Archive of SID

بررسی خاصیت آنتی موتاژنی فراکسیونهای عصاره گیاه نوروزک

*دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز ، دکتر علیرضا ایزدیار

*گروه میکرب شناسی دارویی دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی

دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

خواص آنتی موتاژنی (ضد جهش) ارتباط نزدیکی با خواص ضد سرطانی دارد و در این میان خواص آنتی موتاژنی در ارتباط با خواص آنتی اکسیدانت نیز مطرح است.

گیاه نوروزك به عنوان یك گیاه دارویی بومی ایران (شمال شرقی و شرق ایران) بر طبق برخی گزارشات. همانند اغلب هم خانواده های خود (*Salvia*)، دارای خواص آنتی اکسیدانت است، لذا احتمال وجود خواص آنتی موتاژنی آن بررسی می شود.

گیاه در اواسط فصل بهار از نواحی جنوبی خراسان جمع آوری، در سایه خشك، به وسیله آسیاب خرد و سپس با اتردوپترول به روش خیساندن چربی زدایی شد. عصاره گیری توسط اتانول ۸۵° صورت گرفت. سپس توسط حلالهای دی کلرومتان، n- هگزان و ایزوبوتانول با کمك استخراج مایع – مایع به ۴ فراکسیون تقسیم گردید. البته لازم به ذکر است که قبلا، عصاره گیاه ازنظر آلودگی به افلاتوکسین B_1 و حضور اسید آمینه هیستیدین با روش TLC مورد ارزیابی قرار گرفت که نتیجه آن منفی بود.

جهت انجام تست آنتی موتاژنی با روش ایمز ، ابتدا ژنوتیپ ۳ سویه باکتری سالمونلاتیفی موریوم (TA98، TA100 و TA102) با بررسی ۵ فاکتور مهم، عدم توانایی سنتز هیستیدین ،موتاسیون rfa ، موتاسیون uvrB، حضور فاکتور R و پلاسمید pAQ1 مورد تائید قرار گرفتند. سپس MIC فراکسیونهای مورد سنجش، به روش رقت لوله ای و چاهك پلیت تعیین و از هر فراکسیون ۴ غلظت مختلف که کمتر از MIC ۰/۱ آنها بود تهیه گردید و اثرات آنتی موتاژنی آنها درحضور وعدم حضور مخلوط S 9 بررسی گردید. به این ترتیب که نمونه های عصاره گیاهی موردسنجش و ماده موتاژن آن سویه خاص به همراه باکتری مربوطه به سطح پلیت حاوی آگار اضافه و برای مدت دو روز در گرمخانه ۳۷ °C قرار داده شدند. سپس تعداد پرگنه های برگشتی (ریورتانت) شمارش و با پلیت های کنترل مقایسه گردید. نتیجه مقایسه با تجزیه و تحلیل داده ها، نشان دهنده وجود خاصیت آنتی موتاژنی برای فراکسیونهای ایزوبوتانولی و آبی نسبت به انواع TA98 و TA100بود.

کلمات کلیدی: آنتی موتاژن ، ایمز، سالمونلاتیفی موریوم ، نوروزك

مقدمه

امروزه جهت بررسی موتاژنیسیته یا آنتی موتاژنیسیته مواد مختلف، روشهای متعددی در آزمایشگاهها مورداستفاده قرار می گیرد. درحال حاضر ارزانترین، سریع ترین و ساده ترین روش بررسی موتاژنیسیته مواد، تست ایمز (Ames test) با استفاده از باکتری سالمونلاتیفی موریوم است (۴).

در تستهای موتاژنی و آنتی موتاژنی به تعداد زیادی موجود زنده نیاز است که در یك سیستم باکتریایی مانند تست ایمز، این امکان برآورده می گردد (در هر پلیت در حدود 5×10^8 باکتری درمعرض ماده موتاژن قرار می گیرد). این سیستمها به دلیل سادگی و با صرفه بودن و انجام سریع، می توانند در آزمونهای غربالی سریع مقدماتی برای ارزیابی اولیه مواد شیمیایی موثر باشند (۴).

از خاصیت نیازمندی سویه ها به هیستیدین ، جهت بررسی و استناج مواد موتاژن و آنتی موتاژن در تست ایمز استفاده

www.SID.ir

Archive of SID

می گردد. در این تست مقدار کمی هیستیدین و بیوتین به محیط کشت آگار رویی اضافه می گردد. این مقدار کم هیستیدین به باکتری اجازه می دهد تا چند مرحله تکثیر یافته و یك زمینه چنی یکنواخت از باکتریهای نیازمند به هیستیدین در سطح پلیت ایجاد گردد. سپس اسید آمینه هیستیدین موجود در محیط کشت تمام شده و از این به بعد دیگر باکتریهای نیازمند به این اسید آمینه توانایی رشد ندارند و فقط باکتریهایی که دچار موتاسیون برگشتی شده اند و پرگنه های ریورتانت قابل رویت ایجاد می کنند، با شمارش آنها می توان مواد مختلف را از نظر خواص موتاژنی و آنتی موتاژنی مورد بررسی قرار داد. این مطلب اساس تست ایمز است (۱۰). جهت هرچه نزدیکتر کردن محیط برون تنی (*in vitro*) به محیط درون تنی (*in vivo*)، ناگزیر به استفاده از آنزیمهایی متابولیزان کبد موش بزرگ تحت عنوان فراکسیون S9 در یك مرحله از تست هستیم (۱۰). گیاه نوروزك با نام علمی *Salivia leriifolia* از تیره نعناع می باشد. گیاهان این تیره شامل حدود ۲۰۰ جنس و بیش از ۴۰۰۰ گونه است که اغلب بومی منطقه مدیترانه می باشند. گیاه نوروزك بومی مناطق کم ارتفاع جنوب خراسان و قسمتی از افغانستان می باشد (۱). گیاه حاوی آلکالوئید، فلاوونوئید، تانن، و ساپونین است (۳).

بین خاصیت موتاژنی و سرطانزایی و بالعکس خاصیت آنتی موتاژنی و ضدسرطانی مواد ارتباط تنگاتنگی وجود دارد که روز به روز بیشتر مورد تایید قرار می گیرد (۱۸). لذا تست ایز می تواند یك روش برون تنی (in vitro) مناسب جهت بررسی اینگونه مواد باشد.

اساس آزمایش آنتی موتاژنی همان تست ایمز و بررسی تغییرات ژنتیکی باکتری سالمونلاتیفی موریوم است. در این بررسی خواص آنتی موتاژنی گیاه نوروزك مورد نظر می باشد.

مواد و روش کار

آماده سازی عصاره گیاهی

نوروزك در اواخر اردیبهشت ماه ۷۸ از نواحی جنوبی استان خراسان جمع آوری و در سایه خشك گردید. پس از خرد شدن توسط آسیای برقی، چربی زدایی و رنگ زدایی توسط اتردوپترول انجام شد. سپس گیاه با روش خیساندن و توسط اتانول °۸۵ عصاره گیری شد. ماده حاصل توسط دستگاه تقطیر در خلا حذف حلال شد. عصاره نسبتا غلیظ حاصل در چند پلیت ریخته شد و روی بن ماری حرارت داده شد تا عصاره کاملا غلیظ به دست آمد (۱۶). این عصاره تام توسط ۳ حلال n– هگزان ، دی کلرومتان و ایزوبوتانول و توسط قیف دکانتور به چهار فراکسیون n– هگزانی ، دی کلرومتانی، ایزوبوتانولی و آبی تقسیم گردید و فراکسیونهای حاصل پس از خشك شدن در یخچال نگهداری شدند (۲).

بعد از انجام مراحل فوق عصاره های گیاهی به دست آمده ازنظر حضور اسید آمینه هیستیدین و حضور ماده افلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفتند. جهت ردیابی هیستیدین از روش کروماتوگرافی لایه نازك با کمك سلیکاژل G_{60} و فاز متحرك شامل (n– بوتانل ۶۰ : اسید استیك ۱۵ : آب مقطر ۲۵) استفاده گردید. محلول استاندارد هیستیدین ۱۰۰ µg/ml و معرف محلول نایهیدرین در استون با غلظت ۰/۵ g/۱۰۰ml بود (۱۱).

جهت ردیابی افلاتوکسین نیز از کروماتوگرافی لایه نازك استفاده شد. فاز متحرك شامل کلروفروم ۵/۵: استون ۱۲/۸ : آب مقطر ۲/۵ بود و محلول افلاتوکسین B_1 با غلظت ۱ µg/ml به عنوان محلول استاندارد درنظر گرفته شد. توسط لامپ uv (۳۶۶ نانومتر) لکه ها ملاحظه گردید (۱۳).

مراحل آماده سازی جهت تست ایمز

تهیه پلیتهای مادر (۱٤): ابتدا ۳ سویه باکتری سالمونلا (TA98 ، TA100 و TA102) دریافت شده از پروفسور ایمز تحت شرایط استریل در لوله های حاوی آبگوشت مغذی اکسوئید کشت داده شدند و سپس ۱۶ ساعت در حمام آب شیکردار قرار گرفتند (دمای °C ۳۷) . از هر کدام از سویه ها گسترش های مناسبی برروی پلیتهای مربوطه (پلیتهای آمپی سیلین برای سویه های TA98 و TA100و پلیتهای

www.SID.ir

Archive of SID

آمپی سیلین / تتراسایکلین برای سویه TA102) تهیه و این پلیتها در یخچال ۴ °C به عنوان پلیتهای مادر نگهداری شدند.

تائید ژنوتیپ سویه های باکتری (۱٤)

تائید موتاسیون rfa (با احتمال خطای بسیار پایین): از تمام سویه های کشت یك شبه این باکتریها به مقدار ۰/۱ ml به طور مجزا در شیشه های مك کارتنی که حاوی ۲ml آگار رویی مذاب بود (۴۵ °C)، ریخته شد. شیشه های مك کارتنی چند ثانیه تکان داده شدند و محتویات آن روی سطح پلیت آگار مغذی اضافه گردید. سپس تحت شرایط استریل، دیسکهای کاغذ صافی استریل در ۵ نقطه از هر پلیت گذاشته شده و روی هر کدام از آنها lit µ ۱۰ از محلول کریستال و یولت ۱mg/ml ریخته شد. پلیت ها به مدت ۱۲ ساعت در انکوباتور ۳۷° C قرار گرفت و نتایج بررسی گردید.

بررسی موتاسیون uvrB: روی پلیت هاي آگار مغذی از هر یك از سویه های باکتری کشت داده شد. سپس با کمك یك تکه مقوا نیمی از پلیت طوری پوشانده شد که نیمی از هر خط کشت را بپوشاند و نیم دیگر پلیت از فاصله ۳۰ سانتی متری به مدت ۸ تا ۱۰ ثانیه تحت اثر لامپ uv با طول موج کوتاه قرار گرفت. سپس پلیت ها تحت دمای ۳۷° C به مدت ۱۲ ساعت انکوبه شدند و نتایج بررسی گردید.

سویه های واجد فاکتور R: از کشت یك شبه تازه هر سویه گسترش مناسبی بر سطح پلیت آمپی سیلین تهیه گردید و پلیت های حاصل به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷° C انکوبه شدند. رشد هر سویه باکتری در پلیت های آمپی سیلین موید حضور فاکتور R در آن است. جهت بررسی پلاسمید pAQ1 یا مقاومت به تتراسایکلین سویه باکتری TA102 درمحیط کشت آمپی سیلین / تتراسایکلین کشت داده شد و برای مدت ۱۲ ساعت در ۳۷° C قرار گرفت.

سنجش سمیت نمونه ها (۱٤) : جهت تعیین MIC نمونه ها از دو روش رقت لوله ای برای نمونه های مائی و محلول در آب (عصاره آبی یا ایزوبوتانولی) و روش چاهك – پلیت جهت نمونه های غیرمائی و نامحلول در آب (دی کلرومتانی یا n – هگزانی) استفاده می شود. در روش رقت لوله ای از فراکسیون مائی نوروزك استفاده شد. بدین ترتیب که ۹ لوله آزمایش دردار استریل برداشته شد و در شش لوله به ترتیب شش غلظت مختلف از عصاره گیاه تهیه گردید. غلظت ها عبارت بودند از۰/۶۲۵، ۱/۲۵ ، ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰ (ml محیط کشت/ mg عصاره خشك). محیط کشت مورد استفاده محیط کشت آبگوشت مغذی اکسوئید بود. از سه لوله دیگر، دو لوله به عنوان کنترل منفی و یك لوله دیگر که عصاره گیاهی ندارد به عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته می شوند. به شش لوله اولیه که حاوی شش غلظت مختلف از عصاره گیاهی بود و لوله کنترل مثبت، ۰/۱ml از کشت یك شبه سویه باکتری خاص (مثلا TA98) اضافه گردید. لوله های فوق به مدت ۱۶ ساعت تحت شیکر بن ماری ۳۷° C قرار گرفتند و پس از این مدت کدورت ایجاد شده ، بررسی گردید. کمترین غلظت مربوط به لوله ای که فاقد کدورت قابل مشاهده بود، به عنوان MIC، یا کمترین غلظت مهار رشد میکروبی درنظر گرفته شد.

در مورد عصاره دی کلرومتانی گیاه از روش چاهك- پلیت استفاده گردید. در ارلن حاوی محیط کشت آگار مغذی با درجه حرارت حدود ۴۵° C به ازای هر ۱۰۰ میلی لیتر، یك میلی لیتر از کشت یك شبه باکتری که غلظتی حدود ۲×۱۰^{۸} cfu/ml داشت اضافه و محتویات ارلن در پلیت ها تخلیه گردید. این عمل در ۳ ارلن مجزا برای هر سویه باکتری انجام شد. پس از سرد شدن پلیت ها، با کمك قسمت انتهایی یك پیپت پاستور استریل، در داخل پلیت های فوق چاهك هایی ایجاد شد. درهریك از چاهك ها یك غلظت خاص از عصاره موردنظر قرار داده شدند. در یك چاهك اضافی در هر پلیت به عنوان کنترل منفی فقط حلال عصاره اضافه شد. در هر پلیت غلظتهای ۰/۶۲۵، ۱/۲۵، ۲/۵، ۵، ۱۰ میلی گرم عصاره خشك بر میلی لیتر و به عنوان کنترل منفی حلال عصاره، به مقدار ۵۰ میکرولیتر قرار داده شد. پس از قرار گرفتن به مدت ۲۴

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت در انکوباتور، نتایج با اندازه گیری و مشاهده هاله مهار رشد بررسی گردید.

تهیه آنزیمهای القایی کبد موش بزرگ (١٤): بـه یـك مـوش بزرگ نر با وزن تقریبی ۲۵۰g به مدت ۵ روز، هـر روز بـه میزان تقریبی ۱۰۰ mg/kg از آمپول فنوباربیتـال بـه صـورت مخلوط با غذا، خورانده شد. ۱۲ ساعت قبـل از کشـتن حیـوان، غذا بجز آب آشامیدنی قطع گردید. صبح روز ششـم مـوش بـا ضربه گردنی کشته شد. سپس تحت شرایط کاملا استریل، کبـد موش جـدا، توزیـن و در محلـول سـرد و اسـتریل KCl ۰/۱۵ مولار شستشو داده شد. آنگاه کبد موش توسط پنـس و قیچـی کاملا تکه تکه شد و در هاون خـرد و هـموژن گردیـد (تـمامی اعمال فوق در بستر یخ صورت گرفت). سپس کبد هموژن شده در دستگاه سانتریفوژ با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. قسمت رویی لوله های سانتریفوژ (فراکسیون S9) به لوله های کرایوتیوپ استریل منتقل گردید.

از فراکسیون S9 جهت تهیه مخلوط S9 استفاده می گـردد. ایـن مخلـوط بـاید بـه صـورت تـازه تهیـه گـردد. مخلـوط S9 استاندارد شامل ۸ میلی مـول کلریـد منـیزیم، ۲۳ میلـی مـول کلرید پتاسیم ،۵ میلی مول گلوکز -۶- فسفات، ۴ میلـی مـول NADP، ۱۰۰ میلی مول بافر فسفات سدیم بـا pH= ۷/۴ و S9 با غلظت ۰/۰۴ میلی لیتر، در هر میلی لیتر از مخلـوط S9 می باشد.

آزمایش ضدجهش زایی (١٤): دراین آزمایش نمونه مورد نظر (عصاره گیاهی) به همراه یك سویه باکتری ویك عامل جهش زا در آگار رویی مخلوط گردید و سپس ایـن مخلـوط روی سـطح پلیت گلوکز می نیمم آگار (MGA) پخش شد. کنـترل مثبـت و منفی نیز برای هر آزمایش درنظر گرفته شد. این آزمایش بـه دو شـکل (در حضـور S9 و عـدم حضـور S9) صـورت می گرفت.

آزمایش ضدجهش زایی = سویه باکتری + موتاژن + عصاره گیاهی. (آنتی موتاژنی)

کنترل منفی = سویه باکتری + موتاژن + حلال عصاره گیاهی.

کنترل مثبت= سویه باکتری + موتاژن + آنتی موتاژن مربوطه + حلال عصاره گیاهی

مواد موتاژن مورداستفاده شامل: NPD (4- Nitro – O- Phenylendiamine) با غلظت ۲۰μg/ml (اختصاصی برای سویه TA98)، سدیم آزید با غلظت ۱/۵ μg/ml (اختصاصی برای سویه TA100) ، میتومایسین C با غلظـت ۰/۵ μg/ml (اختصاصی سویه TA102) بود.

آزمایش در غیاب مخلوط S9: پلیت های MGA به مدت یـك ساعت در گرمخانه ۳۷°C قرار گرفتند تا جهت انجام آزمـایش از دمای مناسبی برخوردار باشند.

یك روز قبل از انجام آزمایش اصلی، سه سویه باکتری بـه طور جداگانه در محیط کشت آبگوشتی کشت داده شدند تـا در مـدت ۱۲ الی ۱۶ سـاعت بـه غلظـت $۱-۲ \times ۱۰^۹$ cfu/ml برسـند. بـه ازای هـر ۱۰ml آگـار رویـی ml ۱ از محلـول هیستیدین/بیوتین به آن اضافه گردید و در دمایی درحدود ۴۰ تا ۴۵ درجه نگهداری شد.

ابتدا از نمونه های موردنظر ۴ سری غلظت بـا مقـادیر ۰/۱ تا ۰/۰۱ MIC تهیه شد. دریـك ویـال اسـتریل ۲ میلـی لیـتر آگار رویی حاوی هیستیدین/ بیوتـین ریختـه شـد و بلافاصلـه ۰/۱ میلی لیتر از کشت یك شـبه سـویه بـاکتری موردنظـر و سپس ۰/۱ml از عصاره گیاهی بـا غلظـت خـاص بـه همـراه ml ۰/۱ از موتاژن مربوط به آن اضافه گردید. ایـن مجموعـه که حـرارت حـدود ۴۵° C را داشـت و درحـالت مـذاب بـود برروی سطح پلیت MGA ریخته شد و با حرکـات چرخشـی به طور یکنواخت پخش گردید. برای هـر سـویه بـاکتری یـك کنترل مثبت و یك کنترل منفی نیز درنظـر گرفتـه شـد. سـپس پلیت هـا در انکوبـاتور ۳۷°C بـه مـدت ۴۸ سـاعت انکوبـه گردید.

آزمایش درحضور مخلوط S9: در لوله های شیشـه ای کـوچـك دردار استریل، ml ۰/۵ از مخلوط S9 تازه تهیه شده، ml ۰/۱ کشت یك شبه سویه باکتری موردنظر، ml ۰/۱ محلـول نمونـه موردآزمـایش (محلـول عصـاره گیـاهی) و ml ۰/۱ موتـاژن مربوط به هر سویه خاص اضافه گردید. لوله های کنترل منفـی شامل مخلوط S9 ، میکروب ، موتاژن و حلال عصاره به مقادیر

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۵ml، ۰/۱، ۰/۱ و ۰/۱ لوله های کنترل مثبت شامل میکروب و حلال نمونه بودند. این لوله ها در شیکربن ماری به مدت ۲۰ دقیقه تحت حرارت ۳۷°C و سپس ۳۰ دقیقه تحت حرارت ۳۰°C قرار گرفتند. در مرحله به هر یک از لوله ها ۲ml آگار رویی حاوی بیوتین / هیستیدین اضافه گردید و این مجموعه در سطح پلیت های MGA پخش گردید. پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شدند و نتایج بررسی گردید.

نتایج

بررسی حضور هیستیدین در عصاره گیاهی

پس از ظهور لکه های اسید آمینه مربوطه (استاندارد و نمونه ها) برروی پلیت ها و مقایسه Rf هیستیدین با نمونه ها (Rf_{His} = 0.22) ، مشخص شد در هیچ یک از نمونه ها هیستیدین قابل ردیابی با روش TLC وجود ندارد.

ردیابی افلاتوکسین در گیاه

پس از قراردادن پلیت های TLC در زیر اشعه uv ، باتوجه به اینکه افلاتوکسین درطول موج ۳۶۶ nm در زیر لامپ uv فلورسانس آبی دارد، در نمونه گیاهی هیچ اثری از افلاتوکسین دیده نشد.

تایید ژنوتیپ سویه های باکتری

نیازمندی به هیستیدین : تمام سویه ها در سطح محیط کشت بخوبی رشد کرده بودند در حالیکه در پلیت های فاقد هیستیدین تعداد پرگنه های ریورتانت درحد مجاز در هر پلیت برای هر سویه بود (۳۲۰-۲۴۰) TA102 ، (۲۰۰-۱۲۰) TA100 ، (۵۰-۳۰) TA98 : (S9-) . لذا تمامی سویه ها جهت رشد نیاز به هیستیدین دارند.

بررسی موتاسیون rfa : هاله عدم رشد در اطراف تمامی دیسکهای حاوی کریستال ویولت تشکیل و اندازه متوسط قطر هاله درحدود ۱۴ میلی متر بود. لذا مشخص می شود کریستال ویوله با اینکه ملکول بزرگی است اما به دلیل وجود موتاسیون rfa در سلول، قادر به نفوذ در سلول باکتری بوده است و از این طریق باعث مرگ سلول باکتری شده است.

بررسی موتاسیون uvrB : هر ۳ سویه باکتری مورد مطالعه در قسمتی از پلیت که تحت تاثیر اشعه uv قرار نگرفته بود رشد کافی داشتند، در صورتی که در قسمت دیگر پلیت که تحت اثر قرار گرفته بود دو سویه TA98 و TA100 هیچگونه رشدی نداشتند و فقط سویه TA102 بود که در هر دو قسمت رشد کرده بود. لذا دو سویه TA98 و TA100 چون به اشعه uv حساس هستند حاوی موتاسیون uvrB بوده، در حالی که TA102 که نسبت به اشعه uv حساس نیست فاقد این موتاسیون می باشد.

بررسی حضور فاکتور R : بررسی حضور فاکتور R با مشاهده مقاومت به آنتی بیوتیک آمپی سیلین تائید می گردد. سه سویه باکتری مورد بررسی در محیط کشت حاوی آمپی سیلین رشد کردند و درنتیجه واجد فاکتور R می باشند.

بررسی حضور پلاسمید pAQ1 : حضور پلاسمید pAQ1 با مشاهده مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مورد بررسی قرار می گیرد. تنها سویه TA102 در پلیت های حاوی آمپی سیلین و تتراسایکلین رشد کافی و مناسب داشت.

نتایج تعیین MIC نمونه عصاره گیاهی

MIC دو عصاره آبی و دی کلرومتانی گیاه نوروزک جهت ۳ سویه باکتری TA98 و TA100 و TA102 در جدول ۲ درج شده است.

نتایج آزمایشهای ضدجهش زایی

به کمک میکروسکوپ تعداد ریورتانتها در هر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. برای هر یک از پلیتهای کنترل مثبت و منفی و هر غلظت نمونه حداقل ۱۲ پلیت درنظر گرفته شده بود. سری غلظتی نمونه ها نیز ۰/۱۲۵، ۰/۲۵ ، ۰/۵ و ۱میلی گرم عصاره خشک در پلیت بود. نتایج این بررسی ها و مشاهدات در حضور S9 و در غیاب S9 در جدول ۱ درج گردیده است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: تعداد ریورتانت های مشاهده شده ٤ عصاره گیاه نوروزک در دو حالت حضور (S9+) و عدم حضور (S9-)، در مجاورت سه سویه باکتری .

نوع فراکسیون	غلظت mg/پلیت	TA98				TA100				TA102			
		+S9		-S9		+S9		-S9		+S9		-S9	
		پلیت۲	پلیت۱	پلیت۲	پلیت۱	پلیت۲	پلیت۱	پلیت۲	پلیت۱	پلیت۲	پلیت۱	پلیت۲	پلیت۱
دی کلرومتانی	۰/۱۲۵	۱۴۵۰	۹۸۰	۱۱۰۰	۸۱۰	۳۴۰۰	۲۷۰۰	۳۱۲۰	۳۴۰۰	-	۷۱۰	۱۳۰۰	۱۷۰۰
	۰/۲۵	۱۹۲۰	۱۸۲۰	۱۲۵۰	۷۸۰	۱۹۲۰	۲۴۰۰	۲۸۹۰	۱۵۰	-	۶۲۰	۱۸۹۰	۱۶۵۰
	۰/۵	۱۳۴۰	۱۲۳۰	۱۴۳۰	۹۴۰	۲۸۰۰	۱۸۹۰	۳۲۴۰	۲۲۰۰	۲۱۰۰	۲۷۰۰	۱۸۲۰	۹۲۰
	۱	۱۲۳۰	۴۴۰	۱۲۵۰	۷۱۵	۹۴۰	۲۱۱۰	۲۷۸۰	۱۴۴۰	۴۳۰	۲۱۶۰	۱۹۵۰	۱۸۲۰
	کنترل مثبت	۵۳	۴۴	۸۶	۹۲	۱۱۱	۲۴۰	۱۱۲	۱۲۵	۸	۲۴۰	۲۳۴	۳۰۰
	کنترل منفی	۱۳۰۰	۱۷۲۰	۱۶۶۰	۱۷۰۰	۳۵۴۰	۲۸۲۰	۲۹۰۰	۲۹۹۰	۷۶۰	۱۱۲۰	۲۱۲۰	۱۸۵۰
ان- هگزانی	۰/۱۲۵	۱۲۹۰	۴۴۰	۱۸۹۰	۱۴۵۰	۲۹۰۰	۳۱۵۰	۳۸۰۰	۲۵۰۰	۸۶۰	۲۶۰۰	۱۴۸۰	۴۱۲
	۰/۲۵	۱۸۴۰	۷۰۰	۱۷۲۰	۲۴۰۰	۱۸۹۰	۹۲۱۰	۹۲۰	۷۰۱	-	۲۲۵۰	۱۹۲۰	۲۹۰۰
	۰/۵	۱۵۴۰	۸۹۰	۱۱۲۰	۴۵۰	۲۱۰۰	۳۲۰۰	۲۴۰۰	۲۵۰۰	-	۲۷۶۰	۱۵۳۰	۱۳۵۰
	۱	۱۵۵۰	۳۲۰	۳۱۴	۴۸۰	۳۲۵۰	۲۴۲۰	۲۵۴۰	۲۶۰۰	-	۲۸۳۰	۲۱۰۰	۵۲۰
	کنترل مثبت	۶۸	۲۷	۴۸	۲۹	۱۹۶	۲۱۵	۲۸۰	۱۲۷	۲۳۰	۳۸۰	۲۳۸	۱۳۰
	کنترل منفی	۱۷۴۰	۹۴۰	۱۵۴۰	۱۶۰۰	۱۸۲۰	۳۳۰۰	۳۲۰	۳۱۵۰	۲۷۲۰	۲۸۰۰	۱۸۴۰	۲۸۰۰
ایزوبوتانولی	۰/۱۲۵	۲۶۶	۳۶۸	۳۶۰	۲۵۶	۵۶۰	۴۱۵	۳۹۸	۴۱۰	۲۸۰۰	۲۱۱۰	۱۹۲۰	۲۵۲۰
	۰/۲۵	۱۸۹	۲۷۵	۳۱۰	۱۸۰	۳۴۰	۳۱۵	۳۰۳	۳۲۵	۲۴۲۰	۲۱۴۰	۷۶۰	۲۲۵۰
	۰/۵	۱۶۴	۱۸۹	۱۲۵	۱۱۴	۳۱۵	۳۰۱	۲۹۸	۳۱۰	۲۳۶۰	۱۸۹۰	۸۱۵	۲۳۰۰
	۱	۱۰۲	۱۰۵	۱۱۵	۱۱۰	۳۰۸	۲۶۱	۲۵۹	۲۷۰	۲۱۰۰	۳۱۷	۱۳۴۰	۲۷۰۰
	کنترل مثبت	۳۲	۷۸	۷۳	۴۵	۲۰۲	۱۲۸	۹۴	۱۸۵	۲۹۲	۲۴۳	۲۱۰	۲۳۵
	کنترل منفی	۱۳۴۰	۱۸۹۰	۱۸۳۰	۱۵۲۰	۳۹۰۰	۳۲۰۰	۳۴۴۰	۳۲۰۰	۲۵۴۰	۲۶۷۰	۱۸۴۰	۳۱۶۰
آبی	۰/۱۲۵	۳۲۸	۳۷۶	۳۹۳	۴۲۸	۶۹۸	۶۸۹	۷۱۰	۶۹۸	۱۴۶۰	۱۸۶۰	۲۶۰۰	۳۱۰۰
	۰/۲۵	۲۸۸	۲۹۶	۳۰۸	۳۱۵	۶۴۸	۶۵۳	۶۷۶	۶۳۰	۱۸۲۰	۱۹۴۰	۲۳۱۰	۲۹۰۰
	۰/۵	۲۵۹	۲۷۳	۲۹۸	۳۰۰	۵۳۹	۶۰۳	۵۹۸	۴۳۸	۲۴۳۰	۲۱۷	۲۲۰۰	۳۲۰۰
	۱	۲۱۸	۲۲۱	۲۳۱	۲۲۸	۵۰۳	۴۹۸	۵۷۸	۵۷۱	۱۰۲۰	۲۸۴۰	۲۵۲۰	۲۸۱۰
	کنترل مثبت	۵۴	۶۸	۸۹	۷۳	۱۳۴	۱۲۳	۲۲۰	۲۱۰	۲۶۴	۲۷۱	۲۳۴	۳۷۰
	منترل منفی	۱۸۳۰	۹۴۰	۱۶۴۰	۱۵۶۰	۳۱۰۰	۳۱۰	۳۲۴۰	۳۴۸۰	۸۹۰	۲۲۰	۲۶۳۰	۲۸۲۰

علامت منفی (-) یعنی تعداد ریورتانت های شمارش شده در پلیت ها کمتر از ۱۰ عدد بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲: MIC فراکسیونهای مختلف گیاه نوروزک برروی سه سویه باکتری

سویه میکروبی / فراکسیونها	TA98	TA100	TA102
* عصاره دی کلرومتانی	۱۵	۱۵	۱۰
عصاره آبی	۱۰	۳/۷	۵

* واحد غلظت براساس mg\ml می باشد.

تعداد ریورتانت ها نسبت به کنترل مثبت در عصاره های دی کلرومتانی ، در تمامی ۴ غلظت تهیه شده درحضور و عدم حضور S9 شدیدا افزایش داشته است (جدول ۱). درمورد عصاره ان - هگزانی نیز نتایج با افزایش شدید تعداد ریورتانت ها همراه بوده است (جدول ۱).

درمورد عصاره ایزوبوتانولی، در دو سویه TA98و TA100، حضور این عصاره توانسته است تعداد ریورتانت ها را در محدوده استاندارد نگه داشته و از رشد فراوان سویه باکتری و افزایش شدید تعداد ریورتانت ها تا حدود زیادی جلوگیری کند. اما همین عصاره اثری بر رشد شدید باکتری و افزایش قابل ملاحظه تعداد ریورتانت ها در سویه TA102 نداشته است (جدول ۱ -ایزوبوتانولی) .

مطلب فوق درمورد عصاره آبی نیز صادق است و این عصاره باعث کاهش شدید تعداد ریورتانت ها در سویه های TA98 و TA100 شده است ولی درمورد سویه TA102 بی اثر بوده است (جدول ۱ -آبی).

در هر دو مورد عصاره های ایزوبوتانولی و آبی، با افزایش غلظت عصاره، تعداد ریورتانت ها کمتر شده است (جدول ۱).

بحث و نتیجه گیری

گیاه نوروزک دارای برگهای کرکی است و لذا دیرتر از حد معمول خشک می شود. به همین منظور در طول مدت خشک شدن گیاه، اجزا گیاهی حداقل روزی دوبار زیر ورو شدند و جهت افزایش سطح تماس گیاهی، اجزا توسط آسیای برقی خرد شدند.

کلروفیل دارای خاصیت آنتی موتاژنی می باشد (۷ و ۱۷) ، لذا جهت حذف کلروفیل و سایر رنگهای گیاهی چربی زدایی با کمك اتردوپترول صورت گرفت. جهت عصاره گیری از اتانول ° ۸۵ استفاده گردید. دراین درجه الکلی ، الکل تاحدودی خاصیت ضد میکروبی داشته و هم بیشترین استخراج مواد در آن صورت می گیرد و بعلاوه اتانول نشاسته موجود در گیاه را استخراج نمی کند (۱۶).

عصاره گیری با عمل خیساندن انجام شد تا حداقل آسیب به مواد فعال گیاهی برسد. باتوجه به اینکه عصاره تام گیاهی مجموعه ای از چندین گروه فعال گیاهی است (شامل آلکالوئیدها، فلاونوئیدها، ساپونین ها و ...) که دارای ساختمانهای ملکولی و حلالیت های مختلف می باشند و همچنین سرعت متقابلی که این اجزا می توانند روی هم داشته باشند، لذا عصاره تام گیاه به ۴ فراکسیون n- هگزانی ، دی کلرومتانی، ایزوبوتانلی و آبی تقسیم شد(۲).

افلاتوکسین ها به علت خاصیت جهش زایی از منابع خطا در تست ایمز هستند لذا توسط روش TLC (۱۳ و ۵) ، عدم وجود آن در این گیاه مشخص گردید.

سویه های میکروب مورداستفاده در تست ایمز برای رشد نیاز به اسید آمینه هیستیدین دارند . لذا غلظت هیستیدین یکی از عوامل مهم می باشد. بطوری که اگر غلظت این ماده در محیط کشت سویه های مورد آزمایش از حد معینی بیشتر شود سبب رشد بسیار فراوان باکتریها شده و تعداد پرگنه های ریورتانت شدیدا افزایش می یابد که خود یك منبع مهم خطا محسوب می گردد (۱۴). اسید آمینه هیستیدین یك اسید آمینه محلول در آب محسوب می شود (۱۵)، لذا فراکسیونهای آبی و ایزوبوتانلی با کمك روش TLC مورد ارزیابی قرار گرفتند (۱۰).

درانجام این تست از ۳ سویه باکتری سالمونلاتیفی موریوم استفاده گردید که وجه تمایز آنها در نوع موتاسیونهای مختلفی است که در قسمتهایی از رشته DNA خود دارند (۱۴).

www.SID.ir

Archive of SID

TA100 دارای موتاسیون hisG46 در ژن hisG می باشد که اولین آنزیم بیوسنتز هیستیدین را کد می کند (۶). TA100 دارای فاکتور – R بوده و مواد موتاژنی را که سبب استخلاف جفت باز در یکی از جفت های G-C می شوند مشخص می کند. TA102 نیز دارای جهش در ژن hisG می باشد. TA102 ازجمله مواد موتاژنی را مشخص می کند که باعث تقاطعات عرضی می شوند (۶). TA98دارای موتاسیون $hisD_{3052}$ می باشد. این موتاسیون در ژن hisD بوده و برای آنزیم هیستیدینول دهیدروژناز کد می دهد. TA98 مواد موتاژن فریم شیفت را مشخص می کند (۱۲).

این سویه ها علاوه بر این دارای موتاسیونهای دیگر هم هستند که قدرت آنها را در ارزیابی مواد موتاژن افزایش می دهد. حضور موتاسیونrfa در تمامی سویه ها سبب نفوذ ملکولهای درشت به داخل باکتری می شود. سویه TA102 دارای موتاسیون uvrB نمی باشد، لذا در مقابل اشعه uv قادر به رشد است. تمامی سویه ها دارای فاکتور R (فاکتور مقاومت به آمپی سیلین) می باشند و سویه TA102 علاوه بر فاکتور R دارای فاکتور pAQ1 (فاکتور مقاومت به تتراسایکلین) می باشد (۱۴).

به واسطه گزارشاتی که درمورد خواص آنتی اکسیدانی گیاه نوروزك و به ویژه جنس *Salvia* در دست بود، احتمال وجود خواص آنتی موتاژنی در گیاه مورد بررسی قرار گرفت. عصاره های دی کلرومتانی و ان – هگزانی گیاه فاقد هرگونه اثرات آنتی موتاژنی برروی سویه های مختلف باکتری بوده و پیش انکوباسیون درحضور S9 نیز اثری در این مورد ندارد (جدول ۱). اما فراکسیونهای ایزوبوتانولی و آبی برروی سویه های TA98 و TA100 تاحدود زیادی آثار آنتی موتاژنی از خود نشان می دهد (جدول۱). درمورد وجود یا عدم وجود اثرات آنتی موتاژنی عصاره گیاه برروی گونه TA102 ، به علت پراکندگی اعداد به دست آمده از تعداد ریورتانت ها، نتیجه گیری مشکل است (جدول ۱). اما از آنجایی که تعداد ریورتانت های با رقم بالا، بیش از تعداد ریورتانت های با رقم پایین است و به علاوه تغییر رقم ریورتانت ها، هیچگونه تناسبی با تغییر غلظت عصاره گیاهی ندارد. شاید به توان گفت که فراکسیونهای مختلف گیاه، فاقد هرگونه اثرات آنتی موتاژنی بر روی سالمونلاتیفی موریوم TA102 می باشد زیرا بر طبق نظریه پروفسور ایمز، یك ماده وقتی دارای اثرات موتاژنی یا آنتی موتاژنی است که علاوه بر تغییر درتعداد ریورتانت ها، این تغییرات متناسب با غلظت ماده مورد نظر باشد (۱۴).

فراکسیونهای آبی و ایزوبوتانولی، به طور مشخص سبب کاهش تعداد ریورتانت ها در پلیت های مربوطه شدند و این کاهش در تعداد با افزایش غلظت عصاره تشدید شده است. باتوجه به اینکه افزودن مرحله پیش انکوباسیون در مجاورت S9 تغییر محسوسی در تعداد ریورتانت ها ایجاد نکرده است، (جدول ۱) می توان چنین نتیجه گیری کرد که مواد حاصل از متابولیزاسیون، تاثیری بر خواص آنتی موتاژنی این فراکسیونها ندارد.

در هر سری غلظتی جهت به دست آوردن درصد اثرات آنتی موتاژنی یك ماده، بهتر است نسبت میانگین تعداد ریورتانت ها در کنترل مثبت به میانگین تعداد ریورتانت در غلظتی که دارای حداکثر اثرات آنتی موتاژنی (حداقل تعداد ریورتانت) است به صورت درصد محاسبه گردد. براساس این مطلب، ماکزیمم اثرات آنتی موتاژنی فراکسیون ایزوبوتانولی عصاره گیاه نوروزك در میکروب TA98 در عدم حضور S9 برابر است با۵۶٪ =MAMI Iso-TA98 . در مورد فراکسیون ایزوبوتانولی همین عصاره در میکروب TA100 این مقدار برابر است با ۵۵٪ =MAMI Iso-TA100.

در فراکسیون آبی عصاره نوروزك ، جهت TA98 مقدار فوق برابر با ۳۱٪ و در همین فراکسیون جهت TA100 برابر با ۳۲٪ است. پارامتر دیگری که در این مورد تعریف می شود ID_{50} است که طبق تعریف برابر با غلظتی از ماده است که سبب ۵۰٪ کاهش در تعداد ریورتانت ها می شود (۹).

www.SID.ir

Archive of SID

تحقیقات زیادی برروی عصاره های گیاهی که دارای خواص آنتی موتاژنی هستند صورت گرفته و این عصاره ها ازنظر مواد متشکله مورد آنالیز و ارزیابی قرار گرفته اند. از جمله این مواد فلاوونوئیدها هستند. ازنظر ساختمانی فلاوونوئیدها به صورت C_6-C_3-C_6 هستند، یعنی دو قسمت آروماتیک که به وسیله یک زنجیره ۳ کربنی به هم متصل شده اند. براساس بررسی های انجام شده روی فلاوونوئیدها، این مواد دارای خاصیت آنتی موتاژنی بوده و این خصوصیات در انواع فلاوون ها و فلاوونولها بیشتر دیده می شود. بررسی ها نشان می دهد جهت وجود خواص آنتی موتاژنی، وجود یک گروه کربنیل در کربن شماره ۴ هسته فلاوون ضروری است. به علاوه موقعیت گروههای هیدروکسیل نیز از عوامل تعیین کننده در این امر می باشند و بطور کلی خاصیت آنتی موتاژنی این مواد به گروههای هیدروکسی فنلیک باز می گردد (۱۰). باتوجه به خاصیت آنتی موتاژنی فلاوونوئیدها و با درنظر گرفتن این نکته که یکی از مواد اصلی موجود در عصاره نوروزک، فلاوونوئیدها می باشند که در الکل و آب دارای انحلال بالایی است (۳)، و توجه به این مطلب که اصولا فلاوونوئیدها ، آنتی موتاژنهایی با خاصیت مهار نیتروزاسیون هستد (۱۰) و مهار نیتروزاسیون یکی از علل اثرات آنتی موتاژنی عصاره های طبیعی است (۸)، شاید بتوان نتیجه گیری کرد که در عصاره گیاه مورد بررسی، همان فلاوونوئیدها هستند که دارای اثرات آنتی موتاژنی می باشند. البته اثبات کامل این امر با تحقیقات بیشتر میسر است .

گفته شده سویه TA98 جهت شناسایی جهش زاهایی به کار می رود که جهش از نوع فریم شیفت ایجاد می کنند. سویه TA102 نیز جهت شناسایی آنتی موتاژنهایی به کار می رود که از ایجاد پیوند متقاطع (Cross- Linking) جلوگیری می کند (۱۲).

باتوجه به نتایج به دست آمده شاید بتوان گفت، عصاره های الکلی و آبی گیاه نوروزک قادر به مهار جهش زاهایی از نوع عوامل ایجاد کننده فریم شیفت و عوامل جهش زایی که باعث جانشین شدن بازها به جای هر یک از جفت بازهای G-C می شوند، شده است ولی برروی عوامل جهش زای ایجاد کننده پیوند متقاطع بی اثر بوده است.

تشکر و قدردانی

از همکار محترم جناب آقای دکتر محمد رمضانی که ما را در جمع آوری، شناسایی و آماده سازی عصاره گیاه یاری کرده اند صمیمانه تشکر می شود.

منابع

۱. زرگری، علی، گیاهان دارویی، جلد پنجم، دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۷۴، ۶۸-۵۹.

۲. صمصام شریعت، هادی، عصاره گیری و استخراج مواد موثره گیاهان دارویی و روشهای شناسایی و ارزشیابی آنها، جلد اول، مانی، اصفهان، ۱۳۷۱، ۳۰-۱۲.

۳. طباطبایی یزدی، فروزان، بررسی اثرات آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه نوروزک و شناسایی فیتوشیمیایی آن، دانشگاه فردوسی مشهد ، دانشکده علوم، پایان نامه جهت دریافت کارشناسی ارشد، ۱۳۷۶، ۸۶-۷۰.

۴. یزدی، ابراهیم، تغییرات جهشی در ماده ژنتیک، جلد اول، انتشارات قلم ، تهران، ۱۳۶۸، ۱۶۴- ۱۵۹و ۱۴۴-۱۰۵.

5. Ames B. N., McCann J., Yamasaki E., Methods for detecting carcingens and mutagens with Salmonella mammalian microsome mutagenicity test, Mutat. Res., 31: 347-364.
6. Barnes W., 1982, Sequence analysis of revertants of hisG46 missense mutation in Salmonella typhimurium, Environ., 4: 297.
7. Dashwood R., Yamone S., Larsen R., 1996, Study of forces of stabilizing complexes between chlorophylls and hetrocyclic amine mutagens., Environ Mol. Mutagen. Med., 27(3): 211-8.
8. De. Flora S., Cesarone C. F., 1995, Balansky R. M., et al. Chemopreventive properties and mechamisms of NAC. The experimental background, J.Cell Biochem. Suppl., 22: 33-41.
9. Endenharder R., 1993, Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds, Mutat. Res., from Medline.
10. Endenhorder R., Tang X., 1997, Inhibition of mutagenicity of 2- nitroflorene, 3- nitroflourathen and 1- nitropyrene by flavonoids, Mutat. Res. Med.
11. Fried B., Sherma J., Thin layer chromatography , Marcel Dekker Inc., New York, 1982, 230.
12. Ison K., Yourno J., 1974, Chemical carcinogens as framshift mutagens., Proc. Natl. Accd. Sci., 71: 1612, 1917.

www.SID.ir

Archive of SID

13. Mahmoud I., Alkofahi A., Abdelaziz, 1992, Mutagenic and toxic activities of several spices and some Jordanian medical plants., Int. J. Pharmacognosy, 30(2): 81-85.
14. Maron D. M., Ames B. N., 1983, Revised methods for Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215.
15. Martindale, The extra pharmacopia, 31st ed, Royal pharmaceutical society, London, 1999, 1345.
16. Nairn J. G., Solutions, emultions, suspontions and extracts, In : Gennoro A.R. (eds), Remington., 20th Ed, Mack Publishing Compang, 2000, 1251.
17. Negishi T., Rai H., 1993, Antigenotoxic activity of natural chlorophylls, Mutat. Res., 376 (1-2): 97-100.
18. Sugimura T., Sata S., Bacterial mutagenicity of natural materials, pyrolysis products and additives in food staffs and their association with genotoxic effects in mammals, In: Schnell R.C. and Miga , Development in the Science and Practice of Toxicology, Elsevier.Science Publishers, Oxford, 115-130.

www.SID.ir