

اثرات جهش زایی فرآورده گیاهی آنتی میگرن

دکتر مصطفی سعادت* - دکتر معصومه انصاری لاری** - ایرج سعادت***

* استادیار ژنتیک - بخش زیست شناسی - دانشکده علوم - دانشگاه شیراز

** دانشکده داروسازی - دانشگاه علوم پزشکی شیراز

*** مربی بخش زیست شناسی - دانشکده علوم - دانشگاه شیراز

چکیده

مصرف روبه گسترش گیاهان دارویی و فرآورده‌های آنها و اثبات خاصیت جهش زایی و سرطان زایی برخی مواد موجود در گیاهان، اهمیت پژوهش دربارهٔ جهش زایی، فرآورده‌های دارویی گیاهی را روشن می‌سازد. تحقیق حاضر به منظور بررسی اثرات سیتوژنتیکی فرآورده گیاهی آنتی میگرن انجام شده است. از جمله روشهای بررسی جهش زایی، تجزیه و تحلیل متافازها از نظر شکست‌های کروماتیدی، ایجاد کروموزوم‌های دو سانتومری و پلی پلوئید می‌باشد. این تحقیق از طریق کشت نفوسیت‌های خون محیطی انسان در محیط کشت RPMI-1640 و مجاورت با ماده میتوزن فیتوهماکلوتین (PHA) و مواجهه با غلظت‌های مختلف دارو انجام شده است. هیدروکینون به عنوان شاهد مثبت بکار برده شده است و در آزمایش‌ها، علاوه بر شاهد منفی، تأثیر حلال (اتانول) نیز بررسی گردید. غلظت ۰/۵ و ۱ درصد (حجم به حجم) دارو باعث مرگ سلولی گردید. دارو در غلظت ۰/۲ درصد شدت به فراوانی متافازهای ناهنجار افزود. اثرات مشاهده شده، به عنوان اثر کلی فرآورده محسوب می‌شود و نمی‌توان به طور مشخصی آن را به گیاه یا ماده مؤثره خاصی نسبت داد. به منظور روشن نمودن تأثیر (یا تأثیرات) سوء آنها بر سلامتی مصرف کنندگان، بررسی تأثیرات سیتوژنتیکی دیگر فرآورده‌های گیاهان دارویی و مواد مؤثره موجود در آنها ضروری است.

کلید واژه‌ها: پادتن‌ها / فارماکوتوزی / گیاهان شناختی / میگرن

مقدمه

سافرول (در فلفل سیاه)، الکالوئیدهای پیرولیزیدین (در برخی از انواع چای)، گرسیپول (در روغن پنبه دانه) و هیدرازین‌های موجود در قارچ‌های خوراکی (V) و ترکیبات موجود در فلفل قرمز نیز ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی می‌نمایند (۸). فرآورده دارویی آنتی میگرن (شرکت گل دارو - اصفهان) به عنوان برطرف‌کننده و پیشگیری‌کننده حملات میگرنی مورد مصرف قرار می‌گیرد. بر اساس پژوهشهای بالینی، نه تنها یک آرام بخش مطبوع است، بلکه با مهار سنتز پروستاگلاندین‌ها با اثر احتمالی بر تروشح سروتونین اثر خود را اعمال می‌کند. دلایلی وجود دارد که نشان می‌دهد آزاد شدن غیرمتعارف سروتونین از پلاکت‌ها، در شروع

امروزه پذیرفته شده است که نسبت بالایی از سرطان‌ها با عوامل محیطی، خصوصاً عوامل شیمیایی، در ارتباط می‌باشند (۴). سرطان‌ها معمولاً ملکول‌های الکتروفیلی هستند، که با پیوندهای کووالان به DNA متصل می‌گردند، پایداری فیزیکی DNA را به هم می‌زنند، باعث تغییر در بیان ژن، جهش و ناهنجاری‌های کروموزومی می‌شوند (۵). اثر سرطان‌زایی و جهش زایی موادی مثل آمین‌های آروماتیک، آزیست، تنباکو، بنزن (۵)، برخی داروها (۴)، گیاهان و ترکیبات طبیعی جدا شده از آنها (۶ تا ۸) ثابت شده است. به عنوان مثال گلوکوزایسنولات‌ها و ایزوتیوسیانات‌ها (در گیاهان خانواده شب بو) (۶)،

بادرنجبویه چنین یاد شده است: "بادرنجبویه قوت دل بدهد و مفرح تمام بود، در تقویت دل و تفریح آن نظیر ندارد و آن را مفرح القلب المحزون خوانند" (۱). اثرات درمانی آن امروزه بدین صورت گزارش شده است: بادشکن، ضد اسپاسم، ضد اضطراب و فشارهای عصبی، رفع سوء هاضمه ناشی از اضطراب یا افسردگی، ضد ویروس و معرق (۹، ۱۰، ۱۲).

مواد و روش‌ها

آماده سازی دارو: از آنجائیکه فرآورده مورد استفاده حاوی حجم‌های مشخص از عصاره تام چند گیاه است و مواد مؤثر تعیین مقدار نشده‌اند؛ برای از بین بردن اختلافات احتمالی موجود بین سری ساخت‌های مختلف این فرآورده، پنج شیشه با پنج شماره سری ساخت متفاوت تهیه گردید و محتویات آنها با هم مخلوط شد. دارو، به منظور استفاده در محیط کشت، دارو به وسیله فیلترهای میلی پور (۰/۲۲ μm) استریل گردید.

خونگیری: خون از ۵ فرد سالمی که بیماری خاصی نداشتند و دارویی مصرف نمی‌کردند به وسیله سرنگ گرفته شد و در لوله‌های آزمایش استریل حاوی ضد انعقاد هپارین جمع‌آوری گردید.

کشت لنفوسیت و مطالعه کروموزوم‌ها: در هر لوله مخصوص کشت، ۱۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 حاوی، ۲۰ unit/ml پنی سیلین، ۳۰ μg/ml استرپتومایسین، ۱۵ درصد FCS و ۲ درصد PHA، ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر خون تام به آن اضافه گردید. کلیه این مراحل در زیر هود و در مجاورت شعله انجام پذیرفت. لوله‌های آماده شده به گرمخانه با دمای ۳۷°C منتقل شد و پس از گذشت ۷۱ ساعت به هر لوله محلول کلشسین - به منظور توقف تقسیم سلولی در مرحله متافاز اضافه گردید و مجدداً به مدت ۴۵ دقیقه در گرمخانه گذاشته شد. برداشت سلولها و تهیه لام بطریق استاندارد صورت پذیرفت. لامهای خشک شده به منظور رنگ‌آمیزی، در محلول ۵ درصد رنگ گیمسا (مدت ۷-۶ دقیقه) قرار داده شدند.

در زیر میکروسکوپ متافازهایی با ۴۴ تا ۴۶ کروموزوم از نظر دارا بودن ناهنجاریهایی همچون شکست‌های کروماتیدی و کروموزومهای دو سانترومیری و پلی پلویدی مورد بررسی قرار گرفتند. تعداد متافازهای سالم، متافازهای

حملات میگرنی مؤثر می‌باشد (بروشور دارو). قطره آنتی میگرن از عصاره گیاهان دارویی زیر که به طریق پرکولاسیون تهیه شده است، آماده می‌گردد:

Valeriana officinalis 9ml (عصاره ریشه)

Foeniculum Vulgare 9ml (عصاره میوه)

Salix alba 6ml (عصاره پوست ساقه)

Melissa officinalis 6ml (عصاره برگ)

Valeriana officinalis یا سنبل الطیب (علف گریه)، گیاهی است از خانواده والریاناسه. ریزوم، ساقه‌های خرنده و ریشه را در دمای زیر ۴۰°C خشک کرده، مواد مؤثر را با الکل حدود ۶۰ درصد استخراج می‌کنند. به این طریق حدود ۱۵ درصد مواد استخراج می‌شوند. حاصل استخراج حدود ۱ تا ۵/۰ درصد روغن فرار دارد (۹)، که شامل والپوتریات‌ها، الکل، اوژنول، ترپین‌ها، فلاونوئیدها، تاننها و الکالوئیدها (۹، ۱۰) است:

Foeniculum Vulgare یا رازیانه، گیاهی است از خانواده چتریان. میوه آن دارای کمی ماده قندی، ۴ تا ۶ درصد موسیلاژ و ۲ تا ۴ درصد روغن فرار است (۹). اجزای اصلی روغن فرار، شامل اترهای فنلی (مثل: ترانس آنتول) و کتونی به نام فنکون، و اجزای فرعی آن شامل هیدروکربن‌های مونوترپنی است. میوه حاوی فلاونوئیدها و کومارین‌ها نیز می‌باشد (۹، ۱۰). در طب قدیم از رازیانه چنین یاد شده است "ادرالابول آردومثانه را پاک می‌کند و معده را از بلغم بشوید" (۳). امروزه از آن به عنوان بادشکن و مطبوع‌کننده استفاده می‌شود (۱۱).

Salix alba یا درخت بید، درختی است از خانواده بید. پوست ساقه دارای گلیکوزیدهای فنولیک، تاننها، مومارین‌ها و فلاونوئیدهاست، کا سالیسین آن در اثر متابولیسم به سالیسیک اسید تبدیل می‌شود (۱۰). پوست اثر ضد التهاب، ضد روماتیسم و ضد تب دارد (۹). در طب قدیم، از برگ‌های آن به صورت موضعی برای درمان سردرد استفاده می‌شده است (۲). امروزه در درمان بیماری‌های روماتیسمی، نقرس، انواع درد و مسمومیت‌های غذایی به کار می‌رود (۱۱) به عنوان ضد عرق، ضد عفونی‌کننده و ضد التهاب مجاری تنفسی نیز کاربرد دارد (۱۲).

Melissa officinalis یا بادرنجبویه، گیاهی است از خانواده نعناعیان. برگ آن دارای یک ماده تلخ، تانن، کامفر، قندهای مختلف، مواد رزینی و پکتینی، فلاونوئیدها و پلی فتل‌ها و ۱/۰ تا ۲۵/۰ درصد روغن فرار است (۱۰). در طب قدیم از

آماري "اختلاف نسبت در دو جامعه" (Z-test) به صورت دو دامنه با گروههای شاهد منفی و اثر حلال مقایسه شدند.

دارای ناهنجاریهای فوق الذکر و نیز متافازهای با ۹۲ کروموزوم شمارش شدند.

نتایج:

ابتدا چهار غلظت ۰/۱، ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد (حجم به حجم) از دارو به لئوسیت‌های کشت داده شده یک فرد اضافه گردید. شاهد مثبت و اثر حلال به ترتیب عبارتند از: $25 \mu\text{mol}$ هیدروکینون و یک درصد الکل. شاهد مثبت اختلاف آماری معنی داری با شاهد منفی به نمایش می‌گذارد در حالیکه اتانول باعث افزایش ناهنجاریهای کروموزومی نمی‌گردد (جدول ۱).

روش آماری: آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند. نسبت سلولهای دارای ناهنجاری به ازاء اضافه نمودن مقادیر مختلف دارو محاسبه گردید. در آزمایش، از شاهد منفی (آب مقطر) و شاهد مثبت (هیدروکینون) نیز استفاده شد. به منظور بررسی اثر حلال و با توجه به اینکه حداکثر غلظت مورد استفاده دارو یک درصد بود (با توجه به حداکثر مقدار الکل در عصاره)، در آزمایشی جداگانه ۱ درصد الکل اتیلیک به محیط کشت اضافه گردید. اطلاعات بدست آمده، از طریق آزمون

جدول شماره ۱: ناهنجاریهای ایجاد شده در لئوسیت‌های کشت داده شده خون محیطی پس از مواجهه با غلظت‌های مختلف

آنتی میگرن

Z-Value *	درصد ناهنجاری	نوع و تعداد ناهنجاری			تعداد متافاز	
		شکست	دی سانتریک	پلی بلوئیدی		
---	۰/۵	۱	۰	۲	۶۰۱	شاهد منفی
۴/۵۸	۵/۲۸	۴	۷	۱	۲۲۹	شاهد مثبت
۰/۱۱	۰/۵۷	۱	۰	۰	۱۷۶	اتانول
						آنتی میگرن
۰/۸	۱/۰۲	۲	۰	۰	۱۹۶	۰/۱ درصد
۳/۹۱	۶/۱۵	۴	۷	۱	۲۹۵	۰/۲ درصد
---	---	۰	۰	۰	**۴۴	۰/۵ درصد
---	---	۰	۰	۰	**۱	۱ درصد

* مقایسه‌ها با شاهد منفی صورت پذیرفته است.

** تعداد سلولها و متافازها بسیار اندک بودند.

درصد از دارو به محیط کشت لئوسیت‌های ۵ فرد سالم بالغ است. همانطوریکه در جدول ۲ نشان داده شده است هیدروکینون در تمامی موارد باعث افزایش فراوانی متافازهای دارای ناهنجاری در مقایسه با شاهد منفی می‌گردد، در حالیکه اتانول تأثیر معنی داری ندارد. با توجه به اینکه اتانول یک درصد باعث افزایش ناهنجاری نمی‌گردد، می‌توان اثر مشاهده شده را به مواد مؤثره موجود در عصاره مورد استفاده نسبت داد. اضافه نمودن دارو نیز باعث القاء ناهنجاریهای کروموزومی به میزان ۲/۷۶ درصد تا ۶/۱۵ درصد (با میانگین ۳/۷۵ درصد) می‌گردد که از نظر آماری با شاهد منفی و اتانول یک درصد تفاوت آماری معنی داری را نشان می‌دهد.

استفاده از دارو به میزان ۰/۱ درصد نیز، اگرچه همراه با افزایش درصد ناهنجاری است، ولی از نظر آماری این افزایش معنی دار نیست. داروی آنتی میگرن در غلظت ۰/۲ درصد، با ایجاد ۶/۱۵ درصد ناهنجاری در متافازهای بررسی شده، افزایش قابل ملاحظه معنی داری را نشان می‌دهد و در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ درصد، با وجود شمارش‌های مکرر و متعدد، تعداد سلولها و متافازها بسیار کم بودند و هیچگونه ناهنجاری در متافازهای مشاهده شده دیده نشدند. به احتمال قوی فراوانی ناهنجاری بسیار بوده و باعث مرگ سلولها گردیده است. جدول شماره ۲، نشان دهنده تأثیر اضافه نمودن ۰/۲

جدول ۲- تأثیرات سیتوژنتیکی اضافه نمودن ۰/۲ درصد آنتی میگزین بر لئوسیت‌های کشت داده شده انسانی

درصد ناهنجاری	Z-value	نوع و تعداد ناهنجاری			تعداد متافاز	فرد شماره
		پلی پلوئیدی دی سانتریک شکست				
-	۰/۵۰	۱	۰	۲	۶۰۱	شاهد منفی ^b
۴/۵۸	۵/۲۸	۴	۷	۱	۲۲۹	شاهد مثبت ^c
۰/۱۱	۰/۵۷	۱	۰	۰	۱۷۶	اتانول ^d
۳/۹۱	۶/۱۵	۴	۷	۱	۲۹۵	آنتی میگزین ^e
فرد شماره ۲						
-	۰/۶۴	۱	۱	۱	۴۶۷	شاهد منفی
۶/۰۲	۱۰/۱۰۰	۴	۲	۳	۹۰	شاهد مثبت
۰/۲۶	۰/۸۱	۱	۱	۰	۲۴۵	اتانول
۳/۱۸	۴/۰۳	۲	۶	۱	۲۳۳	آنتی میگزین
فرد شماره ۳						
-	۰/۵۸	۰	۰	۱	۱۷۲	شاهد منفی
۳/۴۰	۸/۲۶	۳	۳	۴	۱۲۱	شاهد مثبت
۰/۵۴	۱/۱۰	۰	۱	۱	۱۷۹	اتانول
۴۱/۶۳	۲/۷۶	۲	۴	۲	۲۹۰	آنتی میگزین
فرد شماره ۴						
-	۰/۳۴	۰	۰	۰	۲۸۴	شاهد منفی
۶/۸۹	۱۸/۵	۸	۰	۲	۵۴	شاهد مثبت
۰/۵۵	۰/۷۵	۰	۱	۰	۱۳۲	اتانول
۳/۳۲	۵/۱۳	۳	۲	۱	۱۱۷	آنتی میگزین
فرد شماره ۵						
-	۰/۳۴	۰	۰	۱	۲۹۳	شاهد منفی
۳/۳۳	۴/۸۵	۴	۰	۴	۱۶۵	شاهد مثبت
۰/۸۳	۰/۹۱	۱	۱	۰	۲۲۰	اتانول
۲/۶۸	۳/۵۷	۱	۰	۴	۱۴۰	آنتی میگزین
جمع						
-	۰/۴۹	۳	۱	۵	۱۸۷۱	شاهد منفی
۱۰/۰۹	۷/۴۳	۳۳	۱۲	۱۴	۶۵۹	شاهد مثبت
۱/۱۰	۰/۸۴	۳	۴	۱	۹۵۳	اتانول
۶/۵۳	۳/۷۵	۱۲	۱۹	۹	۱۰۶۵	آنتی میگزین

(a) مقایسه‌ها با شاهد منفی صورت پذیرفته است. (b) ۰/۲ درصد آب مقطر به محیط کشت اضافه شده است.

(c) $25 \mu\text{mol/l}$ هیدروکینون (d) ۱ درصد اتانول (e) ۰/۲ درصد آنتی میگزین (f) معنی دار در سطح $\alpha=0/06$

استفاده از کیفیت و کارایی لازم به منظور نشان دادن اثر کلاستوزنی، برخوردار است. نظر به اینکه گزارشی پیرامون تأثیر این فرآورده و گیاهان تشکیل دهنده آن بر روی کروموزومهای انسانی و سایر جانوران در دسترس نیست، بنابراین اثرات مشاهده شده، به عنوان اثر کلی فرآورده محسوب می شود و نمی توان به طور مشخصی آن را به گیاه یا ماده مؤثره خاصی نسبت داد.

بررسی تأثیرات سیتوژنتیکی دیگر فرآورده های گیاهان دارویی و مواد مؤثره موجود در آنها در این بخش، به منظور روشن نمودن تأثیر (یا تأثیرات) سوء آنها بر سلامتی مصرف کنندگان، در حال انجام است. با این حال یافته حاضر هشدار است در مقابل این طرز فکر که داروهای گیاهی بدون ضرر هستند و می توان از آنها به راحتی استفاده نمود. لازم است به این نکته اشاره نمود که بی خطر بودن مصرف این دارو در دوران حاملگی و غیر آن، موضوع بسیار مهمی است که باید متکی بر آزمایشات متعددی باشد که در آینده انجام خواهند پذیرفت.

سپاسگزاری

برخود لازم می دانیم که از زحمات سرکار خانم بهجت شمس و آقایان علی ذاکری، بهمن فرامرزی، حسن یوسفی نژاد و مراد روانشاد که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند، تشکر و قدردانی نماییم. این تحقیق با حمایت های مالی و معنوی دانشگاه شیراز (طرح مصوب ۵۸۷-۹۸۰-۷۶ SC) انجام پذیرفته است.

تذکر این نکته لازم است که در نمونه خونی فرد شماره ۳، تفاوت آماری معنی داری با شاهد منفی در سطح $\alpha=0/05$ مشاهده نمی شود، که این امر به علت کم بودن نسبی تعداد متافازهای شمارش شده در شاهد منفی فرد شماره ۳ (۱۷۲ متافاز) است. با این حال در صورتی که $\alpha=0/06$ در نظر گرفته شود می توان نتایج را معنی دار اعلام نمود.

بحث

در پژوهش حاضر، میانگین ضریب ناهنجاری های کروموزومی در گروه های شاهد منفی ۰/۴۹ است که با بررسیهایی که قبلاً در این زمینه انجام شده است همخوانی دارد (۱۳).

الکل از نظر ایجاد ناهنجاری کروموزومی با شاهد منفی تفاوتی ندارد. البته درباره اثر کلاستوزنی الکل نتایج متضادی گزارش شده است. براساس گزارشها غلظت ۱/۲ درصد اتانول در کشت های کوتاه مدت ۴ ساعته انواع شکست های کروموزومی را افزایش می دهد، در حالی که در غلظت ۰/۵ درصد و زمان ۷۲ ساعت، اثر کلاستوزنی ندارد (۱۴). نتایج تجزیه و تحلیل متافاز بر روی گروهی از مصرف کنندگان الکل نشان داده شده است که میزان ایجاد تبادلات کروماتیدهای خواری در این افراد تفاوت معنی داری با گروه شاهد دارد (۱۵). پژوهشهای سرطانزایی الکل نیز نتایج متناقضی را به دست می دهد (۴، ۱۱، ۱۵، ۱۶). گزارش شده است که مصرف الکل با افزایش خطر بعضی از انواع سرطان در ارتباط است و پنداشته می شود یکی از دلایل بروز تومورهای بدخیم در حفره دهانی، حلق، حنجره، مری و کبد، مصرف الکل است، علاوه بر این مدارکی مبنی بر افزایش خطر سرطان پستان در خانم هایی که الکل مصرف می کنند وجود دارد (۱۱). حال آنکه گزارشات دیگر این یافته را تأیید نمی نمایند (۴، ۱۶). به هر حال تحقیق حاضر اثر کلاستوزنی را برای الکل ثابت نمی کند. بنابراین اثرات مشاهده شده هنگام اضافه نمودن فرآورده های مورد بررسی مربوط به خود دارو و مواد موجود در آن است.

هیدروکینون ماده ای است که توانایی ایجاد جهش و اختلالات کروموزومی دارد (۱۷، ۱۸). در پژوهش حاضر تفاوت آماری معنی دار مشاهده شده بین هیدروکینون و شاهد منفی این اطمینان را به دست می دهد که روش مورد