مقاله تحقیقاتی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران
سال پنجم ● شماره ۱ ● صفحات ۱۱۱ تا ۱۱۱۴ ● بهار ۱۳۸۶

تعیین سمّیت مواد دارویی سنتتیک (مشتقات دی هیدرو پیریدین) و گیاهی عصاره آبی گلرنگ و آلکالوئیدی اسپند با استفاده از آزمون مخمر

*ناهید دارابی[۱]، دکتر مهربان فلاحتی[۲]، دکتر محمود محمودیان[۳]

چکیده

سابقه و هدف: آزمایش‌های سم شناسی حاد اولین قدم برای تعیین میزان خطر یک ترکیب شیمیایی برای انسان بوده است ؛ که در این سنجش‌ها اغلب از حیوانات آزمایشگاهی استفاده می‌شود اما امروزه بسیاری از آزمون‌هایی که بر روی حیوانات انجام می‌شد منسوخ گردیده است. لذا در این پژوهش جهت ارزیابی سمیت حاد مواد از مخمر ساکارومیسس سرویسیه (ptcc-۵۰۵۲) سمیت عصاره آبی گلرنگ ، عصاره اسپند و مشتقات دی هیدروپیریدین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی، ابتدا با استفاده از لام‌های هماسیتومتر نئو بار تعداد سلول‌ها در واحد میلی متر تعیین شد و رابطه آن با کدورت سلولی در طول موج ۵۲۵ نانومتر به صورت معادله بدست آمد در مرحله بعد سمیت مواد مورد بررسی قرار گرفت و ۵۰ درصد مهار رشد از آن محاسبه شد.

یافته‌ها: نتایج اثرات سمی وابسته به غلظت را برای عصاره آبی گلرنگ IC۵۰=۱۱۲µl/ml و عصاره اسپند IC۵۰=۴۷۶µl/ml نشان داد. سمیت مشتقات دی هیدرو پیریدین تا غلظت ۱۰۰µl/ml مورد بررسی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این آزمون با نتایج حاصل از سایر روش‌های تعیین LD۵۰ در سنجش مواد مذکور(موش کوچک و بزرگ و میگوی آب شور و کشت سلول‌های پستانداران) تا حد زیادی هماهنگ می‌باشد.

کلمات کلیدی: حیوانات آزمایشگاهی، ساکارومیسس سرویسیه، سمیت، عصاره اسپند،گلرنگ، مشتقات دی هیدروپیریدین

مقدمه

آزمایش‌های سم شناسی حاد اولین قدم برای تعیین میزان خطر یک ترکیب شیمیایی برای انسان بوده است. بهترین راه در این مورد استفاده از مناسب و بررسی یک سری آزمون‌های مرحله‌ای بر روی آن‌ها بوده است. امروزه بسیاری از آزمون‌هایی که بر روی حیوانات انجام می‌شد منسوخ گردیده است.همچنین به دلیل قیمت بالا، پیچیدگی و سختی کار نیاز به تعداد زیاد حیوان آزمایشگاهی و مشکلات نگه‌داری آن‌ها در شرایط مناسب اینگونه آزمون‌ها مشکل و محدود می‌باشد(۱) جهت رفع این مشکلات روش‌های دیگری ابداع شد که دارای نتایج مشابه باشند (۲)در انتخاب این روش‌ها به نکات زیر توجه شده است:

آزمایشات باید ارزان، قابل تکرار، ساده و بی‌خطر باشند نتایج مطلوب را بدهند(۳) در این تحقیق جهت تعیین سمیت از مخمر ساکارومیسس سرویسیه استفاده شد.(۷-۴) فرض اساسی در این روش میزان تکثیر سلول‌های مخمری بود. که به عنوان اندیکاتوری در بررسی وضعیت فیزیولوزیکی سلول در نظر گرفته می‌شود. و ارتباط خطی بین دوز ـ پاسخ که در مورد مواد مورد آزمایش وجود

۱ـ مربی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، مرکز تحقیقات ۶۶۰ ارتش(نزاجا)، گروه میکروب شناسی(*نویسنده مسؤول)
تلفن: ۰۹۱۲۵۳۳۹۲۲۰
۲ـ دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه قارچ شناسی
۳ـ استاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

www.SID.ir

دارد،(۸) یعنی اثر مواد سمی مختلف بر روی عملکرد سلول‌ها به صورت تغییر در سرعت تکثیر سلول‌ها انعکاس می‌یابد.(۹) و با توجه به ارتباط منطقی که بین تعداد در فاز لگاریتمی رشد و کدورت سلول‌ها در این مرحله وجود دارد r=۰/۹۹ به سهولت می‌توان با اندازه‌گیری کدورت سلولی سمیت مواد را تعیین کرد.

مواد و روشها

این مطالعه به روش تجربی (Experimental) و با استفاده از میکروارگانیسم ساکارومیسس سرویسیه (PTCC-۵۰۵۲) تهیه شده از مرکز بیو تکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران و با مواد عصاره آبی گلرنگ،آلکالوئیدهای اسپند، مشتقات دی هیدرو پیریدین (نیفدیپین،مبودیپین و دیبودیپین)، عصاره مخمر (merck)، پپتون (biolife) و آگار (biomenious) و تهیه محیط کشت مایع جهت نگه‌داری سلول مخمر(۱۰) به صورت "گلوکز۲٪ – عصاره مخمر ۱٪ و پپتون ۰/۵٪ "صورت گرفته است.

ابتدا جهت تعیین رابطه تبدیل کدورت نوری به تعداد سلول‌ها مراحل زیر انجام گرفت:

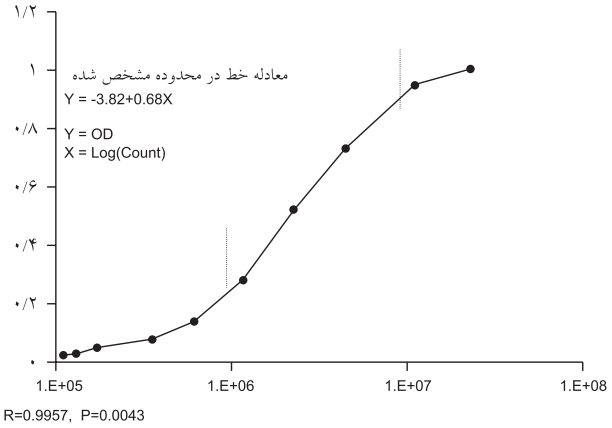
یک کلنی از کشت ۳۶ ساعته مخمر به محیط کشت مایع استریل تلقیح شد. این نمونه با تکثیر انکوباتور۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت و گرمای متوسط انکوبه شد. در زمان‌های متوالی به روش شمارش کلنی تعداد سلول‌ها در واحد میلی متر تعیین شد و رابطه آن با کدورت سلولی در طول موج ۵۲۵ نانومتر متوسط اسپکتروفتومتر تعیین گردید. در مرحله بعد رشد ساکارومیسس سرویسیه در حضور غلظت‌های مختلف از مواد مورد ازمایش در همان شرایط قبلی هر یک ساعت به مدت۱۰–۸ ساعت و بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

سرعت رشد در فاز لگاریتمی تعیین و منحنی دوز ـ پاسخ به صورت سرعت در برابر غلظت‌های مختلف رسم گردید و ۵۰٪ مهار رشد معادل IC۵۰ از این منحنی به دست آمد.

در طول بررسی سمیت هر ماده از دو نمونه کنترل منفی و مثبت استفاده شد کنترل منفی حاوی حلال و سوسپانسیون و سلول‌های مخمری بود و با توجه به اثرات سمی شناخته شده نمک‌های کادمیم از کادمیم سولفات به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.(۱۱،۱۲)

یافته‌ها

رابطه کدورت با تعداد سلول‌های مخمر در واحد میلی متر در طول موج ۵۲۵ نانو متر نمودار ۱ به دست آمد و معادله خط در محدوده این منحنی به صورت زیر تعیین گردید.



نمودار۱– منحنی رشد سلولهای Saccharomyces cervisiae

در مراحل بعدی آزمایش از این رابطه جهت تبدیل دانسیته قرائت شده توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۵ نانومتر به تعداد سلول‌ها در واحد میلی متر استفاده شد.

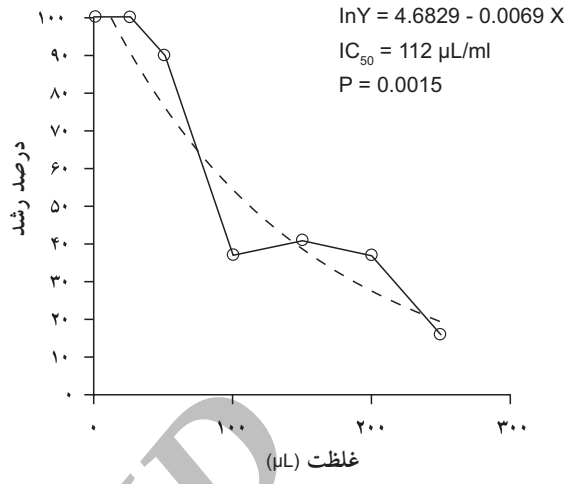
برای عصاره آبی گلرنگ ۶ غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکرو مولار از این منحنی رشد سلول مخمر در برابر زمان رسم گردید. به کمک این نمودار، درصد رشد سلول مخمر در محدوده فاز لگاریتمی در برابر غلظت تعیین و منحنی این رشد در برابر غلظت‌های فوق رسم گردید که ۵۰ درصد مهار رشد آن (IC۵۰) انتخاب شد.(نمودار ۲)

عصاره اسپند برای ۷ غلظت مختلف ۶، ۱۵، ۲۵، ۳۱، ۵۰، ۶۲، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ میکروگرم در لیتر از این ماده منحنی رشد سلول مخمر در برابر زمان رسم گردید. و ۵۰ درصد مهار رشد تعیین شد.(نمودار ۳)

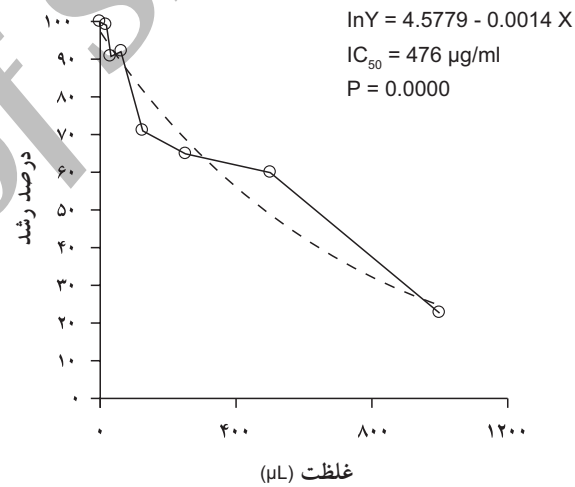
دیبودیپین و مبودیپین و نیفدیپین:

برای هر یک از موارد فوق ۶ غلظت مختلف ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرومولار منحنی رشد سلول مخمر رسم گردید. در این مورد نیز نمودار درصد سلول مخمر در برابر زمان رسم گردید و ۵۰ درصد مهار رشد برای هر یک تعیین شد. (نمودار ۶–۴)

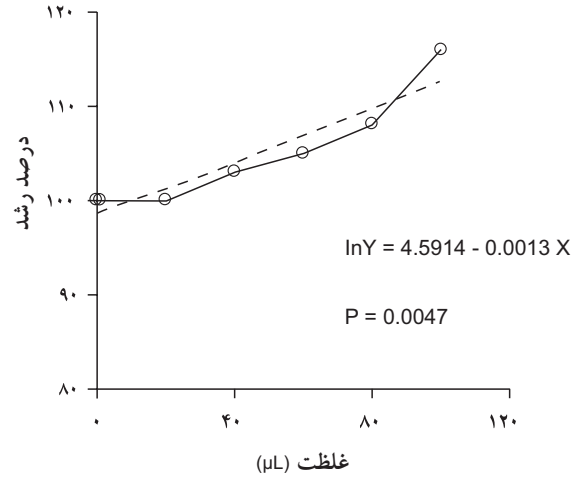
Archive of SID
www.SID.ir



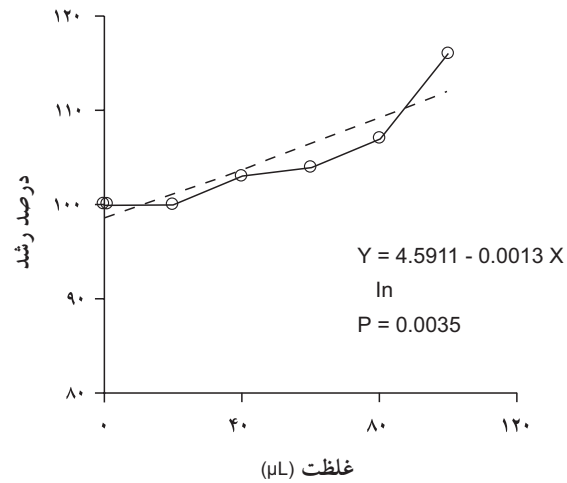
نمودار ۲- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف عصاره آبی رنگ



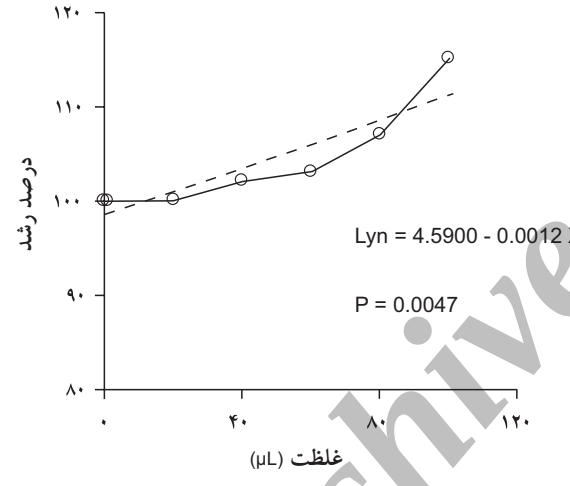
نمودار ۳- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف عصاره اسپند



نمودار ۴- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف دیبودیین



نمودار ۵- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف مبودیین



نمودار ۶- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف نیفدیپین

بحث و نتیجه‌گیری

ارزیابی اولیه سمیت حاد یک ترکیب شیمیایی در انسان میسر نیست. از طرفی افزایش روز افزون مواد شیمیایی استفاده از روش‌های سریع و ارزان در بررسی سمیت مواد ضروری به نظر می‌رسد. از جمله این روش‌ها استفاده از آزمون رشد مخمر در تعیین سمیت حاد مواد می‌باشد.(۱۳)

موادیکه سمیت آن‌ها با این روش مورد بررسی قرار گرفت شامل عصاره آبی گلرنگ و آلکالوئیدهای اسپند و مشتقات دی هیدروپیریدین بود. با توجه به مطالعات قبلی غلظت‌های صفر تا ۲۵۰ میکرومتر برای عصاره آبی گلرنگ انتخاب شد و با توجه به منحنی رشد ۵۰ درصد ۱۰۰µl/ml به دست آمد.

Archive of SID

www.SID.ir

این نتایج دارای ارزش قابل مقایسه با سایر روش‌های مشابه بخصوص سیتوتوکسیتی با استفاده از سلول‌های پستانداران دارد. در روش مذکور ۵۰ درصد مهار رشد این عصاره ۱۰۰µl/ml مشاهده شده است.(۱۴)

ماده دیگر مورد بررسی آلکالوئیدهای اسپند بود که بر اساس تحقیقات قبلی اثرات ضد قارچی و ضد میکروبی این ترکیبات به اثبات رسیده است.(۱۵)

و در این مطالعه IC۵۰ برابر ۴۷۶µg/m بدست آمد.

ترکیبات دیگر مشتقات دی هیدروپیریدین بودند که از بلوک کننده‌های کانال کلسیمی هستند(۱۶) منحنی رشد این ترکیبات هیچ‌گونه اثر سمی روی سلول‌های مخمری نشان نداد.

سرانجام در پایان بحث از مقایسه نتایج ذکر شد. در این تحقیق و نتایج حاصل از تحقیقات قبلی در این زمینه (۱۷) می‌توان نتیجه گرفت که حدود سمیت تعیین شده برای مواد با استفاده از آزمون رشد مخمر با نتایج حاصل از روش‌های دیگر (میگوی آب شور، موش و سلول‌های پستانداران و...) تا حدود زیادی هماهنگ می‌باشد و در نتیجه از آنجا که این روش مزایایی چون سادگی، ارزان بودن، قابلیت تکرار و استاندارد شدن داشته و همچنین سلول‌های یوکاریوتی مخمر ساکارومیسس سرویسیه شباهت فراوانی به سلول‌های جانوران دارد(۱۸) این روش می‌تواند به عنوان روش جایگزینی در تعیین سمیت حاد مواد مطرح شود.

Refrences

1- Cascobi, I, lochman, E. R, Roth, (1995) Effect af a heterogeneous set of exenobiotics o R NA Synthesis of yeast cells. Ecotoxicol. Enviran. saf. 30:252-258

2- Ham burger, A. W. (1991) Invitro evaluation of chemotherapeutic agents cancer. Invest. 9:683-690

3- Aqeel, A., khursheed, A., sabiha, S., siddiqui, B., sabira, B., Faizi, sh., salimuzzaman, s. (1992) study of invitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. j. Enthopharmacology. 35:289-294

۴ـ تولومیس قوام میراستاری. اصول زهر شناسی صفحه(۲۰۶و۱۹۸و۳۲و۲۸و۲۰) چاپ اول:

۵ـ میثمی، ف، ذوالفقاری، م. ا.، رسایی، ن.، (۱۳۷۴) ارزیابی سمیت حاد دارویی ضد سرطان (ABC) کتاب خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی صفحه:۱۷۳.

6- Aarons, H. D., victor rossi, G., Raymond, F., orzechowski, F., Darryl, h. (1977) Cardiovascular actions of three harmama alkaloids, harmine, harmaline and harmalol, J. pharmactical Seienees. 9:1244-1248

7- Cascorbi, I., (1991) yeast growth rate cytotoxicity test. Invitox. Protocol. 33:1-11.

8- Deacon. J. W. (1997) modern mycology. Third edition. chapter 3, pp: 61-62.

9- Reid, R. J., kauh, A., B jornti, M. (1997) Campotheein sensitivity in mediated by pleiotropic drug resistance net work in yeast. J. Biol. ehem. 18:12091-12099

۱۰ـ حسین‌زاده، ح.، رمضانی، م.، کسائیان نایینی، م.، (۱۳۷۸) ارزیابی آزمون مخمر جهت تعیین سمیت حاد مواد، مجله علوم پزشکی جلد۲. شماره ۴.

11- Friberg, l., Nordberg, G. F., vouk, V. B., Hand book on the toxicology of metals, Elsevier wewyork (1986), vol;2, pp: 131, 140.

12- Henderson, G. (1989) A comparision of the effect of chromate, molyb date and cadmium on respiration in the yeast saccharomyces cere visiae Biol. Metal. 2:83:38.

13- Campanella, L., Favero, G., Tonassett:, M. (1995) Immobilised yeast cells biosensor for total toxicity testing. Sci. Total. Environ 171:227-234

14- Nobakht. M., Fattahi, M., Hoormand, M., Milanian, I., Rahbar, N., Mahmoudian, M. (2000) A. study on the tetratogenic and cytotoxic effect of saf flower extract. J. Enthro phamacol. 73: 453:459.

15- Shapira, Z., terkel, J., Egozi, y., ~ yska, A., Friedman. (1989) Abortifa cient potential for the epigeal parts of peganum harmal. g. enthro pharmacol 27:319-329

16- Fisher, M., schnell, n., chattaway, J., Daries, p., Dixon, G., sander, D. (1997) the saccharomyces creveisiae cchi gene is invoved in alcium infulex and mating. FEBS letters. 419;259-262.

17- Bjornsti, M. a., kanb, M., Benedetti, p. (1997) yeast saccharomyces cerevisiae a model system to study the cytotoxic activity antitumor drug campothecin. Cacer chemo therapy and phracology 34:s1-ss.

18- Tiara, z., kanzawa, sh., Dohara, ch., Ishida, sh., Matsomoto, M sakiya, y. (1997) In tercalation of six B-carbolin derivatives into DNA. JPN. g. Toxicol. Environ. Health. 2:33-91

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of toxicity chemical substances (extract oihyndropyridine derivatives, saff flower and peganum harmala) By saccharomyces cerevisiae

*Darabi N; MSc[1], Falahati M; PhD[2], Mamudian M; PhD[3]

Abstract

Background: The toxicity of many chemical substances has been studied by many of living organisms used as biological indicators. Higher organisms(laboratory animals) are generally used but the response time may be lengthy. Never the less by exploiting uni cellular organisms, in particulary yeast, it is possible to reduce testing time considerably. In this study, the budding yeast, saccharomyces cerevisiae asimple non-pathogenic eukaryotic organisms, which is easy to cultivate, has been used as experimental model for assaying acute toxicity of chemical substances.

Material & Methods: As a experimental study, The first step yeast cells were cultured in broth media and correlation cell of numbers and optical density was determined in 525 nm. Then, yeast cells were cultured in the presence of various concentration of chemical substances and cell density was measured. the proliferation rate determined from the logarithmic growth phase. A dose-response curve was obtained by plotting the relative growth rate versus the chemical concentration which concentrations leading to 50% inhibition of growth(IC50) was determined.

Results: the results showed a concentration – dependent cytoxicity effect for saff flower extract (IC50=112µlml-1) and peganum harmala extract (IC50=476µgml-1). The toxicity effects of dihidropyridine derivatives was studied up to 100 µMml-1, but no cytotoxic effect was observed.

Conclusion: these results were agreement with other cytotoxic tests (i.e, rat, hamster, brin shrimp, and human cell cultures) then this procedure can be used as the first step, for assaying acute toxicity of chemical substances.

Keywords: Dihydropyridine derivatives, Harmala, Laboratory animals, Peganum, Saccharomyces cerevisiae, Saff flower, Toxicity

1- (*Corresponding Author) Instructor, Army University of Medical Sciences, Department of Microbiology, Research Center of 660 NEZAJA Tel:09125339220

2- Assistant Professor, Iran University of Medical Sciences, Department of Mycology

3- Assistant Professor, Iran University of Medical Sciences, Department of Pharmacology

Archive of SID

www.SID.ir