Archive of SID

بررسی اثرات جهش‌زایی قطره خوراکی هایپیران

رعنا مرادیان تهرانی

بخش ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

خلاصه

گیاه گل راعی با نام علمی *Hypericum perforatum* بطور سنتی جهت درمان بسیاری از بیماریها به کار می‌رود. امروزه از این گیاه فرآورده‌ای تحت عنوان هایپیران تهیه شده است. این داروی گیاهی به شکل قطره خوراکی است و جهت تسکین دردهای میگرنی و به عنوان ضد افسردگی توصیه می‌گردد. هدف از این تحقیق بررسی اثرات جهش‌زایی این دارو بود. جهت بررسی اثرات جهش‌زایی قطره خوراکی هایپیران آزمون ایمز (Ames) به کار رفت. در این آزمون از سالمونلاتیفی موریوم استفاده شد. اوپران هیستیدین این سویه ها جهش یافته و سویه حاصل جهت رشد وابسته به هیستیدین است.

در این تحقیق از دو نوع سویه TA98 و TA100 استفاده گردید. سویه های TA98 و TA100 قادرند جهش های نقطه‌ای از نوع تغییر چهارچوب و جانشینی جفت باز را مشخص نمایند. سویه های TA98 و TA100 قادرند در حضور ماده جهش‌زا در محیط حداقل گلوکز آگار رشد نموده و ایجاد پرگنه نمایند. قطره خوراکی هایپیران در حجم‌های متفاوت ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میکرولیتر تهیه گردید و سپس در معرض سویه های TA98 و TA100 قرار گرفت. TA98 و TA100 در محیط حداقل گلوکز آگار کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت پرگنه های حاصل شمارش گردید. پرگنه های حاصل در محیط کشت حداقل شمارش شد و نسبت میانگین پرگنه های برگشتی در هر حجم به میانگین پرگنه های برگشتی کنترل محاسبه گردید. براساس ملاکهای ارزیابی میزان جهش حاصل محاسبه شد.

قطره خوراکی به کار رفته، توانست در هر دو سویه TA98 و TA100 ایجاد جهش کند و هر دو جهش نقطه‌ای تغییر چهارچوب و جانشینی جفت باز را ایجاد نماید. براساس ملاکهای ارزیابی مربوط به آزمون ایمز این قطره احتمالاً جهش‌زا می‌باشد و لازم است که آزمونهای تکمیلی دیگر جهش‌زایی نیز انجام گیرد.

کلمات کلیدی: هایپریکوم پرفوراتوم، جهش‌زایی، آزمون ایمز

مقدمه

گیاه علف چای (گل راعی) از تیره هایپریکاسه می‌باشد. از مهمترین ترکیبات شیمیایی این گیاه می‌توان از تانن، هایپرسین و فلاوونوئیدهای مختلف مانند کوئرستین، روتین، اسانسهای گیاهی و موادی مشابه آنتی‌بیوتیکها نام برد. هایپریسین یکی از ترکیبات مهم این گیاه می‌باشد، که خاصیت فوتودینامیک داشته و در برابر نور UV فعال می‌گردد(۱۴،۱۶).

عصاره این گیاه قادر است در شرایط in vitro دو نوع آنزیم آمینواکسیداز حاصل از میتوکندریهای مغز موش صحرایی را مهار نماید. مهار این آنزیمها باعث افزایش سروتونین و در نهایت افزایش انقباض مویرگها و کاهش افسردگی و میگرن می‌شود. همچنین پروآنتوسیانیدین حاصل از این گیاه می‌تواند اثر اینوتروپ مثبت برروی قلب خوکچه هندی داشته باشد. (۱، ۹). هایپریسین موجود در گیاه تیروزین کیناز فاکتور رشد اپیدرمی را مهار می نماید و به عنوان یک عامل ضد ویروس و سرطان مطرح می‌باشد (۵، ۱۲، ۱۳) در قدیم جهت درمان بسیاری از بیماریها مانند بواسیر، سیاتیک، دردهای عصبی، اختلالاتی پوستی و مو، تأخیر در قاعدگی، سل به کار می‌رفته است (۱۰، ۱۶) و امروزه نیز از این گیاه به شکلهای مختلف دارو تهیه شده و مصرف می‌گردد.

در ایران از این گیاه قطره‌ای تحت عنوان هایپیران تهیه شده است و در اکثر داروخانه‌ها در دسترس عموم می‌باشد. مصرف این قطره در موارد میگرن، سردردهای عصبی، ضعف و

www.SID.ir

Archive of SID

افسردگی توصیه شده است. مقدار مؤثر هایپریسین در این قطره ۰/۲ میلی‌گرم در هر لیتر می‌باشد و میزان مصرف دارو به مدت ۶ تا ۷ هفته توصیه شده است. بنابراین اگر فردی طبق دستور عمل کند، روزانه به طور متوسط ۱/۲ میلی‌گرم از هایپریسین را دریافت خواهد نمود (طبق بروشور دارو).

چون این دارو در جامعه مصرف زیادی دارد و تاکنون از نظر جهش‌زایی مورد بررسی قرار نگرفته است، لذا در این تحقیق جهت بررسی انتخاب گردید. از آنجایی که ارتباط بین نتایج حاصل از جهش‌زایی و سرطان زایی بسیار زیاد می‌باشد و تستهای جهش زایی در مدت کوتاهتری می‌توانند جوابگو باشند، لذا جهت پیشگویی سرطان زایی، تستهای کوتاه مدت جهش‌زایی که به تستهای STT (Short Term Test) معروف گردیده‌اند، پیشنهاد شده است. انواع تست های تشخیص جهش‌زایی شامل تست های تشخیص جهش های ژنی، تشخیص آسیب کرموزومی و تشخیص آسیب بر ترمیم DNA می‌باشد (۳، ۱۷).

یکی از مهمترین آزمونهای تشخیص جهش ژنی آزمون ایمز می‌باشد که نسبت به آزمونهای دیگر دارای مزیت هایی است که جهت بررسی جهش‌زایی نمونه فوق در این تحقیق انتخاب گردید(۹). این آزمون اولین‌بار توسط Ames B.N. طرح‌ریزی شده است. در این آزمون از سالمونلاتیفی موریوم استفاده می شود. با ایجاد جهش در اوپران هیستیدین این سویه ها، باکتری جهت رشد وابسته به هیستیدین می‌گردد. زمانی که سویه ها در معرض ترکیبات جهش‌زا قرار می‌گیرند با ایجاد جهش در اوپران هیستیدین، باکتری مذکور از حالت وابستگی به هیستیدین به حالت غیر وابسته درمی‌آید. با بررسی میزان جهش های ایجاد شده می‌توان میزان جهش‌زایی مواد را مشخص کرد. در این تحقیق از دو سویه TA98 و TA100 استفاده شد زیرا این دو سویه علاوه بر داشتن جهش در اوپران هیستیدین دارای جهش ها و پلاسمیدهای اضافی نیز می‌باشد که حساسیت سویه ها را نسبت به ترکیبات مختلف افزایش می‌دهد. این دو سویه دارای جهش های اضافی rfa , uvrB و پلاسمید pKM101 می‌باشند (۲، ۸).

مواد و روش کار

مواد لازم: سویه های باکتریایی TA98 و TA100 از آقای ایمز که سازماندهی این نوع گونه‌ها را به عهده داشتند، دریافت گردید. D- بیوتین، L- هیستیدین، KH_2PO_4، آگارآگار و سایر ترکیبات شیمیایی مورد نیاز از کارخانه Merck آلمان تهیه گردید.

تهیه محیط کشت حداقل گلوکز آگار: این محیط کشت جهت بررسی جهش‌زایی مواد به کار می رود. برای تهیه آن ۱۵ گرم آگارآگار با ۵۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۰۲ درصد گلوکز و ۲۰ میلی‌لیتر مخلوط نمکی و گل بونر در ۹۳۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حل و سپس استریل گردیده و در پلیت‌های کشت میکروبی تقسیم شد.

تهیه محیط کشت **Master**: این محیط کشت جهت نگهداری موقت سویه ها تهیه می‌شود. جهت تهیه یک لیتر آن ۸ گرم نوترینت براس، ۵ گرم کلرید سدیم، ۱۵ گرم آگارآگار وزن نموده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر حرارت استریل و سپس در پلیت‌های مخصوص تقسیم گردید.

تهیه **Top Agar**: این محیط کشت جهت یکنواخت کردن سویه ها و پخش شدن یکدست نمونه برروی محیط کشت حداقل تهیه می‌شود. با حل کردن آگارآگار و کلرور سدیم به نسبت ۰/۶ درصد و آب دو بار تقطیر ساخته شد.

تهیه محیط کشت نوترینت براس: این محیط جهت یکنواخت شدن و تقویت سویه ها به کار می‌رود. ۰/۸ گرم نوترینت براس با ۰/۵ گرم کلرور سدیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل گردیده و استریل شد.

تهیه قطره خوراکی هایپیران: این قطره از داروخانه‌های سطح شهر تهیه شد.

تهیه قطره خوراکی هایپیران با حلال DMSO: ابتدا حلال قطره را با قرار دادن قطره در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد به

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ۴۸ ساعت تبخیر نموده و سپس هم حجم حلال خارج شده، DMSO (حلال کنترل شده) اضافه کرده و برروی تکان دهنده قرار داده تا کاملاً یکنواخت گردد.

روش کار

ابتدا در شرایط کاملا استریل در زیر هود سویه های باکتریایی را داخل لوله‌های حاوی ۵ میلی‌لیتر نوترینت براس تلقیح نموده و به مدت ۱۲ ساعت در شرایط ۳۷ درجه سانتیگراد برروی تکان دهنده انکوبیت شد. در این مدت سویه ها یکنواخت و تقویت شدند. پلیت‌های حاوی محیط حداقل ۲ ساعت قبل از شروع آزمایش در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا گرم شوند. سپس لوله‌های حاوی Top Agar برروی گرم کننده قرار داده شد. دمای Top Agar باید به ۴۵ درجه سانتیگراد برسد. لوله‌های حاوی Top Agar به صورت دسته های سه‌تایی علامت‌گذاری شد. برای هر غلظت یا حجم سه لوله در نظر گرفته شد. برای کنترل آلودگی نمونه و همچنین جهش های خودبخودی نیز باید لوله‌هایی را در نظر گرفت. هرسه نمونه مربوط به یك حجم یا غلظت در داخل لوله‌های Top Agar ریخته شده و برروی تکان دهنده قرار گرفت تا کاملاً یکنواخت گردد. پس از اضافه کردن نمونه‌های مورد آزمون در حجم‌های مختلف به هر لوله ۰/۱ میلی‌لیتر از سویه رقیق شده نوترینت براس اضافه و به سرعت یکنواخت گردیده و در داخل پلیت‌های حداقل گلوکز آگار انتقال داده شد. نمونه‌ها باید روی سطح پلیت کاملاً یکنواخت پخش شود. پلیت‌ها پس از خشك شدن برگردانده شده و در شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت انکوبیت می‌گردد. پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت پرگنه های ایجاد شده برروی پلیت‌ها شمارش می‌شود.

ملاکهای ارزیابی و محاسبات آماری

در این تحقیق جهت آنالیز داده‌ها، ابتدا میانگین تعداد پرگنه های برگشتی مربوط به هر حجم یا غلظت به کار رفته نسبت به میانگین تعداد پرگنه های برگشتی پلیت‌های کنترل محاسبه شد. با توجه به انواع سویه های به کار رفته در آزمون، در صورتی که نسبت به دست آمده در دامنه صفر یا یك قرار گیرد، ماده مورد نظر با مقدار به کار رفته سمی محسوب می‌گردد و در صورتی که این نسبت در دامنه ۱/۷۵-۱ باشد، بی‌اثر محسوب شده و در صورتی که بیشتر از ۲ باشد، جهش‌زا در نظر گرفته می‌شود (۱۵).

نتایج

وجود ژنوتیپ گونه‌های باکتریائی

جهت بررسی وجود بعضی از جهش ها و پلاسمیدها در ژنوم دو سویه باکتریایی TA98 و TA100 در ابتدا و در فواصل بین انجام آزمونها، آزمایشهایی صورت گرفت. این دو سویه به دلیل داشتن جهش های uvrB و rfa و پلاسمید pKM101 علاوه بر جهش در اوپران هیستیدین نسبت به نور UV و کریستال ویوله بسیار حساس بوده و نسبت به آمپی‌سیلین مقاوم می‌باشد. این دو سویه در محیط کشت حداقل گلوکز آگار در عدم حضور هیستیدین نیز قابل رشد و تکثیر نبوده، ولی در محیط Master در حضور هیستیدین به خوبی رشد می‌کنند.

جهش‌زایی نمونه‌های مورد آزمون

نتایج حاصل از بررسی اثرات جهش‌زایی قطره خوراکی هایپیران با دو سویه TA98 و TA100 نشان می‌دهد که با افزایش حجم نمونه از ۱۰ میکرولیتر تا ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA98 و ۲۵۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA100 در یك دامنه مشخص تعداد پرگنه های برگشتی نسبی افزایش می‌یابد و ماکزیمم اثر در حجم ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA98 و در حجم ۲۵۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA100 نمایان است. اثرات سیتوتوکسیسیتی در حجم بیش از ۱۰۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA98 و در حجم بیش از ۲۵۰ میکرولیتر با استفاده از TA100 به تدریج ظاهر می‌گردد. در بررسی اثر جهش‌زایی قطره خوراکی هایپیران با حلال DMSO نیز با افزایش حجم نمونه از ۱۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA98 و ۲۵۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA100 نسبت پرگنه های برگشتی به

www.SID.ir

Archive of SID

کنترل حلال نیز افزایش می‌یابد و ماکزیمم اثر در حجم ۵۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA98 و در حجم ۲۵۰ میکرولیتر با استفاده از سویه TA100 می‌باشد.

بحث

بسیاری از مواد ساخته شده توسط انسان و نیز مواد طبیعی در قارچها و گیاهان، حتی مواد تولید شده در طی فرآیند پخت و پز، می‌توانند به عنوان ترکیب های جهش‌زا در غلظتهای کمتر از حد سمی باعث تغییراتی در خواص ژنتیکی، یا غیرفعال شدن DNA موجود زنده گردند (۳). از طرق چون بسیاری از تغییرات ایجاد شده می‌تواند به نسل های بعدی نیز انتقال یابد، لزوم اهمیت توجه و بررسی این نوع ترکیبات احساس می‌شود. هدف اصلی سم‌شناسی ژنتیکی نیز تعیین و تشخیص ترکیباتی است که تحت عنوان مواد جهش‌زا می‌توانند روی محتویات DNA اثر کند (۳، ۷).

قطره خوراکی هایپیران که جهت درمان بسیاری از بیماریها از جمله میگرن، سل، شب‌ادراری، اختلالات پوستی و مو توصیه می‌گردد از گیاهی به نام علف چای تهیه می‌گردد. در این آزمون قطره خوراکی هایپیران با دو سویه باکتریایی TA98 و TA100 مجاور گردید. نتایج حاصل با توجه به ملاکهای ارزیابی نشان می‌دهد که این دارو قادر است جهش ژنی تغییر چهارچوب و جانشینی جفت باز ایجاد کند، بنابراین یك جهش‌زا محسوب می‌گردد.

علت جهش‌زا بودن این دارو با آزمون ایمز احتمالاً به دلیل وجود کوئرستین یکی از فلاوونوئیدهای موجود در گیاه علف چای می‌باشد. گزارشات به دست آمده نشان می‌دهد که این فلاوونوئید با آزمونهای متعدد جهش‌زایی مانند: CA (Chromosomal Aberration) ، دروزو و فیلاملانوگاستر و SCE (Sister Chromtid Exchange) مورد بررسی قرار گرفته شده و جهش‌زا محسوب می‌گردد(۴).

گزارش شده است که کوئرستین در شرایط هوازی و در حضور یونهای Fe^{3+} و Cu^{2+} قادر است H_2O_2 تولید نماید که این H_2O_2 حاصل می‌تواند در DNA ایجاد شکاف کند. همچنین این فلاوونوئید در حضور گلوتاتیون و دی سولفیدها به عنوان یك جهش‌زای بسیار قوی عمل می‌کند. از طرق کوئرستین به عنوان یك آنتی‌اکسیدان قوی می‌تواند فعالیت رادیکال آزاد را مهار کرده و مانع اتصال α- بنزوپیرن به DNA گردد (۱۰، ۱۸).

این فلاوونوئید قادر است در شرایط متفاوت از نظر جهش‌زایی نقش های متفاوتی را داشته باشد. بنابراین پیشنهاد می‌گردد این دارو با آزمونهای جهش‌زایی دیگر نیز مورد بررسی قرار گیرد تا بتوان با دلایل مستحکم‌تری روی احتمال جهش‌زا بودن این دارو بحث نمود (۶، ۱۸).

تشکر و قدردانی

نویسنده در پایان از جناب آقای دکتر ایرج جوادی و جناب آقای دکتر منصور صالحی که در تهیه این مقاله یاری کرده‌اند، کمال تشکر را دارد.

References

۱. زرگری، علی، گیاهان داروئی انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۱، ۳۲۶ - ۳۱۸.

2. Ames B. N., Durston W. E., Yamasaki E., Lee F.D., 1973, Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection, Proc. Natl. Acad Sci, USA, 70:2281-2285.
3. Anderson D., Coning D. M., Exprimental toxicology, 2nd ed, The Royal society of chemistry 1993, 243-312.
4. Carver J. H., Carrano A. V., Mac Gregor J. T., 1983, Genetic effects of the flavonols quercetin, kaempferol and galanginon chinese hamster ovarycells in vitro, Mutat. Res. 113(1): 45-60.
5. Diwu Z., lown J. M., 1993, Photosensitization with anticancer agents Free Radic. Biol. Med., 14(2): 209-15.
6. Formica J. V., Regelson W., 1995, Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids, Food Chem. Toxicol., 33: 1061-1080.
7. Leavin D. H., Hollstein M., christman M. F., Ames B. N., 1984, Detection of oxidative mutagens with a new salmonella tester strain (TA102), Methds Enzymol., 105: 249-254.
8. Maron D. M., Ames B. N., 1983, Revised methods for the salmonella mutagenicity test, Mutat. Res., 113: 173-215.
9. Obach R. S., 2000, Inhibition of human cytochrom P450 enzymes by constituents of st. John's Worts an herbal preparation used in the

www.SID.ir

Archive of SID

treatment of depression, Pharmacol. Exp. Ther., 294 (1): 88-95.
10. Okpanyi S. N., Lidzba H., Scholl B. C., Miltenburger H. G., 1990, Genotoxicity of a standardized Hypericum extract, Arzneimittel forschung, German, 40: 851-855.
11. Sengupta A., Ghosh S., Das S., 2001, Modulation of DMBA induced genotoxicity in bone marrow by quercetin during skin carcinogenesis, Exp. Clin. Cancer Res., 20(1): 131-4.
12. Takahashi I., Nakanishi S., Kobayashi E., Nakano H., Suzuki K., Tamaoki T., 1989, Hypericin and pseudohypericin specifically inhibit protein kinase: possible relation to their antiretroviral activity, Biochem. Biophys. Res. Commun., 165:1207-1212.
13. Tang J., Colacino J. M., Larsen S. H., Spitzer W., 1990, virucidal of hypericin against enveloped and non enveloped DNA and RNA viruses, Antiviral Res., 13: 313-325.
14. Vandenbogaerde A. L, Kamuhabwa A., Delaey E., Himpens B. E., Merlevede W. I., De witte P. A., 1998, Photocytotoxic effect of pseudochypericin versus hypericin, photochem. photobiol. 45 (2-3): 84-87.
15. Weinstein D. W., Lewinson T. M., 1978, A statistical treatment of the Ames mutagenicity assay, Mutat. Res., 51:433-434.
16. Wichi M., 1984, Teedrogen wissens chaftliche, Vevlag sgesellschaft mbtt, 178-180.
17. Williams P., Burson J. L., 1985, Industerial toxicology safety and health applications in the work place V. N. R., 59: 273-299.
18. Zheng W., wang S.Y., 2001, Antioxidant activity and phonolic compounds in selected herbs, Agric. Food Chem., 19, 49(11): 5165-5170.

www.SID.ir