بررسی اثرات عصاره و اسانس آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و میخک (*Eugenia caryophilata*) بر روی سلول‌های Vero, Hela, Hep2 در محیط کشت سلولی با روش MTT

ناهید رحیمی فرد[۱]، سعیدرضا پاکزاد[۲]، شهرام شعیبی[۳]، محمدحسین هدایتی[٤]، هما حاجی‌مهدی‌پور[٥]، وحیده مطهری‌نیا[٦]، لیلا مهرافشان[۷]، آیدا جوادی[۸]، مرتضی پیرعلی همدانی[۹]*

۱- دانشیار، اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو و مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو- وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی
۲- استادیار اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان
۳- استادیار اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان
٤- مربی واحد کنترل کیفیت انیستیتو پاستور
٥- استادیار اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو وزارت بهداشت و درمان
٦- دکتری داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی
۷- دکتری داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی
۸- دکتری داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی
۹-دانشیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی ، دانشکده داروسازی ، دانشگاه علوم پزشکی تهران
*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان امام خمینی، نرسیده به تقاطع ولی‌عصر، اداره کل آزمایشگاه‌های کنترل غذا و دارو، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی
تلفن: ٦٦٤٠٦١٧٤ (۰۲۱)، نمابر: ٦٦٤٠٤٣٣٠ (۰۲۱)
پست الکترونیک: mpirali@fdo.ir، piralihm@tums.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۷ **تاریخ تصویب:** ۸۸/۳/٥

چکیده

مقدمه: با افزایش کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌ها در فرآورده‌های غذایی، دارویی مختلف به همان نسبت می‌بایستی تاثیر کاربرد وسیع آنها از نظر سلامت نیز ارزیابی شود.

هدف: کاربرد نگهدارنده‌های صنعتی و شیمیایی در فرآورده‌های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی رو به افزایش است. به دلیل اثرات جانبی و موتازنی این ترکیبات و مطالعه در مورد مواد طبیعی که قابلیت جایگزین شدن با نگهدارنده‌های شیمیایی را داشته باشند ضروری به نظر می‌رسد. در این مطالعه درصد viability سلول‌های Hela, Vero, hep2 در مواجه با رقت‌های انتخابی از عصاره و اسانس آویشن باغی و شیرازی و میخک در زمان‌های ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت و با روش MTT تعیین و مقایسه شده است. عصاره‌ها با روش پر کولاسیون و به کار بردن متانول به عنوان حلال و اسانس‌ها با دستگاه کلونجر تهیه شدند. عصاره‌ها سانتریفیوژ شده و سریال رقتی از عصاره و اسانس با غلظت‌های ۰/۱۸۷٥، ۰/۳۷٥، ۰/۷٥، ۱/٥، ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ppm تهیه و سپس با رده‌های سلولی Vero, Hela, hep2 در محیط کشت مجاور شدند.

نتایج: تمام اسانس‌ها و عصاره‌های مورد بررسی در غلظت‌های خاصی اثر سایتوپاتولوژیک بر روی هر سه رده سلولی نشان دادند. مقادیر این غلظت‌ها از حداقل ۰/۰٤ تا حداکثر ۳ میکروگرم در میلی‌لیتر را شامل می‌شد.

نتیجه‌گیری: از نتایج این تحقیق پیشنهاد می‌شود که در کاربرد اسانس‌ها در فرآورده‌های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی توجه به ایمنی[1] اهمیت بیشتری پیدا می‌کند.

گل‌واژگان: اثرات سایتوپاتولوژیک، آویشن باغی، آویشن شیرازی، میخک، رده‌های سلولی Vero, Hela, hep2، روش MTT

[1] Safety

www.SID.ir

مقدمه

اسانس و عصاره‌ها می‌توانند به عنوان منبع غنی جهت تهیه گیاهان دارویی و به عنوان نگه‌دارنده و آنتی‌اکسیدان در فرآورده‌های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی مطرح باشند و به نظر می‌رسد که در آینده به دلیل ایمنی بالاتر، به طور کلی ترکیبات طبیعی مانند این نوع ترکیبات جایگزین سایر عوامل شیمیایی شوند. هم‌چنین باید توجه داشت که حتی مواد طبیعی مانند عصاره‌ها و اسانس‌ها نیزممکن است در دوزهای خاصی و بالاتر از حدود تعیین شده دارای اثرات آلرژیک، سمیت و حتی موتاژنی بر روی برخی رده‌های سلول‌ها باشند. لذا هدف از این مطالعه بررسی و تعیین غلظت ایمن عصاره و اسانس برخی از گونه گیاهان پر مصرف قرار گرفت [۱،۲].

مواد و روش‌ها

تمام عصاره‌ها در این تحقیق با روش پر کولاسیون و با به کار بردن متانول به عنوان حلال استخراج و اسانس‌ها نیز با کمک دستگاه کلونجر تهیه شدند. عصاره‌ها سانتریفیوژ شده و سریال رقتی از عصاره و اسانس با غلظت‌های ۰/۱۸۷۵، ۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ٦، ۱۲ و ۲٤ ppm تهیه شد [۳].

رده‌های سلولی Vero, Hela, hep2 در محیط کشت MEM: Modified Eagle Medium, RPMI1640 رشد یافتند و به این محیط , ۱۰% FBS ۱ mM اسید آمینه‌های غیرضروری و ۱ mM سدیم پیروات اضافه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه با 5% CO2 قرار گرفت. سلول‌ها در حد نهایی فاز رشد خود به وسیله محلول تریپسین – EDTA جدا شده و سانتریفیوز (۳۰۰×g) انجام شد و با روش Trypan blue dye exclusion درصد viability مشخص شد [٥،٤].

۵۰۰۰ سلول زنده در میکروپلیت‌های Well ۹٦ کشت داده شد و ٤۸ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. بعد از گذشت زمان ٤۸ ساعت انکوباسیون محیط کشت با سریال رقت‌های انتخابی عصاره و اسانس در محیط کشت جدید جایگزین شد. سلول‌ها جهت بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره و اسانس به مدت ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت با رقت‌های انتخابی به صورت تریپلیکیت مجاور شدند. (با گذشت ۷۲ ساعت کنترل سلولی (کنترل منفی) در فاز رکود رفته و در ۲٤ ساعت نیز سلول‌ها به مقدار مطلوب رشد خود نرسیدند.) به همین دلیل در این مطالعه داده‌های حاصل از مجاورت ٤۸ ساعت با روش MTT مورد توجه قرار گرفت [۸].

روش MTT براساس کاهش و تبدیل 3_(4,5_dimethyle_2_thizaolyl)_2,5_diphenyle_2h_ tetrazolium bromide به ترکیبات نفوذ ناپذیر و غیرقابل حل فورمازان استتوسط آنزیم‌های دهیدروزناز میتوکندریایی استوار است و این ترکیبات در سلول‌های زنده تجمع پیدا می‌کنند [۷].

پس از زمان مجاورت محیط کشت خارج شده و سلول‌ها به همراه محیط کشت جدید شامل محلول MTT (۵ mg/ml in PBS) به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان محلول اسیدی شده ۱۰۰ ماکرولیتر propan-2-ol (۰/۰۴ MHcl) اضافه شد و ۱۵ دقیقه در shaker قرار گرفت. جذب نوری[1] در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader ثبت شد. مشاهده شد که در کنترل منفی (control cell+MTT) بالاترین مقدار جذب نوری به دست آمد که بیانگر زنده بودن سلول است [٦].

نتایج

از رسم نمودارهای غلظت[2]، کنترل مثبت[3]، کنترل منفی (کنترل سلولی) بر حسب جذب نوری نتایج مطابق با جداول شماره ۱، ۲ و ۳ به دست آمد:

بحث

تمام اسانس‌ها و عصاره‌های مورد بررسی در غلظت‌های خاصی اثر سایتوپاتولوژیک بر روی هر سه رده سلولی نشان دادند شکل شماره‌های ۱،۲،۳.

[1] OD
[2] Concentration
[3] DMSO

Archive of SID
www.SID.ir

جدول شماره ۱- غلظت‌های توکسیک عصاره و اسانس میخک بر روی سه رده سلول Vero, Hela, Hep2

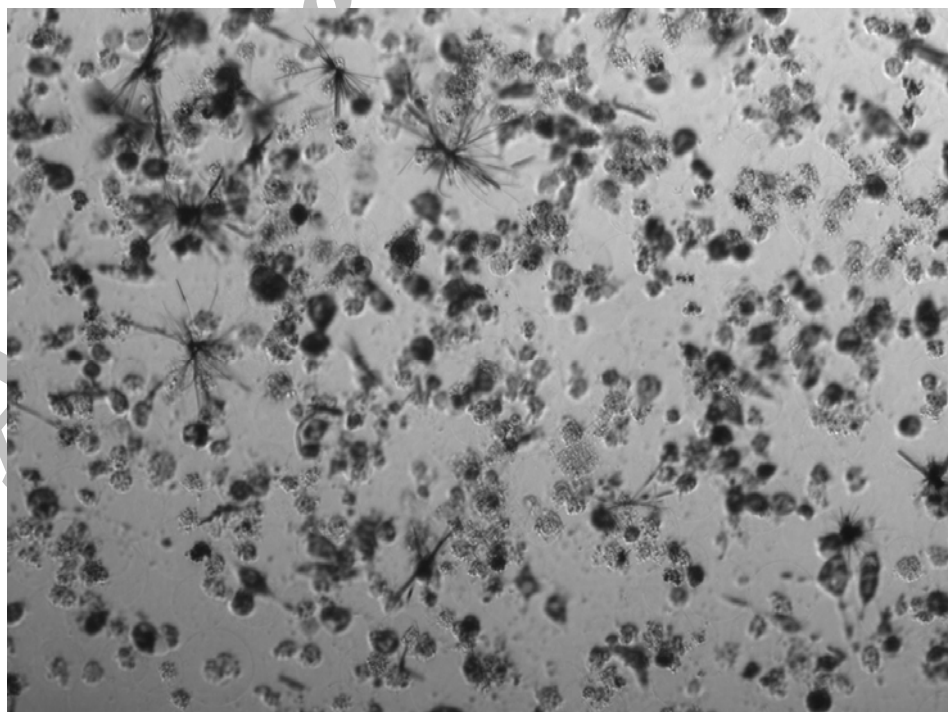
	عصاره میخک	اسانس میخک
HEP2	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳۷۵ تا ۰/۷۵ ppm
HELA	اثر توکسیک از ۰/۳۷۵ تا ۱/۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm
VERO	اثر توکسیک از ۰/۷۵ تا ۳ ppm	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۱/۵ ppm

جدول شماره ۲- غلظت‌های توکسیک عصاره و اسانس آویشن باغی بر روی سه رده سلول Vero, Hela, Hep2

	عصاره آویشن باغی	اسانس آویشن باغی
HEP2	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/٤٦ تا ۰/۱۸۷۵ ppm
HELA	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۳۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳ تا ۰/۳۷۵ ppm
VERO	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳ تا ۰/۱۸۷۵ ppm

جدول شماره ۳- غلظت‌های توکسیک عصاره و اسانس آویشن شیرازی بر روی سه رده سلول Vero, Hela, Hep2

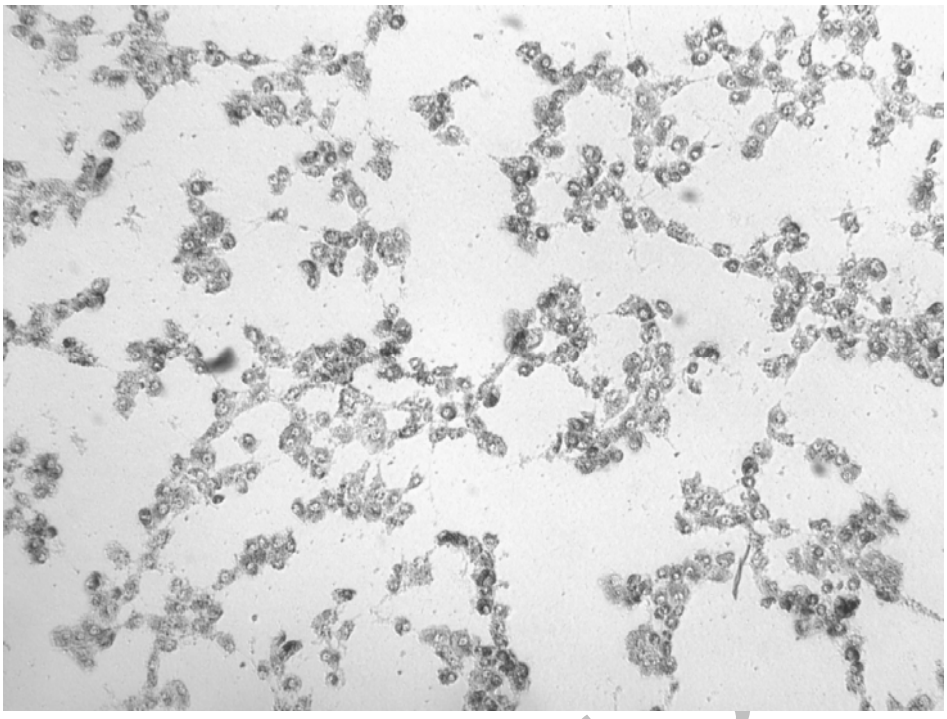
	عصاره آویشن شیرازی	اسانس آویشن شیرازی
HEP2	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳۷۵ تا ۰/۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۰٤٦ تا ۰/۱۸۷۵ ppm
HELA	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۳۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳ تا ۰/۳۷۵ ppm
VERO	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳ تا ۰/۱۸۷۵ ppm



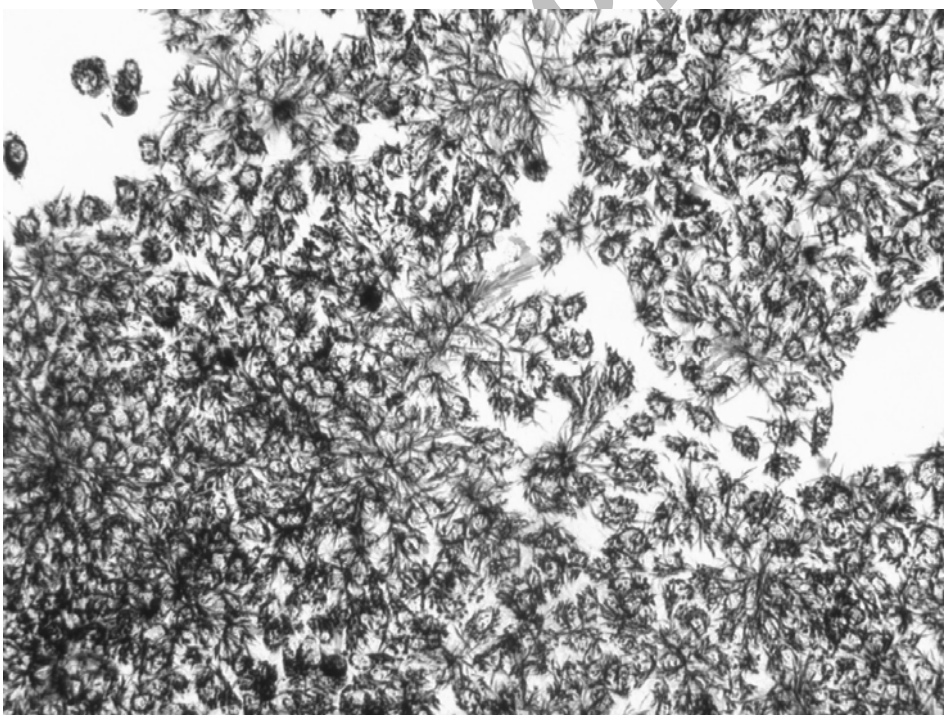
شکل شماره ۱ – سلول‌های Hela پس از اثر سایتوتوکسیک **اسانس‌ها و عصاره‌ها**

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۲ – سلول‌های Vero پس از اثر سایتوتوکسیک اسانس‌ها و عصاره‌ها



شکل شماره ۳ – سلول‌های hepII پس از اثر سایتوتوکسیک اسانس‌ها و عصاره‌ها

www.SID.ir

میانگین بیشترین و کمترین غلظت توکسیک عصاره و اسانس آویشن باغی بر روی هر سه رده سلولی فوق به شرح زیر است:

اسانس: از ۰/۰۷۸۱۲۵ تا ۰/۲۵ ppm

عصاره: از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۶۲۵ ppm

میانگین بیشترین و کمترین غلظت توکسیک عصاره و اسانس میخک بر روی هر سه رده سلولی فوق به شرح زیر است:

اسانس: از ۰/۱۵۶۲۵ تا ۱ ppm

عصاره: از ۰/۴۳۷۵ تا ۱/۷۵ ppm

میانگین بیشترین و کمترین غلظت توکسیک عصاره و اسانس آویشن شیرازی بر روی هر سه رده سلولی فوق به شرح زیر است:

اسانس: از ۰/۰۷۸۱۲۵ تا ۰/۲۵ ppm

عصاره: از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۶۲۵ ppm

که می‌توان نتیجه گرفت که اسانس‌ها در مقایسه با عصاره‌ها در غلظت‌های پایین‌تر اثر توکسیک نشان داده‌اند. لذا در این بحث پیشنهاد می‌شود که در کاربرد اسانس‌ها در فرآورده‌های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی توجه به ایمنی اهمیت بیشتری پیدا می‌کند.

منابع

1. Robert Yuan, Lin Traditional Chines medicine:"An approach to scientific proof and clinical validation". Pharmacology & Therapeutics, cosmos press, 2000, pp: 191 - 8.

2. G Miller, Lucinda, et al. Herbal Medicinals and clinician's guide. USA, pharmaceutical products press, 1988, pp: 158 - 9.

3. The Medicinal Herbs Pharmacopea, vol 2, 2002, pp: 632 - 7.

4. Teimoori A. Pharm.D. Thesis, Islamic Open University, Faculty of Pharmacy- No.1403, 2004, pp: 28 – 45.

5. Freshney RI. Culture of Animal Cell: A Manual of basic Technique, 3 ed; Wiley-Liss, New York, 1994, pp: 153 - 7.

6. Carmichael J and et al. *Cancer Res.* 1987; 47: 936 – 7.

7. Slater TF and et al. *Biochim. Biophys. Acta*. 1963; 77, 383.

8. McAteer JA and Douglas WHJ. Monolayer Cell Culture Techniques Techniques. in: Methods in Enzymology, Vol. 58: Cell Culture. W.B. jakoby and I. H. Pastan, Eds. Academic Press, New York, 1979, pp: 132 – 40.

Archive of SID

www.SID.ir