عفونت‌ها را در محیط‌های بیمارستانی و خارج از بیمارستان ایجاد نموده و با انواع استراتژی‌های مقاومت ذاتی، تطبیقی و اکتسابی در برابر آنتی بیوتیک‌ها مقاومت نشان می‌دهند، بسیار اهمیت دارند. سویه‌هایی از این باکتری‌ها، عفونت بیوفیلم ایجاد می‌کنند (۴). استفاده نامنظم، نامناسب و غیرمنطقی از آنتی بیوتیک‌ها منجر به بروز مقاومت میکروارگانیسم‌ها در مقابل ترکیبات ضد میکروبی شده است. ایجاد مقاومت در میکروارگانیسم‌ها در ایجاد عفونت‌های حاد، موجب گردیده که استفاده از متابولیت‌های گیاهان برای بهره‌مندی از اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی آن‌ها مورد توجه قرار گیرد (۵).

طبق نتایج تحقیق Moore، سرطان Hela در جهان از رشد فزاینده و نامنظم سلول‌های اپیتلیالی دهانه رحم و ریزش مداوم سلول‌ها ایجاد می‌شود و مهمترین عامل آن، ویروس پاپیلومای انسانی است، جهت مطالعات تحقیقاتی در زمینه سرطان، از سلول‌های سرطانی HeLa استفاده می‌شود که از مزیت‌های آن می‌توان به توانایی تکثیر نامحدود و تحمل پاسژهای طولانی اشاره کرد (۶).

گیاه خارشتر Alhagi maurorum به طور گسترده برای چندین هدف دارویی استفاده می‌شود، خارشتر یک گیاه چند ساله از خانواده Fabacea و راسته Fabales به وفور در عربستان سعودی، خاورمیانه و سایر مناطق جهان رشد می‌کند و دارای نام‌های رایج مانند خارشتر، گیاه مانا ایرانی یا مانای خزری می‌باشد (۷). از این گیاه و گل آن در طب سنتی به عنوان یک ملین، معرق، دفع کننده، مدر و خلط آور و عصاره‌ها به عنوان دارو برای درمان زگیل و میگرن استفاده می‌شود. از عصاره برگ آن به عنوان روغن برای درمان رماتیسم و از عصاره ریشه آن برای از بین بردن سنگ کلیه با شل کردن حالب استفاده می‌شود (۸). گیاه خارشتر سرشار از فلاوونوئیدها، ترکیبات فنلی، گلیکوزیدها، آنتراکینون‌ها، ساپونین‌ها، استروئیدها، تانن‌ها و آلکالوئیدها می‌باشد. این‌ها ترکیبات بازدارنده پراکسیداسیون لیپیدی هستند. فلاونوئیدها متابولیت‌های ثانویه هستند که نقش آنتی اکسیدانی، ضد حساسیت، ضد التهاب، ضد باکتریایی، ضد قارچی و ضد ویروسی دارند (۹). این گیاه دارای فعالیت ضد درد محیطی و مرکزی با دوز ۴۰۰ میلی‌گرم/ کیلوگرم است که به عنوان آنتی اکسیدان عمل می‌کند (۱۰). گزارش شده است که عصاره کامل خارشتر به دلیل حضور این ترکیبات پیچیده دارای خواص ضد سرطانی، ضد باکتریایی، ضد التهابی، ضد آلرژی، ضد ویروسی و ضد لخته نیز می‌باشد. فلاوونوئیدهای متنوع این گیاه سبب اثرات ضد سرطانی و تانن‌های گیاه دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد ویروسی می‌باشند (۱۱). در مطالعات صورت گرفته دریافتند که عصاره خارشتر دارویی موثر برای بیماری‌های کبد و مجاری ادراری است (۱۲).

با توجه به توضیحات بالا، این مطالعه به منظور ارزیابی خاصیت مهار باکتریایی و سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه خارشتر بر رده سلولی Hela و باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلو کوکوس اورئوس انجام شد.

مواد و روش ها

این مطالعه تجربی پس از تصویب در موسسه غیرانتفاعی سنا با کد ۱۷۱۲۶۱۸ به منظور ارزیابی خواص ضد باکتریایی و سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه خارشتر بر رده سلولی هلا (Hela)، سویه استاندارد سودوموناس آئورژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

در این مطالعه از دو سویه استاندارد باکتری شامل، سویه استاندارد باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس ATCC: 25923 و سویه استاندارد گرم منفی سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 تهیه شده از بانک میکروبی انسیتو پاستور و یک رده سلولی سرطانی دهانه رحم (Hela) تهیه شده از انسیتو پاستور استفاده شد. سلول‌های HeLa (CCL-2^{TM}) اولین سلول‌های انسانی جاودانه هستند که در محیط کشت رشد کرده‌اند. این سلول در سال ۱۹۵۱ از سرطان دهانه رحم ناشی از یک بیمار ۳۱ ساله جدا شدند. این مطالعه با ۸ گروه انجام شده است:

گروه اول کنترل منفی: سوسپانسیون سلولی

گروه دوم کنترل مثبت: سوسپانسیون سلولی + سیس پلاتین ۳ میکرومولار (ویال سیس پلات ۵۰ میلی‌گرم/۵۰ میلی‌لیتر، داروسازی سبحان انکولوژی)

گروه‌های سوم تا هشتم درمانی: سوسپانسیون سلولی + غلظت‌های (۰/۱، ۱۰، ۵۰،۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره اتانولی خارشتر.

در تمامی گروه‌ها ۳ بار تکرار در نظر گرفته شد و مدت زمان مطالعه ۴۸ ساعت بود.

آماده سازی نمونه گیاه خارشتر و تغلیظ سازی عصاره: گیاه خارشتر از بازار خریداری شد پس از خشک کردن تا جایی که امکان داشت توسط آسیاب پودر گردید. پس از تهیه بخش‌های هوایی گیاه و جدا کردن ناخالصی‌های آن مقدار ۸۰۰ گرم از گیاه به وسیله آسیاب خرد شد و با نسبت ۳۰ به ۷۰ با اتانول ۹۶٪ مخلوط شد و بعد به مدت ۷۲ ساعت روی دستگاه تکان دهنده یا شیکر قرار گرفت و هر ۲۴ ساعت عصاره جدا گردیده سپس عصاره حاصل توسط کاغذ صافی و قیف، صاف گردید. سپس عصاره در دستگاه تقطیر در خلا در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و در چرخش ۷۰٪ تقطیر شد تا زمانی که حجم باقی مانده به یک چهارم حجم اولیه رسید. در این حالت مخزن عصاره را از دستگاه جدا کرده و عصاره باقی مانده را در ظرف پتری ریخته و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون خشک گردید. عصاره تغلیظ شده به منظور خشک شدن و تبدیل شدن به پودر به دستگاه خشک کن انجمادی (Freeze dryer) منتقل شدند (۱۵-۱۳).

نگهداری و کشت رده سلولی Hela: در این مطالعه تجربی از رده سلولی سرطانی هلا (Hela) که از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران تهیه شد استفاده گردید. سپس رده سلولی در محیط کشت DMEM حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین و استرپتومایسین در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت کافی و میزان ۵٪ دی اکسید کربن نگهداری شد و وقتی که تا ۷۰٪ رشد خود رسید سلول‌ها را توسط تریپسین از ته فلاسک جدا و با دور rpm ۱۵۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ انجام شد و رسوب سلولی ایجاد شده را به حالت سوسپانسیون تهیه و برای درصد زنده ماندن سلول‌ها از رنگ تریپان بلو و لام همو سایتومر توسط میکروسکوپ نوری استفاده شد (۱۷و۱۶).

تست MTT (Microculture Tetrazolium Test): ارزیابی اثرات سایتوتوکسیک عصاره اتانولی خارشتر روی رده سلولی مورد مطالعه با روش رنگ سنجی رنگ فورمازان با احیا پودر زرد رنگ MTT (دی متیل تیازول ۲ و ۵ دی فنیل تترازولیوم برمید) در مقایسه با گروه کنترل انجام شد. اساس آزمایش MTT بر پایه قدرت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندریایی برای تبدیل نمک زرد محلول در آب MTT به کریستال‌های فورمازان بنفش رنگ غیر محلول در آب است که با افزودن DMSO به عنوان حلال دترجنت، حل و رنگ حاصل توسط روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری می‌شود (۱۹و۱۸).

روش انجام سمیت سلولی MTT: پس از انکوباسیون سلول‌های سرطانی دهانه رحم (Hela) با غلظت‌های (۰/۱، ۱۰، ۵۰ ،۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) از عصاره اتانولی گیاه خارشتر در دوره زمانی ۴۸ ساعت مورد سنجش MTT قرار گرفتند. بدین منظور مقداری از پودر MTT توسط محلول PBS رقیق شد و سپس با فیلتر استریل شد،۵۰ میکرولیتر از آن به پلیت‌ها اضافه گردید و در انکوباتور CO_2 دار قرار داده شدند. پس از گذشت ۴ ساعت، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده، محیط حاوی MTT خارج گردیده و به هر خانه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر DMSO اضافه شد. بعد از حدود ۱۰ دقیقه توسط دستگاه Elisa Reader در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد و OD (جذب نوری) به دست آمد (۲۱و۲۰و۱۸).

مشخصات و احیاء باکتری: سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) و سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) به صورت لیوفریزه از شرکت بهار افشان تهیه شد. به منظور احیای باکتری، سوسپانسیون باکتری به محیط کشت غنی BHI (Brain Heart Infusion Broth) تلقیح شد و به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک لوپ از استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) در محیط بلاد آگار و یک لوپ از سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) مک کانکی آگار به صورت چهار منطقه‌ای کشت داده شد. سپس به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد.

تست‌های تشخیصی: جهت تایید باکتری‌ها از رنگ آمیزی گرم و تست‌های افتراقی کاتالاز، کواگولاز و مانیتول سالت آگار برای استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) و تست‌های بیوشیمیایی کاتالاز، اکسیداز، سیمون سیترات، تست اوره از و TSI (Triple Suger Iron)، MRVP (Methyl Red- Vagoes Proskauer)، SIM (Sulfide, Indole, Motility) استفاده شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری (MIC): برای تعیین حداقل غلظت مهاری عصاره اتانولی خارشتر، ابتدا ۱۰۰ لاندا از محیط مولر هینتون براث به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای اضافه شد. سپس غلظت‌های متوالی رقیق شده عصاره اتانولی خارشتر به صورت سریال دایلوشن به محیط مولر هینتون براث اضافه گردید. سپس مقدار $۱/۵ \times ۱۰^{۵}$ cfu/ml ایزوله‌های سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) به طور جداگانه در محیط تلقیح شد و بعد از ۲۴-۱۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد باکتری در محیط بررسی و ثبت گردید و کمترین غلظتی که در آن هیچ گونه رشد دیده نشود به عنوان MIC در نظر گرفته می‌شود. لازم به ذکر است که برای انجام روش MIC از غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۴۰۰۰، ۸۰۰۰ و ۱۶۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر عصاره اتانولی خارشتر استفاده شد. MIC آنتی بیوتیک ونکومایسین در غلظت‌های ۱، ۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر به عنوان کنترل برای سویه‌های باکتریایی مورد نظر تعیین شد (۲۲).

حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC): بعد از به دست آوردن حداقل غلظت مهاری عصاره خارشتر بر سویه‌ها، برای تعیین حداقل غلظت کشندگی عصاره اتانولی خارشتر، از غلظت‌های MIC و ۱/۲ MIC و ۱/۴ MIC و ۲ MIC و ۴ بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به وسیله سوآپ در

شرایط استریل کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴–۱۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. عدم رشد باکتری‌ها نشان دهنده حداقل غلظت کشندگی می‌باشد (۲۲).

برای آنالیز آماری از نرم‌افزار Prism ver 8 استفاده شد و برای تست آماری از روش آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه داخل گروه‌ها از Tukey-post test استفاده گردید و $p<۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج حاصل از تست MTT:

اثر سمیت سلولی عصاره اتانولی گیاه خارشتر بر رده سلولی سرطان دهانه رحم (Hela): سلول‌های Hela در مواجهه با سیس پلاتین در غلظت IC50 باعث کاهش رشد سلول‌ها تا ۵۰٪ شده است. همچنین مواجه سلول‌ها با عصاره اتانولی خارشتر در غلظت‌های مختلف، به صورت وابسته به دوز باعث کاهش رشد سلول‌های دهانه رحم شده است. بطوریکه رشد سلول‌ها از ۹۶٪ در کمترین غلظت به ۲۳٪ در بالاترین غلظت عصاره خارشتر رسیده است. در مقایسه آماری با گروه کنترل مثبت مشخص گردید که غلظت ۰/۱ و ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر ($p<۰/۰۰۱$)، غلظت ۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر ($p<۰/۰۵$) و غلظت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر ($p<۰/۰۱$) دارای اختلاف معنی‌داری بودند (جدول ۱).

جدول ۱. میانگین نتایج تست MTT گروه‌های مختلف درمانی در رده سلولی HeLa

گروه‌های درمانی	HeLa Mean±SD
Control	۱۰۰/۶±۰/۱۴
Cisplatin	۴۸/۶۰±۳/۹۱
Alhagi ۰/۱	۹۶/۴۰±۲/۰۷
Alhagi ۱۰	۸۷/۰۰±۱/۸۷
Alhagi ۵۰	۶۳/۴۰±۲/۴۸
Alhagi ۱۰۰	۴۶/۴۰±۲/۰۵
Alhagi ۵۰۰	۳۹/۰۰±۳/۶۷
Alhagi ۱۰۰۰	۲۳/۴۰±۲/۴۰

نتایج MIC و MBC عصاره اتانولی خارشتر:

تست تشخیصی: استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) کاتالاز، کواگولاز مثبت و رشد در مانیتول سالت آگار مشاهده شد. در سودوموناس آئروژینوزا تست‌های کاتالاز و اکسیداز و سیترات و متیل رد (Methyl Red) مثبت، اندول و VP منفی، همچنین در محیط TSI به صورت ALK/ALK و H2S منفی مشاهده شد.

حداقل غلظت مهارکنندگی باکتری (MIC): حداقل غلظت مهاری رشد (MIC) عصاره خارشتر در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) و سودوموناس آئروژینوزا به ترتیب ۴۰۰۰ و ۱۶۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر و حداقل غلظت مهاری رشد (MIC) آنتی بیوتیک ونکومایسین در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) و سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: 27853) به ترتیب ۲ و ۲۵۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر گزارش شد.

حداقل غلظت کشندگی باکتری (MBC): حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره خارشتر در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) در ۴ برابر MIC (۱۶۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) و در سودوموناس آئروژینوزا توانایی کشندگی باکتری را نداشته است.

حداقل غلظت کشندگی (MBC) آنتی بیوتیک ونکومایسین برای سویه سودوموناس آئروژینوزا (ATCC: 27853) توانایی کشندگی باکتری نداشت اما در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) در غلظت ۲ و ۴ برابر MIC (۴ و ۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر) کاهش تعداد کلنی باکتری مشاهده شد.

بحث و نتیجه گیری

نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که ترکیبات شیمیایی موجود در عصاره اتانولی خارشتر به دلیل وجود فنول و فلاونوئید دارای خاصیت ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی است. بر اساس مطالعات انجام شده در این تحقیق از نظر سمیت سلولی (MTT) بر رده HeLa بیشترین اثر در دوز بالای عصاره (۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) منجربه کاهش سلول‌های سرطانی شد و از نظر بررسی خاصیت آنتی باکتریایی در مطالعه ما بیشترین اثربخشی عصاره اتانولی علیه باکتری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) با غلظت ۴ برابر MIC (۱۶۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) گزارش شد.

سرطان دهانه رحم (Crvical cancer) رتبه چهارم را در بین سرطان‌ها دارا می‌باشد (۲۳). از سوی دیگر، رده‌های سلولی سرطانی به دلیل مقاومت دارویی به داروهای شیمی درمانی، مانند سیس پلاتین، دوکسوروبیسین و ملفالان درمان را شکست داده‌اند، بنابراین تحقیقات سرطان بر روی ترکیبات طبیعی مانند عصاره گیاهان برای توسعه عوامل سمیت سلولی مؤثر و انتخابی برای درمان بسیاری از سرطان‌ها از جمله سرطان دهانه رحم متمرکز شده است (۲۴) و نتایج تحقیق حاضر نشان داد که عصاره اتانولی گیاه خارشتر سبب مهار رشد سلول‌های سرطانی دهانه رحم شده است. به طور کلی، یافته‌های مطالعه‌ای نشان داد که ترکیب عصاره خارشتر و دوستاکسل دارای اثرات ضد توموری هم‌افزایی بر روی سلول‌های 4T1 است که ممکن است یک انتخاب ارزشمند برای درمان‌های مکمل و جایگزین باشد و همچنین در ادامه نتایج مشخص گردید که عصاره خارشتر به تنهایی نیز فعالیت ضد توموری قابل قبولی داشت (۲۵).

عصاره خارشتر به عنوان یک گیاه بسیار با ارزش دارای متابولیت‌های ثانویه و فلاونوئیدهای متعددی است و خواص دارویی زیادی از خود نشان داده است. در طول سال‌های گذشته، مطالعات تجربی متعددی نشان داده‌اند که عصاره‌های دی اتیل اتر و پترولیوم اتر A.m دارای مقادیر IC50 114.7 میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۱۰۵/۷ اینچ میکروگرم بر میلی‌لیتر در برابر رده سلولی سرطان پستان انسانی MCF7 هستند. IC50s > ۱۰۰ µg/ml عصاره در برابر رده‌های سلولی A549، MCF7، HepG2، HT-29 و MDBK در مطالعات نشان داده شده است (۲۷و۲۶). نتایج حاصل از سمیت سلولی (MTT) نشان دهنده این است که عصاره اتانولی خارشتر در دوزهای بالا منجر به کاهش تعداد سلول‌های سرطانی شده است.

نتایج به دست آمده از پژوهشی نشان می‌دهد که عصاره برخی از گیاهان باعث کاهش رشد باکتری‌های گرم مثبت و منفی شده است (۱۷). نتایج این پژوهش هم همسو با تحقیق حاضر می‌باشد. همچنین از نظر بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره اتانولی نتایج حاصل از حداقل غلظت مهاری رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نشان دادند که سویه سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) به عصاره اتانولی خارشتر مقاوم است در صورتی که سویه استافیلوکوک استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) استافیلوکوکوس اورئوس به عصاره حساسیت نشان داده است. طبق MIC به دست آمده میزان حداقل غلظت مهاری استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) و سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) به ترتیب ۴۰۰۰ و ۱۶۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر گزارش شده است و طبق نتایج MBC عصاره خارشتر در سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) در مقایسه با گروه کنترل مثبت ۴ برابر MIC (۱۶۰۰۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر) کشندگی مشاهده شد اما عصاره در سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) توانایی کشندگی باکتری را نداشته است. در این مطالعه از آنتی بیوتیک ونکومایسین به عنوان کنترل مثبت در مقایسه با خاصیت عصاره اتانولی استفاده شده که در اینجا هم سویه سودوموناس آئورژینوزا (ATCC: 27853) از خود مقاومت نشان داده است و این آنتی بیوتیک توانایی کشندگی این سویه را نداشته در صورتی که سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC: 25923) غلظت ۲ و ۴ برابر MIC (۴ و ۸ میکروگرم/ میلی‌لیتر) کاهش تعداد کلنی باکتری مشاهده شد.

با توجه به اثر سمیت سلولی و آنتی باکتریالی قابل ملاحظه عصاره اتانولی گیاه خارشتر بر روی رده سلولی سرطانی دهانه رحم و سویه‌های باکتری‌های استافیلوکوکوی اورئوس و سودوموناس آئورژینوزا که در ایجاد انواع عفونت‌های مخرب و بیمارستانی نقش دارند، این عصاره می‌تواند به عنوان فرآورده درمانی گیاهی طبیعی و مکمل مد نظر قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از شورای پژوهشی موسسه آموزش عالی سنای مازندران- ساری به جهت حمایت مالی از مطالعه قدردانی می‌گردد.

References

1.Vu M, Yu J, Awolude OA, Chuang L. Cervical cancer worldwide. Curr Probl Cancer. 2018;42(5):457-65.
2.Zhang JX, Wei‐Tan H, Hu CY, Wang WQ, Chu GH, Wei LH, et al. Anticancer activity of 23,24-dihydrocucurbitacin B against the HeLa human cervical cell line is due to apoptosis and G2/M cell cycle arrest. Exp Ther Med. 2018;15(3):2575-82.
3.Rafieian-Kopaie M, Nasri H. On the Occasion of World Cancer Day 2015; the Possibility of Cancer Prevention or Treatment with Antioxidants: The Ongoing Cancer Prevention Researches. Int J Prev Med. 2015;6:108.
4.Magalhães AP, Jorge P, Pereira MO. Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus communication in biofilm infections: insights through network and database construction. Crit Rev Microbiol. 2019;45(5-6):712-28.
5.Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: an "old-age" disease with an "age-old" solution. Cancer Lett. 2008;267(1):133-64.
6.Moore MR. Opposed to the being of Henrietta: bioslavery, pop culture and the third life of HeLa cells. Med Humanit. 2017;43(1):55-61.
7.Shakiba Y, Rezatofighi SE, Seyyed Nejad SM, Roayaei Ardakani M. Antiviral Activity of Alhagi maurorum Medik's Methanolic Extract on Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) in Cell Cultures. Jundishapur J Nat Pharm Prod. 2016;11(3): e30641.
8.Marashdah MS, Farraj AI. Pharmacological activity of 2% aqueous acetic acid extract of Alhagi maurorum roots. J Saudi Chem Soc. 2010;14(3):247-50.
9.Gargoum HM, Muftah SS, Al Shalmani S, Mohammed HA, Alzoki AN, Debani AH, et al. Phytochemical screening and investigation of the effect of Alhagi maurorum (Camel thorn) on carbon tetrachloride, acetaminophen and adriamycin induced toxicity in experimental animals. J Sci Innov Res. 2013;2(6):1023-33.
10.Atta AH, Mouneir SM. Antidiarrhoeal activity of some Egyptian medicinal plant extracts. J Ethnopharmacol. 2004;92(2-3):303-9.
11.Ahmad N, Shinwari ZK, Hussain J, Perveen R. Phytochemicals, antibacterial and antioxidative investigations of Alhagi maurorum medik. Pak J Bot. 2015;47(1):121-4.
12.Laghari AH, Memon AA, Memon S, Nelofar A, Khan KM, Yasmin A. Determination of free phenolic acids and antioxidant capacity of methanolic extracts obtained from leaves and flowers of camel thorn (Alhagi maurorum). Nat Prod Res. 2012;26(2):173-6.
13.Shokrzadeh M, Motafeghi F, Shokrzadeh S, Pourasadollah S. Evaluation of the Role of Hydroalcoholic Extract of Ginger (Zingiber Officinale L.) and Vitamin C on Cell Viability of Normal Gingival and Skin Cells in the Presence of Drabkin's Solution. Stud Med Sci. 2022;33(3):220-33. [In Persian]
14.Motafeghi F, Habibi E, Firozjaei M, Eghbali M, Mortazavi P, Salmanmahiny A, et al. The Cytotoxic Effect of the Tarragon (Artemisia dracunculus L.) Hydroalcoholic Extract on the HT-29, MKN45, and MCF-7 Cell Lines. Pharm Biomed Res. 2023;9(1):27-36.
15.Motafeghi F, Mortazavi P, Salman Mahiny AH, Abtahi MM, Shokrzadeh M. The role of ginger's extract and N-acetylcysteine against docetaxel-induced oxidative stress and genetic disorder. Drug Chem Toxicol. 2023;46(4):617-24.

16.Shokrzadeh M, Mortazavi P, Moghadami A, Khayambashi B, Motafeghi F. Synergistic Antiproliferative and Anticancer Activity of Carotenoid Lutein or Coenzyme Q10 in Combination with Doxorubicin on the MCF7 Cell Line. Appl In Vitro Toxicol. 2021;7(4):167-74.
17.Motafeghi F, Khayambashi B, Mortazavi P, Eghbali M, Salmanmahiny A, Shahsavari R, et al. Synergistic Effect of Selenium/Zinc with Sulfasalazine on the Human Colorectal Cancer Cell Line (HT-29). Appl In Vitro Toxicol. 2023;9(1):3-12.
18.Motafeghi F, Shahsavari R, Mortazavi P, Shokrzadeh M. Anticancer effect of paroxetine and amitriptyline on HT29 and A549 cell lines. Toxicol In Vitro. 2023;87:105532.
19.Motafeghi F, Gerami M, Mortazavi P, Khayambashi B, Ghassemi-Barghi N, Shokrzadeh M. Green synthesis of silver nanoparticles, graphene, and silver-graphene nanocomposite using Melissa officinalis ethanolic extract: Anticancer effect on MCF-7 cell line. Iran J Basic Med Sci. 2023;26(1):57-68.
20.Motafeghi F, Mortazavi P, Ghassemi-Barghi N, Zahedi M, Shokrzadeh M. Dexamethasone as an anti-cancer or Hepatotoxic. Toxicol Mech Methods. 2023;33(2):161-71.
21.Motafeghi F, Mortazavi P, Mahdavi M, Shokrzadeh M. Cellular effects of epsilon toxin on the cell viability and oxidative stress of normal and lung cancer cells. Microb Pathog. 2022;169:105649.
22.Mahmoudi H, Arabestani MR, Molavi M, shirzadi karamolah K, Zare Fahim N. The study effects antimicrobial of Foeniculum vulgare mill and Achilles mille folium plant on bacterial pathogens causing urinary tract infections and nosocomial infection. Int J Pharmacogn Phytochem Res. 2016;8(9):1549-54.
23.Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. Gut. 2023;72(2):338-44.
24.Ke J, Gu C, Zhang H, Liu Y, Zhang W, Rao H, et al. Nucleolin promotes cisplatin resistance in cervical cancer by the YB1-MDR1 pathway. J Oncol. 2021;2021:9992218.
25.Bahamin N, Ahmadian S, Rafieian-Kopaei M, Mobini G, Shafiezadeh M, Soltani A. A Comparative Study on Anticancer Effects of the Alhagi maurorum and Amygdalus haussknechtii Extracts Alone and in Combination with Docetaxel on 4T1 Breast Cancer Cells. Evid Based Complement Alternat Med. 2021;2021:5517944.
26.Loizzo MR, Rashed K, Said A, Bonesi M, Menichini F, Tundis R. Antiproliferative and antioxidant properties of Alhagi maurorum Boiss (Leguminosae) aerial parts. Ind Crops Prod. 2014;53:289-95.
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.