

The in vitro survey of cytotoxic activities extracts of garlic and green tea

Sharifzadeh A^{1*}, Aali F², Heidari M², Kowsari N³

1- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

2- Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

4- Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, I.R. Iran.

Received: 2019/05/17 | Accepted: 2020/07/20

Abstract:

Background: Garlic (*Allium sativum*) belongs to the Liliaceae family and green tea (*Camellia sinensis*) belongs to the Theaceae family are widely used in folk medicine. Antibacterial, anticancer and antioxidant activity of these plants have been previously reported. This study aimed to investigate the cytotoxic activity of the extracts of garlic and green tea on breast cancer cell line (MCF-7) and HDF.

Materials and Methods: Cytotoxicity of different concentrations (250,500,750 µg/ml) of garlic and green tea ethanolic extracts on MCF-7 and HDF cell lines were examined. The cell lines were grown in RPMI supplemented with 10% FBS, 1% penicillin and streptomycin. The cells were allowed to incubate at 37°C in an atmosphere that contained 5% CO₂ and 95% humidity. The standard MTT assay was performed to estimate cell viability after treatment garlic and green tea extracts.

Results: The results of the MTT assay showed that garlic extract had time and concentration dependent anticancer activities on the MCF-7 cell line ($P<0.01$). But, any effect of green tea extract on MCF-7 and HDF cell lines showed.

Conclusion: Results of this survey suggested that garlic extract has a good potential to control of cancer cells.

Keywords: Garlic, Green tea, Breast cancer, Cytotoxicity

*Corresponding Author:

Email: alisharifzadeh10@gmail.com

Tel: 0098 383 336 1045

Fax: 0098 383 336 1045

Conflict of Interests: **No**

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2020; Vol. 24, No 3, Pages 342-349

Please cite this article as: Sharifzadeh A, Aali F, Heidari M, Kowsari N. The in vitro survey of cytotoxic activities extracts of garlic and green tea. *Feyz* 2020; 24(3): 342-9.

بررسی فعالیت سمّیت سلولی عصاره‌های سیر و چای سبز در شرایط آزمایشگاهی

علی شریف‌زاده^{*۱}، فرانک عالی^۲، میلاد حیدری^۳، ندا کوثری^۳

خلاصه:

سابقه و هدف: سیر (*Allium sativum*) از خانواده Liliaceae و چای سبز (*Camellia sinensis*) از خانواده Theaceae در طب سنتی دارای کاربردهای زیادی هستند و اثرات ضدباکتریایی، ضدسرطانی و آنتی‌اکسیدانی این گیاهان غالباً گزارش شده است. در مطالعه حاضر فعالیت سمّیت سلولی عصاره‌های سیر و چای سبز بر رده سلولی سرطان سینه انسانی (MCF7) و سلول فیروبللاست پوست انسان (HDF) مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این بررسی توصیفی، فعالیت سمّیت سلولی غلظت‌های مختلف عصاره‌های الکلی سیر و چای سبز (۷۵۰، ۵۰۰ و ۲۵۰ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) بر رده‌های سلولی MCF7 و HDF بررسی گردید. رده‌های سلولی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی و ۱ درصد پنی‌سیلین و استرپتومایسین کشت داده شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد دی‌اکسید کربن و ۹۵ درصد رطوبت قرار گرفت. از روش استاندارد MTT برای برآورد توانایی زیستی سلول‌ها در مجاورت عصاره‌های سیر و چای سبز بهره گرفته شد.

نتایج: براساس نتایج MTT، عصاره سیر برحسب غلظت و زمان دارای فعالیت ضدسرطانی و بیش از ۵۰ درصد کاهش تراکم سلولی علیه رده سلولی MCF7 می‌باشد در حالی‌که روی سلول سالم HDF اثر خاصی نشان نداد ($P < 0.01$). همچنین عصاره چای سبز روی هیچ‌کدام از رده‌های سلولی سرطانی و یا سالم اثر سمّیت نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که عصاره سیر از پتانسیل مناسبی برای کنترل سلول‌های سرطانی برخوردار است.

واژگان کلیدی: سیر، چای سبز، سرطان سینه، سمّیت سلولی

دو ماه‌نامه علمی - پژوهشی فیض، دوره بیست و چهارم، شماره ۳، مرداد - شهریور ۱۳۹۹، صفحات ۳۴۹-۳۴۲

مقدمه

به‌طوری‌که این سرطان مهم‌ترین عامل مرگ‌ومیر در زنان می‌باشد و فراوانی آن در دو دهه گذشته روند افزایشی داشته است [۴،۳]. در بین روش‌های شیمی‌درمانی، پرتودرمانی، درمان هدفمند، درمان ایمونولوژیک و جراحی، شیمی‌درمانی پرکاربردترین روش محسوب می‌گردد [۲]. از بزرگ‌ترین محدودیت‌های روش شیمی‌درمانی در درمان سرطان سینه، مقاومت سلول‌های سرطانی نسبت به دارو و عوارض جانبی آن می‌باشد [۵]. اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی به جهت عوارض جانبی کمتر و خاستگاه طبیعی آن‌ها می‌توانند دارای ظرفیت بالایی برای ساخت ترکیبات دارویی باشند. روش تهیه، نوع حلال، نوع ترکیبات، شرایط نگهداری، قدرت اثر و خواص اسانس و عصاره با یکدیگر متفاوت است. اسانس و عصاره دارای تفاوت‌هایی با یکدیگر هستند؛ به‌طوری‌که عصاره‌های آبی محلول در آب هستند، در حالی‌که حلال اسانس، غالباً متانول و اتانول می‌باشد. اسانس به نور حساس بوده و در صورت قرارگیری در معرض نور، ترکیبات فرار آن از بین می‌روند. علی‌رغم آن‌که در غالب موارد اسانس چندین برابر قوی‌تر از عصاره می‌باشد و خاصیت ضد میکروبی بیشتری دارد، ولی خاصیت ضدالتهابی و تنظیم‌کنندگی ایمنی عصاره بالاتر است [۶]. سیر (Garlic) با نام علمی (*Allium sativum* L.) گیاهی متعلق به راسته مارچوبه‌سانان

پس از بیماری‌های قلبی - عروقی و تصادفات، سرطان سومین عامل مرگ‌ومیر در ایران می‌باشد [۱]. در حالت طبیعی به موازات افزایش تکثیر سلولی، افزایش مرگ سلولی نیز رخ خواهد داد، به‌طوری‌که این دو با یکدیگر در تعادل قرار می‌گیرند. در سرطان، سلول‌ها از این کنترل دقیق خارج می‌شوند و توده‌هایی به نام تومور تشکیل می‌گردد. درواقع سرطان یا نئوپلاسم، از یک سلول طبیعی که مکانیسم تکثیر آن دستخوش تغییر شده است، به‌وجود می‌آید [۲]. هم‌اکنون سرطان سینه شایع‌ترین نوع سرطان در بین زنان در ایران است.

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 دکتری، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

شهرکرد، گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

دورنویس: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۴۵

تلفن: ۰۳۸۳۳۳۶۱۰۴۵

پست الکترونیک: alisharifzadeh10@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۹/۴/۳۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲۷

در این تحقیق خاصیت ضدسرطانی و آثار سایتوتوکسیک عصاره سیر و چای سبز بومی با یکدیگر مقایسه گردید تا بتوان به‌عنوان یک درمان حمایتی در کنار سایر داروها از آن بهره گرفت و یا با استخراج مواد مؤثره آن و به‌کارگیری در سنتز داروهای جدید گامی هرچند کوتاه در درمان این بیماری برداشت.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی عصاره‌های گیاهی

در این بررسی توصیفی، نمونه‌های گیاهان دارویی سیر و چای سبز از مزارع همدان و گیلان تهیه شد و سپس توسط کارشناس هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد مورد شناسایی قرار گرفت و نمونه هرباریومی آن به شماره‌های ۳۴۰۴ و ۳۴۰۵ به‌ترتیب در مورد سیر و چای سبز در هرباریوم مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ثبت و نگهداری گردید. پوست نمونه‌های سیر گرفته، سپس با آب مقطر شسته و به قطعات کوچک‌تر خرد شد. بعد نمونه‌های سیر و چای سبز به‌صورت جداگانه توسط آسیاب خانگی پودر گردید. ۵۰ گرم از هر یک از پودرها را به‌صورت مجزا در بالن ریخته، به آن ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درجه افزودیم تا ۲۴ ساعت در دستگاه شیکر با دور ۱۶۰ دور در دقیقه تکان بخورد. عصاره حاصل از این مرحله صاف و مجدداً روی مقادیر باقی‌مانده اتانول ۷۰ درجه اضافه شد و مرحله قبل تکرار گردید. عصاره‌های جمع‌آوری‌شده در این دو مرحله در دستگاه تقطیر در خلأ در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و با شرایط ۷۰ دور در دقیقه تا زمانی که حجم باقی‌مانده به یک‌پنجم حجم اولیه برسد، تقطیر شد. پس از آن محتویات مخزن به داخل پتری دیش منتقل شد و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون به‌طور کامل در عرض چند روز خشک گردید. از عصاره به‌دست آمده با فسفات بافر سالین رقت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و با استفاده از فیلترهای ۰/۲۲ میکرونی استریل گردید. در نهایت عصاره‌های رقیق‌شده در میکروتیوب‌های استریل تا زمان مصرف، در فریزر نگهداری شد [۲۵].

کشت رده‌های سلولی MCF7 و HDF

رده‌های سلولی MCF7 و HDF (Human Dermal Fibroblasts) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شدند و در محیط RPMI-1640 به شماره کاتالوگ ۰۲۵-۲۱۸۷۰ از شرکت سازنده Gibco قرار گرفتند و پس از افزودن ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، ۱ درصد آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین و ۲ درصد گلوتامین کشت داده شدند. فلاسک‌های کشت سلول در این مرحله در انکوباتور دارای ۵ درصد دی‌اکسید

(Asparagales) و از خانواده پیاز (Alliaceae) می‌باشد. جنس معروف این خانواده سیر می‌باشد که بیش از ۳۰۰ گونه دارد. سیر گیاهی علفی و دارای ساقه‌ای به ارتفاع ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر و حتی بیشتر است. بلب آن، که قسمت زیرزمینی و متورم گیاه را تشکیل می‌دهد، مرکب از ۵ تا ۱۰ قطعه متورم و محصور در غشاهای نازک و ظریف است و دارای رنگ خاکستری متمایل به سفید می‌باشد [۷]. چای سبز با نام علمی (*Camellia sinensis*) گیاهی یک‌پایه، دولپه‌ای، همیشه سبز از شاخه نهان‌دانگان، رده دولپه‌ای‌ها، راسته گوتی فرالز، خانواده Theaceae و جنس *Camellia* است. چای یک منبع طبیعی از کافئین، تنوفیلین، تئین و آنتی‌اکسیدان‌هاست، اما تقریباً بدون چربی، کربوهیدرات‌ها و یا پروتئین که دارای طعمی مطلوب است کمی تلخ و گس می‌باشد [۸]. برخی از گیاهان باعث القای آپوپتوز و مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌گردند [۹]. سیر و چای سبز از جمله گیاهان مؤثر در تقویت سیستم ایمنی می‌باشند. اثرات مفید سیر و پیاز در برخی از انواع سرطان‌ها تأیید شده است [۱۱، ۱۰]. کاهش زمینه ابتلا به سرطان معده و سرطان روده بزرگ نیز توسط سیر قبلاً اثبات شده است. تنظیم پاسخ ایمنی با اثر میوژنی روی لنفوسیت‌ها [۱۳، ۱۲] و سلول‌های کشنده ذاتی [۱۵، ۱۴] و افزایش پاسخ حساسیت تأخیری نیز در مورد عصاره سیر نشان داده شده است [۱۶]. آنتی‌اکسیدان‌ها و ارتباط آن‌ها با ترکیبات فلاونوئیدی، مهم‌ترین علت اثر بازدارندگی سیر محسوب می‌گردد. اثر ضدسرطانی فلاونوئیدها در رده‌های سلولی سرطان پروستات نیز گزارش شده است [۱۷]. عصاره چای سبز نیز آنزیم آروماتوز را که در گسترش سرطان نقش کلیدی ایفا می‌کند، مهار می‌نماید [۱۸]. پلی‌فنل‌های چای سبز نیز علاوه بر مهار رشد سلول‌های سرطانی پروستات از متاستاز آن به سایر بافت‌ها جلوگیری می‌کند [۱۹]. همچنین چای سبز پیشرفت سرطان پروستات را از طریق کاهش سطح پلی‌آمین‌ها مهار می‌کنند [۲۰]. کاتچین‌ها از جمله اپی‌گالوکاتچین گالات، آنتی‌اکسیدان دیگر موجود در چای سبز با خاصیت پیشگیری از سرطان است [۲۱]. اثرات ضدتوموری این آنتی‌اکسیدان در سرطان‌های مری، پوست، ریه، روده بزرگ و پانکراس به اثبات رسیده است [۲۳، ۲۲]. عصاره چای سبز بر سلول سرطان پستان رده SKBR3 نیز به‌صورت وابسته به دوز و زمان، دارای اثر مهاری می‌باشد و باعث افزایش وقوع آپوپتوز می‌گردد [۲۴]. با توجه به اهمیت سرطان سینه در کشور و افزایش فراوانی این بیماری در دو دهه گذشته، تاکنون در مورد اثرات عصاره اتانولی سیر و چای سبز روی رده سلول سرطانی سینه (Michigan Cancer Foundation-7: MCF7)، تحقیق صورت نگرفته است. بنابراین

نسخه ۲۲ نرم‌افزار آماری SPSS با استفاده از آزمون t مستقل ($P < 0.05$) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج

تأثیر سمیت سلولی عصاره‌های سیر و چای سبز بر رده سلولی سرطانی MCF7

نتایج مربوط به سمیت سلولی عصاره حاصل از سیر بر سلول سرطانی MCF7 محاسبه گردید. نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که تعداد سلول‌های رده سلولی سرطان سینه انسان تحت تیمار با غلظت‌های مختلف عصاره سیر در هر سه زمان انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در هر سه گروه (براساس غلظت) نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. آنالیز آماری با کاربرد آزمون t، نشان داد که هرچند تراکم سلولی در سلول‌های تحت تیمار با غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به گروه کنترل، پایین‌تر (کمتر از ۵۰ درصد) بود، اما در هیچ‌کدام از زمان‌های انکوباسیون این اختلاف تراکم معنی‌دار نبود. نتایج بررسی آماری در مورد غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نشان داد که کاهش تراکم در سلول‌های تحت تیمار نسبت به گروه شاهد، فقط در زمان ۴۸ ساعت با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار بود ($P < 0.01$) و در زمان‌های دیگر مربوط به این غلظت، معنی‌دار نبود. آنالیز آماری در خصوص غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر مؤید تأثیر معنی‌دار ($P < 0.05$) عصاره سیر در تمام زمان‌های انکوباسیون بر روی سلول‌های سرطانی نسبت به گروه شاهد بود. آنالیز آماری در خصوص تأثیر عصاره چای سبز بر تراکم سلولی دو گروه سلول‌های MCF7 تیمار و شاهد، مؤید این است که هر چند تراکم سلولی در غلظت ۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در گروه تیمار نسبت به گروه شاهد پایین‌تر بود، اما این میزان اختلاف در سطح معنی‌داری قرار نگرفت. در مورد غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در دو گروه تیمار و شاهد، میانگین تراکم سلولی تقریباً نزدیک به هم بود و اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. عصاره سیر برخلاف عصاره چای سبز سمیت سلولی وابسته به دوز بر روی سلول‌های سرطانی سینه دارد، به‌طوری‌که با افزایش غلظت عصاره این فعالیت بیشتر می‌شود.

تأثیر سمیت سلولی عصاره‌های سیر و چای سبز بر رده سلولی طبیعی HDF

نتایج مربوط به سمیت سلولی عصاره حاصل از سیر بر سلول‌های HDF بررسی گردید. نتایج این آزمایش پس از آنالیز آماری با روش آزمون t مستقل، نشان داد که تفاوت میانگین تراکم سلولی بین گروه‌های کنترل و عصاره سیر در هیچ‌کدام از

کربن و ۹۵ درصد رطوبت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و هر سه روز یک بار محیط کشت تعویض گردید.

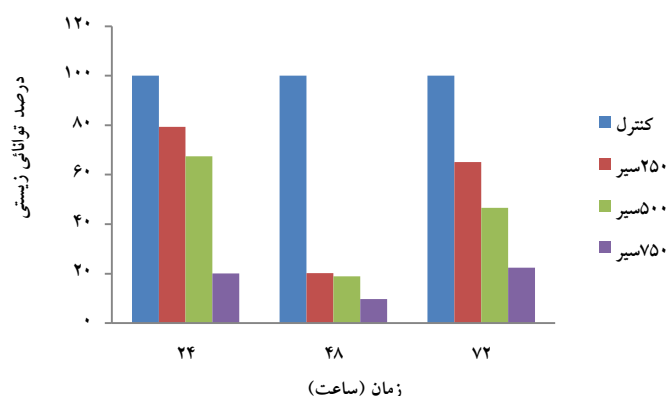
ارزیابی سمیت سلولی با روش MTT

در این مرحله، از فلاسک‌هایی با تراکم سلولی ۸۰ درصد استفاده گردید (فلاسک‌هایی که تا ۸۰ درصد کف آن از سلول پر شده باشد). ابتدا محیط کشت از سطح سلول‌ها برداشته شد و با افزودن ۱ میلی‌لیتر تریپسین به مدت ۳ دقیقه و سپس اضافه کردن همین حجم محیط به منظور خنثی کردن اثر تریپسین، همه سلول‌ها از کف فلاسک جدا گردیدند. این سوسپانسیون سلولی در ۱۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع بالای رسوب دور ریخته شد و به رسوب ۱ میلی‌لیتر محیط کشت اضافه گردید. با برداشتن ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی و افزودن همین مقدار تریپان‌بلو در سطح لام نئوبار، تعداد سلول‌های زنده شمارش گردید. تعداد ۱۰/۰۰۰ سلول از این سوسپانسیون سلولی پس از محاسبه به هر چاهک از پلیت‌های ۹۶ چاهکی افزوده شده و ۱۸۰ میکرولیتر محیط کشت به آن اضافه گردید. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های محلول در آب به چاهک‌ها اضافه گردید. در این تحقیق، براساس غلظت‌های مرسوم در مورد سایر گیاهان دارویی، عصاره‌های اتانولی سیر و چای سبز با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به سلول‌های MCF7 و HDF اضافه شد. گروه دیگری از سلول‌ها به‌عنوان شاهد، بدون افزودن عصاره‌های گیاهی و فقط با افزودن آب به‌جای عصاره مورد آزمایش قرار گرفتند و هر آزمایش در چهار تکرار انجام شد. پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، محیط روی سلول‌ها با محیط جدید تعویض گردید. سپس مقدار ۲۰ میکرولیتر محلول MTT به هر چاهک اضافه شد و ۴ ساعت در تاریکی در انکوباتور CO₂ دار، گرمخانه‌گذاری گردید. در این مدت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز میتوکندری سلول‌های زنده محلول زرد رنگ MTT را به کریستال‌های بنفش‌رنگ فورمازان که در آب غیرمحلول می‌باشد، تبدیل می‌کند. در مرحله بعد محیط خالی و به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر DMSO (Dimethylsulfoxide) اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه تکان داده شد تا کریستال‌های فورمازان حل گردد. در مرحله آخر با طول موج ۴۹۲ و سپس ۶۳۰ نانومتر در دستگاه الیزا ریدر موجود در مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی مطابق روش کار استاندارد، جذب نوری قرائت گردید. در نهایت درصد زنده بودن سلول‌ها پس از تقسیم جذب نوری (OD) سلول‌های تیمار نسبت به سلول‌های شاهد ضرب در عدد ۱۰۰، محاسبه شد. نتایج حاصل با استفاده از

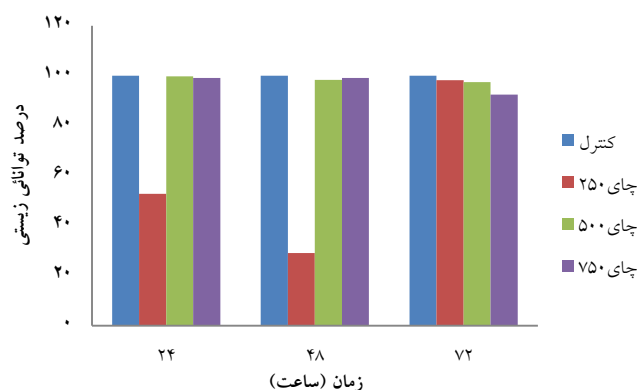
محاسبه شد (۴۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر). نتایج حاصل از تیمار سلول‌ها با غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت محاسبه شد و درصد توانایی زیستی عصاره‌ها تعیین و در نمودارهای شماره ۱ و ۲ ترسیم گردید. همان‌طور که در نمودار شماره ۱ ملاحظه می‌شود، درصد توانایی زیستی عصاره سبز به متغیرهای غلظت و زمان وابسته می‌باشد، به شکلی که با افزایش غلظت و زمان انکوباسیون، توانایی زنده‌مانی سلولی به شکل قابل توجهی کاهش می‌یابد.

غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و همچنین هیچ‌کدام از زمان‌های انکوباسیون ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت معنی‌دار نبود. نتایج تأثیر میزان سمیت عصاره چای سبز بر سلول‌های HDF، با استفاده از آزمون آماری t مستقل ارزیابی گردید. میانگین تراکم سلولی در عصاره چای سبز در غلظت‌ها و زمان‌های مختلف انکوباسیون، هرچند در گروه تیمار نسبت به کنترل پایین‌تر بوده، اما این تفاوت‌ها معنی‌دار نبود.

بررسی درصد توانایی زنده‌مانی در نهایت مقدار IC_{50} نمونه‌ها که بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد مهار رشد سلول‌های سرطانی می‌شود،



نمودار شماره ۱- محور عمودی، درصد توانایی زنده‌مانی غلظت‌های مختلف عصاره سبز (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) و محور افقی، زمان‌های مختلف انکوباسیون (گروه کنترل آبی‌رنگ، مبین غلظت صفر عصاره و گروه‌های نارنجی غلظت ۲۵۰ گرم بر میلی‌لیتر عصاره، گروه خاکستری غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و گروه زردرنگ غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره می‌باشد). محور افقی زمان مجاورت سلول با عصاره و محور عمودی درصد توانایی زنده‌مانی را نشان می‌دهد. در آزمون t مستقل تنها در غلظت ۵۰۰ اختلاف گروه شاهد و کنترل در زمان ۴۸ ساعت با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار بود ($P < 0.01$). در غلظت ۷۵۰ نیز تفاوت گروه شاهد و کنترل در تمام زمان‌ها با احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار بود ($P < 0.05$).



نمودار شماره ۲- محور عمودی، درصد توانایی زنده‌مانی غلظت‌های مختلف عصاره چای سبز (برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر) و محور افقی، زمان‌های مختلف انکوباسیون سلول‌های سرطانی (گروه کنترل آبی‌رنگ، مبین غلظت صفر عصاره و گروه‌های نارنجی غلظت ۲۵۰ گرم بر میلی‌لیتر عصاره، گروه خاکستری غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره و گروه زردرنگ غلظت ۷۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره می‌باشد). محور افقی زمان مجاورت سلول با عصاره و محور عمودی درصد توانایی زنده‌مانی را نشان می‌دهد. در آزمون t مستقل تنها در زمان ۴۸ ساعت نیز تفاوت گروه شاهد و کنترل با احتمال ۹۵ درصد معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

بحث

کشور ما دارای سابقه طولانی در استفاده از ترکیبات طبیعی به‌ویژه گیاهان دارویی است. ارزان و در دسترس بودن، عوارض جانبی کمتر، محتویات متابولیت‌های مختلف و فعالیت‌های متنوع بیولوژیکی از جمله علت‌های استفاده روزافزون از این محصولات می‌باشد. سرطان دومین علت مرگ‌ومیر پس از بیماری‌های قلبی - عروقی در جهان است. جهش‌های متعددی باعث مقاوم شدن سلول‌ها به محرک‌های مرگ و آپوپتوز می‌گردد. به همین جهت استفاده از ترکیبات شیمیایی یا عصاره‌های القاکننده مرگ سلولی از اهداف درمانی سرطان محسوب می‌شود [۲۶]. بررسی‌های متعددی اثرات سیتوتوکسیک عصاره‌های سیر و چای سبز را در برخی از رده‌های سلولی سرطانی نشان داده است. براساس تحقیق حاضر در بررسی توانایی زنده‌مانی سلول‌های MCF-7 و HDF با استفاده از آزمون MTT کاهش چشمگیر درصد توانایی زنده‌مانی سلول‌های سرطان پستان در مورد عصاره سیر نشان داده شده است. هرچند در مورد چای سبز تحقیقی در مورد این رده سلولی سرطان پستان (MCF7) صورت نگرفته بود، ولی نتایج به‌دست‌آمده از سیر (*A. sativum*) با نتایج سایر محققان هم‌خوانی داشت و صرفاً در درصد توانایی زنده‌مانی برحسب سن گیاه (تازه یا مانده بودن سیر) و محل کشت متفاوت می‌باشد. چای سبز نیز نشان داد که می‌تواند اثرات مهاری روی سرطان پروستات داشته باشد. این اثر مهاری از طریق مهار آنزیم ۵- آلفا ردوکتاز که عامل تبدیل تستوسترون به دی‌هیدرو تستوسترون (عامل کارسینوژن پروستات) است، انجام می‌گیرد. همچنین در موش هم، سایر آنزیم‌ها و فاکتورهای رشددهنده سرطان پروستات توسط این عصاره مهار می‌گردد [۲۸،۲۷]. علی‌رغم آن‌که تحقیقات در مورد عصاره چای سبز غالباً به سرطان پروستات محدود شده، ولی اثر گیاه سیر به اشکال مختلف در برخی از سرطان‌ها مطالعه گردیده است. بین مصرف سیر و کاهش ابتلا به سرطان معده [۲۹] و مصرف سیر و کاهش خطر ابتلا به سرطان کولون [۳۰] ارتباط معنی‌داری دیده شده است. تأثیر سیر بر توقف سیکل سلولی سرطان پروستات نیز تأیید شده است [۳۲،۳۱]. همچنین اثر مهاری پیشرفت سرطان سینه در مورد عصاره متانولی سیر تخمیر شده و کاهش اثر مهاری با گذشت زمان تأیید گردیده است [۳۳]. آنتی‌اکسیدان‌های موجود در سیر با توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، پلی‌فنول‌ها و اجزای اورگانوسولفور از مهم‌ترین اجزای ترکیبات ضدتوموری سیر می‌باشند [۳۴-۳۶]. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که گونه‌های مختلف جنس *Allium* یکی از منابع غنی ترکیبات دارویی گیاهی

به‌ویژه استروئیدهای ساپونینی، فلاونوئیدها و ترکیبات سولفوری هستند که تمامی این ترکیبات از جمله متابولیت‌های ثانویه با ارزش گیاهی به شمار می‌آیند و اثرات متعددی از جمله کاهش قندخون، کاهش کلسترول، کاهش فشارخون، اثرات ضد میکروبی، ضداسپاسمی و ضدسرطانی را دارا می‌باشند [۳۸،۳۷]. از میان ترکیبات یادشده بسیاری از ساپونین‌های استخراج‌شده از گیاهان جنس آلیوم بر روی رده‌های سلولی سرطانی دارای اثرات سیتوتوکسیک بوده‌اند [۴۰،۳۹]. القای آپوپتوز توسط ساپونین‌های استخراج‌شده از منابع مختلف [۴۲،۴۱] و عملکرد ضدتوموری ساپونین‌ها به‌دلیل مهار تکثیر سلول‌های سرطانی [۴۴،۴۳]، از جمله مهم‌ترین مکانیسم‌های پیشنهادی در مورد اثرات ضدسرطانی این ترکیبات می‌باشد. البته لازم به ذکر است که دیگر اعضای خانواده مثل پیاز نیز دارای اثر درمانی بر سلول‌های سرطان کبد می‌باشند [۴۵]. از آن‌جا که تاکنون مطالعاتی در مورد خواص ضدسرطانی عصاره چای سبز و عصاره اتانولی سیر بر سلول‌های سرطانی سینه صورت نگرفته بود، در این مطالعه به بررسی اثرات ضدسرطانی عصاره چای سبز و عصاره اتانولی سیر پرداخته شد. براساس نتایج این تحقیق، فقدان اثر عصاره چای سبز و حداقل غلظتی که باعث مهار ۵۰ درصد سلول‌های سرطانی سینه توسط عصاره سیر می‌شود، تعیین گردید. اثرات سیتوتوکسیک القاشده توسط این عصاره با زمان و غلظت ارتباط متناسب دارد، به‌طوری که قابلیت زیست‌پذیری سلول‌ها با افزایش غلظت بیشتر و با افزایش زمان کاهش می‌یابد.

نتیجه‌گیری

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که عصاره اتانولی سیر می‌تواند اثرات قابل توجهی در درمان سرطان سینه داشته باشد؛ هرچند که انجام آزمایش‌های تکمیلی به‌صورت درون‌تن و برون‌تن در تحقیقات بعدی، پیشنهاد می‌شود و ضرورت مقایسه ترکیبات مؤثره در انواع مختلف سیرهای کشت‌شده در نواحی مختلف و بررسی درصد توانایی زنده‌مانی آن‌ها به منظور یافتن بهترین گزینه برای مطالعات بعدی آشکار می‌گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر دوستی، رئیس مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد که ما را در به ثمر رساندن این تحقیق یاری نمودند، کمال تقدیر و تشکر را دارند.

References:

- [1] Hajian K, Firouzjahi A, Kia MT. Pattern of age distribution of different cancers in Babol in 2001. *Pajou Pezes* 2003; 27(3): 239-45. [in Persian]
- [2] Arshi A, Sharifi FS, Khorramian Ghahfarokhi M, Faghih Z, Doosti A, Ostovari S, et al. Expression Analysis of MALAT1, GAS5, SRA, and NEAT1 lncRNAs in Breast Cancer Tissues from Young Women and Women over 45 Years of Age. *Mol Ther Nucleic Acids* 2018; 12: 751-7.
- [3] Fisch T, Pury P, Probst N, Bordoni A, Bouchardy C, Frick H, et al. Variation in survival after diagnosis of breast cancer in Switzerland. *Ann Oncol* 2005; 16(12): 1882-8.
- [4] Harirchi I, Kolahdoozan S, Karbakhsh M, Chegini N, Mohseni SM, Montazeri A, et al. Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. *Ann Oncol* 2011; 22(1): 93-7.
- [5] Nouroz F, Mehboob M, Noreen S, Zaidi F, Mobin T. A Review on Anticancer Activities of Garlic (*Allium sativum* L.). *Middle-East J Sci Res* 2015; 23 (6): 1145-51.
- [6] Hans-jorj B. Extraction of Natural Products from Plants – An Introduction. USA: wiley; 2011.
- [7] Gheyrati L, Naghavi P, Zeinali H, Moradi S. Karyotype diversity in 5 varieties of garlic using factor analysis. *J Crop Breed* 2018; 9(24): 137-43.
- [8] Akbari M, Sadeghi A, Sarabandi KH, GHorbani A. A physicochemical properties and anti oxidant activities of Green Tea extract microencapsulated by co-crystalization technique *JFST* 2019; 85(15): 179-93
- [9] LI S, YANG G, Zhu X, CHENG L, SuN Y, ZHAO Z. Combination of rapamycin and garlic-derived S-allylmercaptocysteine induces colon cancer cell apoptosis and suppresses tumor growth in xenograft nude mice through autophagy/p62/Nrf2 pathway. *Oncol Reports* 2017; 38(3): 1637-44.
- [10] Kasper DL, Harrison TR, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub; 2005.
- [11] Mattil-Fritz S, Scharner D, Piuko K, Thönes N, Gissmann L, Müller H, et al. Immunotherapy of equine sarcoid: dose-escalation trial for the use of chimeric papillomavirus-like particles. *J Gen Virol* 2008; 89(Pt 1):138-47.
- [12] Rais uddin S, Ahmad S, Fatim M, Dabeer S. Toxicity of anticancer drugs and its prevention with special reference to role of garlic constituents. *Annals Phytomed* 2018; 7(1): 13-26.
- [13] Bernatoniene J, Kopustinskiene D. The Role of Catechins in Cellular Responses to Oxidative Stress. *Molec* 2018; 23: 965.
- [14] Bagul M, Kakumanu S, Wilson T. Crude Garlic Extract Inhibits Cell Proliferation and Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Cancer Cells In Vitro. *J Med Food* 2015; 18(7): 2015; 731-7.
- [15] Bargahi A, RabbaniChadegani O, Mohammad Hasan Z. Effect of shark cartilage on the cytotoxic activity of NK cells immune system. *ISMJ* 2009; 12: 181-8.
- [16] Ghazanfari T, Hassan ZM, Ebtekar M, et al. Garlic induces a shift in cytokine pattern in Leishmania major-Infected BALB/c Mice. *Scand J Immun* 2000; 52: 491-5.
- [17] Lanzotti V. The analysis of onion and garlic. *J Chromato* 2006; 1112(1): 3-22.
- [18] Koo M, Cho C. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *Eur J Pharmacol* 2004; 500(1-3): 177-85.
- [19] Siddiqui I, Saleem M, Adhami V, Asim M, Mukhtar H. Tea beverage in chemoprevention and chemotherapy of prostate cancer. *Acta Pharmacologica Sinica* 2007; 28(9): 1392-408.
- [20] Zaveri N. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sci* 2006; 78(18): 2073-80.
- [21] Lambert JD, Elias RJ. The antioxidant and prooxidant activities of Green Tea polyphenols: A role in cancer prevention. *Arch Biochem Biophys* 2010; 501(1): 65-72.
- [22] Li MJ, Yin YC, Wang J, Jiang YF. Green Tea compounds in breast cancer prevention and treatment. *World J Clin Oncol* 2014; 5(3): 520-8.
- [23] Guang D, Zhi YU, Xiao W, Chunhao Y, Tyler C, Chun Y. Epigallocatechin gallate is the most effective cancer chemopreventive polyphenol in Green Tea. *Nutrients* 2012; 339(10): 1679-91.
- [24] Valizadeh M, Rouhi L, Hejazi SH. The viability and proapoptotic effect of Green Tea on breast cancer cell line (sSK-BR-3) and human fibroblast cells (HU-02). *J Pay Sal* 2019; 12(3): 221-9.
- [25] Cassel E, Vargas R, Martinez N, Lorenzo D, Dellacassa E. Steam distillation modeling for essential oil extraction process. *Indust Crops Prod* 2009; 29(1): 171-6.
- [26] Ait-Mohamed O, Battisti V, Joliot V, Fritsch L, Pontis J, Medjkane S, et al. Acetonic extract of *Buxus sempervirens* induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy in breast cancer cells. *PloSone* 2011; 6(9): e24537.
- [27] Pal SK, Shukla Y. Herbal medicine: current status and the future. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003; 4(4): 281-8.
- [28] Zhang Q, Tang X, Lu Q, Zhang Z, Rao J. Green tea extract and (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibit hypoxia- and serum-induced HIF-1 α protein accumulation and VEGF expression in human cervical carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther* 2006; 5(5): 1227-38.
- [29] Luo R, Fang D, Hang H, Tang Z. The Mechanism in Gastric Cancer Chemoprevention by Allicin. *Anti-Cancer Agents Med Chem* 2016; 16(7): 802-9.

- [30] Suleria H, Butt M, Khalid N, Sultan S, Aleem M, Abbas M. Garlic (*Allium sativum*): diet based therapy of 21st century—a review. *Asian Pac J Trop Dis* 2015; 5(4): 271-8.
- [31] Arunkumar A, Vijayababu MR, Srinivasan N, Aruldas MM, Arunakaran J. Garlic compound, diallyl disulfide induces cell cycle arrest in prostate cancer cell line PC-3. *Mol Cell Biochem* 2006; 288(1): 107-13.
- [32] Wu Y, Tang L, Azabdaftari G, Pop E, Smith GJ. Adrenal androgens rescue prostatic dihydrotestosterone production and growth of prostate cancer cells after castration. *Mol Cell Endo* 2019; 486: 79-88.
- [33] Ravanbakhshian R, Behbahani M. Cytotoxic and antibacterial activities of fermented and non-fermented extracts of garlic. *J Maz Univ Med Sci* 2018; 27(156): 38–49. [in Persian]
- [34] Ahmad R, Ali AM, Israf DA, Ismail NH, Shaari K, Lajis NH. Antioxidant, radical-scavenging, anti-inflammatory, cytotoxic and antibacterial activities of methanolic extracts of some Hedyotis species. *Life Sci* 2005; 76(17): 1953-64.
- [35] Pinto JT, Lapsia S, Shah A, Santiago H, Kim G. Anti-proliferative effects of garlic-derived and other allium related compounds. *Adv Exp Med Biol* 2001; 492: 83-106.
- [36] Miraghajani M, Rafie N, Hajianfar H, Larijani B, Azadbakht L. Aged Garlic and Cancer: A Systematic Review. *Int J Prev Med* 2018; 9: 84.
- [37] Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R, Lanzotti V. Vavilosides A1/A2–B1/B2, new furostane glycosides from the bulbs of *Allium vavilovii* with cytotoxic activity. *Bioorg Med Chem* 2013; 21(7): 1905-10.
- [38] Arabski M, Wegierek-Ciuk A, Czerwonka G, Lankoff A, Kaca W. Effects of saponins against clinical *E. coli* strains and eukaryotic cell lines. *J Biomed Biotech* 2012; (2012): 1-6.
- [39] Sobolewska D, Michalska K, Podolak I, Grabowska K. Steroidal saponins from the genus *Allium*. *Phytochem Rev* 2016; 15(1): 1-35.
- [40] Zolfaghari B, Sadeghi M, Troiano R, Lanzotti V. 3-Keto umbilicagenin A and B, new sapogenins from *Allium umbilicatum* Boiss. *Fitoterapia* 2015; (102): 198–202.
- [41] Susanto H, Fakhroodin N, Murti YB and Siswomiharjo W. Saponins from *Plumeria acuminata* Ait induce cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous carcinoma cells. *Chin J Dent Res* 2010; 13(2): 153-6.
- [42] Nag SA, Qin JJ, Wang W, Wang MH, Wang H, Zhang R. Ginsenosides as anticancer agents: invitro and in vivo activities, structure-activity relationships, and molecular mechanisms of action. *Front Pharmacol* 2012; (3): 1-18.
- [43] Zhang W, Chen G, Deng CQ. Effects and mechanisms of total *Panax notoginseng* saponins on proliferation of vascular smooth muscle cells with plasma pharmacology method. *J Pharm Pharmacol* 2012; 64(1): 139-45.
- [44] Si YC, Zhang JP, Xie CE, Zhang LJ, Jiang XN. Effects of *Panax notoginseng* saponins on proliferation and differentiation of rat hippocampal neural stem cells. *Am J Chin Med* 2011; 39(5): 999-1013.
- [45] Millet AS, Lamy E, Jones D, Stintzing F, Mersumdermann V, Merfort I. Fermentation enhances the biological activity of *Allium cepa* bulb extracts. *J Agric Food Chem* 2012; 60(9): 2148-56.