بررسی برون‌تنی محافظت DNA لکوسیتی توسط اسانس و عصاره اتانولی گیاه مرزه (*Satureja hortensis* L.)

جواد بهروان[1]*، فاطمه مصفا[2]، غلامرضا کریمی[3]، مهرداد ایرانشاهی[4]

۱- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- دستیار تخصصی، بیوتکنولوژی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۳- دانشیار، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
٤- استادیار، گروه بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد
*آدرس مکاتبه: بخش بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، صندوق‌پستی: ۹۱۷۷۵ – ۱۳٦۵، تلفن: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)
نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱ (۰۵۱۱)
پست الکترونیک: behravanj@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸٤/۸/۲۲ **تاریخ تصویب:** ۸۵/۹/۱۳

چکیده

مقدمه: صدمه به **DNA** و استرس اکسیداتیو از عوامل مهم در بسیاری از بیماری‌های تحلیل‌دهنده و پیری هستند.

هدف: هدف از این تحقیق، بررسی اثرات محافظتی عصاره اتانولی و اسانس گیاه بر صدمات ناشی از پراکسیدهیدروژن در **DNA** لکوسیتی بود.

روش بررسی: صدمه به **DNA** و مقاومت آن در مقابل اثرات تخریبی پراکسیدهیدروژن باسنجش کومت انجام شد. لنفوسیت‌ها با استفاده از محلول جداکننده (فیکول ۵۷ گرم در لیتر) جدا شده و در معرض عصاره اتانولی گیاه مرزه (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، اسانس گیاه (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر)، پراکسیدهیدروژن (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و مخلوطی از پراکسیدهیدروژن (۲۰۰ میکرومولار) با عصاره اتانولی (۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و یا اسانس گیاه (۱ و ۲/۵ میکرولیتر برمیلی‌لیتر) در ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و وسعت جابجایی **DNA** با روش الکتروفورز میکروژلی تک سلولی در تحت شرایط قلیایی اندازه‌گیری شد.

نتایج: تیمار لنفوسیت‌ها با عصاره اتانولی یا اسانس گیاه مرزه منجر به کاهش قابل توجه صدمه به **DNA** در اثر پراکسیدهیدروژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل شد. عصاره گیاه باعث مهار قابل توجه ($p< ۰/۰۱$) صدمه اکسیداتیو **DNA** ناشی از پراکسیدهیدروژن در مقایسه با نمونه‌های کنترل در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر شد. اسانس گیاه نیز (۱ و ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) مهار قابل توجه ($p<۰/۰۱$) صدمه ناشی از پر اکسید هیدروژن بر **DNA** را نشان داد.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اتانولی (در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و اسانس گیاه (در غلظت‌های ۱ و ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) هر دو قادر به مهار اثرات صدمات اکسیداتیو به **DNA** کروموزومی لنفوسیت‌ها هستند.

گل‌واژگان: **DNA**، مرزه، ***Satureja hortensis***، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌ژنوتوکسیک

www.SID.ir

مقدمه

گیاه مرزه[1] گیاهی‌ست معطر که اثرات مختلفی مانند درمان دردهای عضلانی، کرامپ، تهوع و بیماری‌های عفونی و اسهال دارد [۱]. همچنین از این گیاه در مواد غذایی به عنوان طعم‌دهنده استفاده شده است [۲]. این گیاه در بررسی‌های آزمایشگاهی اثرات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانت، خواب‌آور و ضداسپاسم از خود نشان داده است [۳،٤،٥،٦].

اکسیداسیون DNA به عنوان یکی از عوامل مهم در بروز بسیاری از بیماری‌های دژنراتیو و پیری شناخته می‌شود [۷،۸،۹]. از طرفی گزارش‌های متعددی در مورد اثرات برون‌تنی مواد فیتوشیمیایی جدا شده از گیاهان و اثرات مثبت آن‌ها بر سلامت انسان و جلوگیری از مکانیسم‌های پیری وجود دارد [۱۰،۱۱،۱۲]. سنجش کومت یا سنجش ژل الکتروفورزی بر سلول منفرد، روشی موثر در ارزیابی صدمه به DNA موجود در سلول است. این سنجش عمدتاً بر پایه توانایی قطعه‌های شکسته و دناتوره شده DNA در مهاجرت به خارج از سلول تحت یک میدان الکتریکی استوار شده است. در این سنجش DNA صدمه نخورده حرکت بسیار آهسته‌تری داشته و در محدوده هسته سلول باقی می‌ماند. پس از انجام آزمایش با بررسی دنباله بوجود آمده در اثر حرکت DNA «کومت» از نظر شکل و الگوی مهاجرتی می‌توان به میزان صدمه به DNA پی برد [۱۳].

بررسی حاضر جهت تحقیق دربارهٔ اثرات محافظتی عصاره اتانلی و اسانس گیاه مرزه بر تخریب اکسیداتیو DNA لنفوسیت‌ها توسط پراکسید هیدروژن (اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک) صورت گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و شناسایی گیاه

گیاه مرزه از کشت‌های باغچه‌ای اطراف شهر مشهد در تیر ماه ۱۳۸۳ جمع‌آوری شد و توسط هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد شناسایی و به شماره ۱-۱۹۰۸-۱۵۳ ثبت شد.

تهیه اسانس و عصاره الکلی

اسانس از اندام‌های هوایی گیاه (۱۰۰ گرم) با روش تقطیر با بخار آب و استفاده از دستگاه کلاونجر [۱٤] استخراج گردید. سپس اسانس از لایه آبی جدا شده و با سولفات سدیم انیدر آب‌گیری و تا هنگام مصرف در یخچال نگهداری شد. میزان اسانس به دست آمده ۰/٦ درصد (حجم/وزن) بود. جهت تهیه عصاره اتانولی ابتدا ۱۱۵ گرم پودر خشک شده از اندام‌های هوایی گیاه هموژنه شده، با استفاده از اتانول توسط دستگاه سوکسله استخراج شد و سپس اتانول تحت شرایط کاهش فشار حذف گردید که مقدار ۱٦/۷ گرم عصاره غلیظ به دست آمد.

تهیه نمونه‌های خون و جداسازی لنفوسیت‌ها

نمونه‌های خون از رگ دم رت‌های نر سالم با وزن ۱۸۰-۲۵۰ گرم به دست آمد. ۵ میلی‌لیتر خون به نسبت ۱:۱ با بافر سالین فسفات رقیق و به آهستگی بر روی محیط مخصوص جداسازی لنفوسیت (فیکول ۵۷ گرم بر لیتر) به نسبت حجمی ۱:۱ در یک لوله سانتریفوژ اضافه شد. لوله‌های مذکور به مدت ۲۰ دقیقه در g ×۱۰۰۰ سانتریفوژ شدند و لنفوسیت‌ها جدا گشتند. در مرحله بعد سلول‌های جدا شده به نسبت حجمی ۱:۱ در بافر فسفات سالین سوسپانسیون و مجدداً به مدت ۵ دقیقه در g ×۱۰۰۰ سانتریفوژ شد. سپس رسوب به دست آمده در ۰/۵ میلی‌لیتر از بافر سالین فسفات سوسپانسیون شده و سلول‌ها با استفاده از محفظه اسلایدهای Neobauer شمارش شدند. جهت انجام تست کومت غلظت سلول‌ها در نمونه به ۵۰۰۰ سلول در هر میکرولیتر رسانیده شد. زنده بودن سلول‌ها به میزان بیش از ۹۸ درصد نیز توسط رنگ آمیزی تریپان بلو تایید شد [۱۵].

[1] *Satureja hortensis* L.

Archive of SID
www.SID.ir

سنجش کومت[1]

آزمایش‌های ژنوتوکسیسیتی با انجام تغییرات جزیی در روش استاندارد و در شرایط قلیایی صورت گرفت [۱۳]. به طور خلاصه حجم‌های ۱۰ میکرولیتری از سوسپانسیون سلولی با ۹۰ میکرولیتر از آگارز با نقطه ذوب پایین (LMP 0.5% w/v) در بافر فسفات (PBS) در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد و به سطح اسلایدهای میکروسکوپی سرد که قبلا با آگارز معمولی (w/v ۱/۵ درصد) پوشیده شده بودند اضافه گشت. بعد از بستن لایه دوم یک لایه سوم حاوی ۱۰۰ میکرولیتر LMP به اسلایدها اضافه گشت. سپس اسلایدها در حجم زیادی (۵۰ میکرولیتر برای هر اسلاید) از غلظت‌های عصاره اتانولی گیاه (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، اسانس (۰/۰۵، ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر)، هیدروژن پراکساید (۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار) و مخلوطی از هیدروژن پراکساید (۲۰۰ میکرومولار) با عصاره گیاهی (۱ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) یا اسانس (۱ و ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر) به مدت ۳۰ دقیقه و در ٤ درجه سانتی‌گراد غوطه ور شدند. سپس اسلایدهای میکروسکوپی با PBS شسته شدند و در محلول لیزکننده سرد (pH 10) حاوی ۲/۵ مولار NaCl، ۱۰۰ میلی‌مولار Na_2EDTA، ۱۰ میلی‌مولار تریس و ۱ درصد تریتون X-100 و ۱۰ درصد دی‌متیل‌سولفوکساید به مدت یک شب در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از انکوباسیون، اسلایدها با PBS شسته شده و در یک تانک الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در محلول تازه تهیه شده (۱ میلی‌مولار Na_2EDTA، ۰/۳ نرمال NaOH و pH 13) قرار داده شدند. الکتروفورز نمونه‌ها در ٤ درجه سانتی‌گراد با ۳۰۰ میلی‌آمپر و به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. اسلایدها سپس با بافر تریس (۰/٤ مولار، ۷/۵ pH) سه بار و هر بار به مدت ۵ دقیقه خنثی شدند و سپس با اتیدیوم برماید (۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) رنگ‌آمیزی شدند. در مرحله بعدی اسلایدها با میکروسکوپ فلورسانت (Nikon 100) متصل به دوربین مدار بسته و کامپیوتر، مشاهده و تصاویر مربوطه ضبط شدند. برای هر آنالیز ۵۰ سلول منفرد و در دو آزمایش جداگانه (برای هر غلظت دو اسلاید، n= ٤) بررسی شدند. سلول‌های منفرد با نرم‌افزار "Casp 1.2.2" انجام شد. میزان صدمه به DNA برمبنای tail DNA % و بر اساس فرمول زیر سنجیده شد.

$$\% \text{ tail DNA} = [\text{tail DNA}/(\text{head DNA} + \text{tail DNA})] \times 100$$

عدد بالاتر مربوط به tail DNA % نشان‌دهنده صدمه بیشتر بر DNA در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

اختلاف بین گروه‌ها با آنالیز یک طرفه واریانس (ANOVA) و تست Dunnet انجام شد و مقادیر بر اساس میانگین ± خطای استاندارد تعیین گردید.

نتایج

جهت بررسی میزان صدمه وارد شده به کروموزم، لنفوسیت‌ها در معرض غلظت‌های مختلف از هیدروژن پر اکساید (شکل‌های شماره ۱ و ۲)، عصاره اتانولی (شکل شماره ۳) یا اسانس گیاه مرزه (شکل شماره ٤) در چهار درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند و اثرات القا شده با روش (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) بررسی شد. افزایش قابل توجهی در tail DNA % با افزایش غلظت هیدروژن پر اکساید (۵۰ تا ۲۰۰ میکرومولار) (شکل شماره ۱، $p<۰/۰۰۱$) مشاهده شد. شکل شماره ۲ مقایسه بین تاثیر PBS و هیدروژن پراکساید ۲۰۰ میکرومولار را بر لنفوسیت‌ها نشان می‌دهد. آزمایش‌ها در گروه کنترل فقط صدمات جزیی به DNA به صورت توزیع tail DNA % بین صفر تا ده درصد (شکل‌های شماره ۳ و ٤) $p> ۰/۰۵$ را نشان داد. در بررسی‌های بعدی اثرات مهارکننده عصاره اتانولی و اسانس گیاه در مقابل صدمات کروموزومی توسط هیدروژن پراکساید بررسی شد. همان‌گونه که در شکل شماره ۵ دیده می‌شود عصاره اتانولی فقط در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر مهاری قابل توجه ($p< ۰/۰۱$) نشان داد. اسانس گیاه در غلظت‌های ۱ و ۲/۵ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اثرات مهاری معنی‌دار ($p< ۰/۰۱$) در مقابل اثر تخریبی پراکسیدهیدروژن نشان داد (شکل شماره ٦).

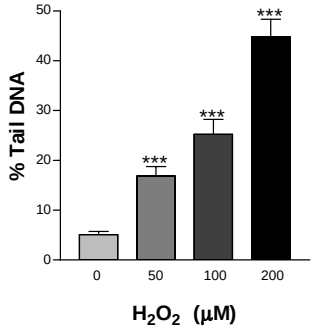
[1] Comet assay

Archive of SID

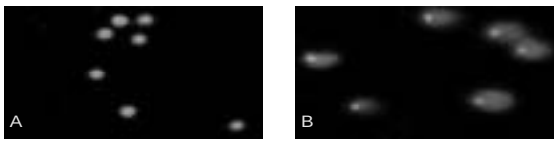
www.SID.ir

بحث

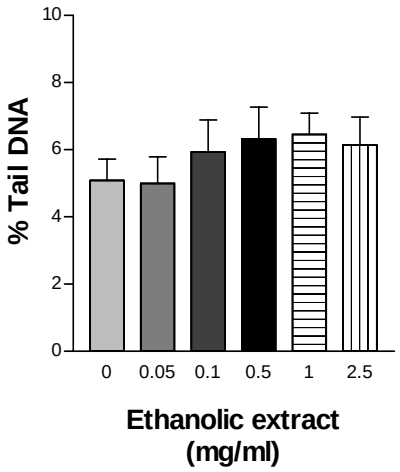
در این بررسی خصوصیات آنتی ژنوتوکسیک عصاره اتانولی و اسانس گیاه مرزه برای اولین بار گزارش می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانت تیمول، کارواکرول و گاما ترپینن توسط برخی گروه‌ها منتشر شده است [۱۶،۱۷،۱۹،۲۰] از طرفی فعالیت‌های بیولوژیک مشاهده شده از عصاره و یا اسانس یک گیاه به طور عمده به اجزای موجود در آن‌ها مربوط است. با این حال اثرات سینرژیستی و یا آنتاگونیستی ترکیباتی که با درصدهای جزیی در این نمونه‌ها وجود دارند نباید از نظر دور بماند. بنابراین به نظر می‌رسد که اثرات مشاهده شده



شکل شماره ۱- صدمه به DNA لنفوسیتی تیمار شده با غلظت‌های مختلف هیدروژن پراکساید که با سنجش کومت بررسی شده است. میزان شکست در DNA بر اساس میانگین ± خطای استاندارد از درصد حرکت کرده در سنجش کومت (در صد DNA در دم) بیان شده است (تست ANOVA). p< ۰/۰۰۱ *، p< ۰/۰۱ **، p< ۰/۰۵ * در مقایسه با کنترل (تست ANOVA)**

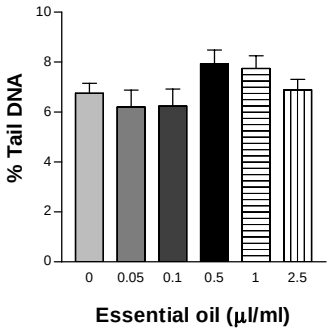


شکل شماره ۲ - تصاویر کومت DNA لنفوسیتی. A سلول‌های کنترل و B سلول‌هایی که تحت تاثیر هیدروژن پراکساید ۲۰۰ میکرومولار قرار گرفتند

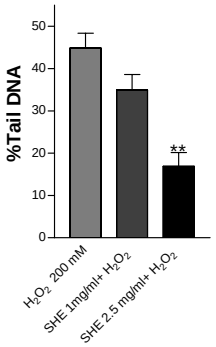


شکل شماره ۳ - صدمه به DNA لنفوسیتی که در معرض غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی مرزه به مدت ۳۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. میزان شکست در DNA براساس میانگین ± خطای استاندارد از درصد حرکت کرده در سنجش کومت (در صد DNA در دم) بیان شده است (تست ANOVA)

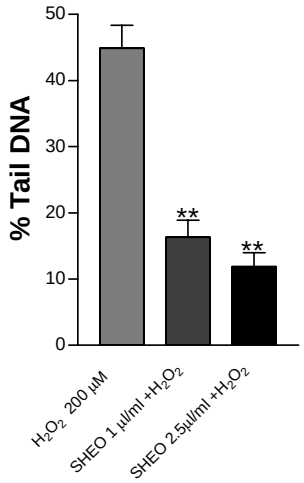
Archive of SID
www.SID.ir



شکل شماره ٤ – صدمه به DNA لنفوسیت‌ها که در مجاورت غلظت‌های مختلف اسانس گیاه مرزه به مدت ۳۰ دقیقه در ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. میزان شکست در DNA بر اساس میانگین ± خطای استاندارد از درصد حرکت کرده در سنجش کومت (در صد DNA در دم) بیان شده است (تستANOVA)



شکل شماره ٥ – اثر محافظتی عصاره اتانولی گیاه مرزه بر صدمه ناشی از هیدروژن پراکساید (۲۰۰ میکرومولار) در DNA لنفوسیت‌ها. میزان شکست در DNA بر اساس میانگین ± خطای استاندارد از درصد حرکت کرده در سنجش کومت (در صد DNA در دم) بیان شده است (تستANOVA)



شکل شماره ٦ – تاثیر اسانس گیاه مرزه بر صدمه ناشی از هیدروژن پراکساید (۲۰۰ میکرومولار) در DNA لنفوسیت‌ها. میزان شکست در DNA بر اساس میانگین ± خطای استاندارد از درصد حرکت کرده در سنجش کومت (در صد DNA در دم) بیان شده است (تست ANOVA)

Archive of SID
www.SID.ir

از اسانس به علت وجود مقادیر بالای ترکیبات ذکر شده در اسانس این گیاه باشد. همچنین حضور ترکیبات پلی فنولیک از قبیل رزمارینیک اسید و فلاونوییدها در مرزه گزارش شده است [۱۹]. این ترکیبات مشتق از اسید فنولیک به همراه فلاونوییدها در سیستم‌های مختلف اثرات آنتی‌اکسیدانت بروز داده‌اند [۲۰]. بدین‌ترتیب اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک مشاهده شده در عصاره اتانولی نیز می‌تواند ناشی از حضور ترکیبات فنلی در این عصاره باشد. بررسی‌های بیشتر بر روی اجزا و خواص آنتی‌اکسیدان عصاره و اسانس گیاه می‌تواند جزییات بیشتری از مکانیسم اثرات آنتی ژنوتوکسیک مشاهده شده را روشن نماید.

تشکر و قدردانی

این تحقیق با حمایت مالی شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد انجام شده و نویسندگان سپاس خود را در این رابطه اعلام می‌دارند.

منابع

1.Zargari A. Medicinal Plants. 4th ed. Tehran: Tehran University Press. 1990, pp: 42-45.

2.Amin G. Popular Medicinal Plants of Iran. 1st ed. Tehran: Iranian Ministry of Health Press. 1991, pp: 103-104.

3.Hajhashemi V, Sadraei H, Ghannadi AR, Mohseni M. Antispasmodic and anti-diarrhoeal effect of *Satureja hortensis* L. essential oil. *J. Ethnopharmacol*. 2000; 71 (1-2): 187-92.

4.Gulluce M, Sokmen M, Daferera D, Agar G, Ozkan H, Kartal N. In vitro antibacterial, antifungal, and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of herbal parts and callus cultures of *Satureja hortensis* L. *J. Agric Food Chem*. 2003; 51 (14): 3958-65.

5.Dorman HJ, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected lamiaceae species grown in Turkey. *J. Agric Food Chem*. 2004; 52 (4): 762-70.

6.Souri E, Amin G, Farsam H, Andaji S. The antioxidant activity of some commonly used vegetables in Iranian diet. *Fitoterapia*. 2004; 75 (6): 585-8.

7.Ames BN, Gold LS. Dietary Carcinogens, Environmental-Pollution, and Cancer - Some Misconceptions. *Medical Oncology and Tumor Pharmacotherapy* 1990; 7 (2-3): 69-85.

8.Ceruti P. Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 1985; 227: 375-81.

9.Wiseman H, Kaur H, Halliwell B. DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett*. 1995; 93 (1): 113-20.

10.Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet* 1993; 342 (8878): 1007-11.

11.Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J. Neurosci*. 1999; 19 (18): 8114-21.

12.Willcox JK, Ash SL, Catignani GL. Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*. 2004; 44 (4): 275-95.

13.Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res*. 1988; 175 (1): 184-91.

14.Clevenger J. Aparatus for determination of volatile oil. *Journal of American Pharmaceutical Association* 1928; 17: 346.

15.Philips H. Dye exclusion tests for cell viability. In: Kruse P, Patterson M, (ed). *Tissue Culture Methods and Applications*. New York: Academic press. 1973, p: 406-8.

Archive of SID

www.SID.ir

16.Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on Penicillium digitatum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2000; 48 (6): 2576-81.
17.Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of Botrytis cinerea, Fusarium sp and Clavibacter michiganensis subsp michiganensis. *Crop Protection* 2003; 22 (1): 39-44.
18.Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Antimicrobial Activity of Thymol, Carvacrol and Cinnamaldehyde Alone or in Combination. *Pharmazie* 1993 48 (4): 301-4.
19.Bertelsen G, Christophersen C, Nielsen PH, Madsen HL, Stadel P. Chromatographic Isolation of Antioxidants Guided by a Methyl Linoleate Assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995; 43 (5): 1272-5.
20.Lu YR, Foo LY. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry* 2001; 75 (2): 197-202.

Archive of SID

www.SID.ir