(مقالهٔ پژوهشی)

بررسی اثرجهش زایی عصاره ی متانولی گیاه پرسیاوشان (*Adiantum capillus – veneris*) با تست ایمز(Ames test)

فرزانه کیانی پور[1]، امیر جلالی[2*]، میثم موسوی[3]، امیر سیاهپوش[4]، احمد فرج زاده[5]

۱و۳-دانشجوی داروسازی.
۲-استادیار گروه فارماکولوژی و سم شناسی.
۴- استادیار گروه فارماکوگنوزی.
۵- دانشیار گروه میکروبیو لوژی.

۱- مرکز تحقیقات سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، ایران.
۲-گروه فارماکولوژی و سم شناسی، مرکز تحقیقات سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، ایران.
۳-دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
۴-استادیار دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، مرکز تحقیقات گیاهان داروئی و فرآورده های طبیعی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
۵- گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه جندی شاپور اهواز، ایران.

*نویسنده مسئول:
امیر جلالی؛ مر کز تحقیقات سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، ایران.
تلفن:۰۰۹۸۶۱۱۳۷۳۸۳۷۸
Email: amjalali@hotmail.com

چکیده

زمینه و هدف: گیاه پرسیاوشان(*Adiantum* capillus-veren*is*) از خانواده ی سرخس و دارای ترکیبات تری ترپنوئید است. از آنجائیکه تری ترپنوئید ها اثرات ضد تومور دارند و برروی DNA اثر می گذارند، در این تحقیق سعی شد که اثرات جهش زایی احتمالی عصاره متانولی این گیاه بااستفاده از تست ایمز بررسی شود.

روش بررسی: عصاره گیری با روش خیساندن با متانول در مدت ۴۸ ساعت انجام شد. عصاره گیاه از نظر آلودگی به آفلاتوکسینB_1 و حضور اسیدآمینه هیستیدین به روش TLC مورد ارزیابی قرار گرفت.

MIC(*minimum inhibitory concentration*) (کمترین غلظت مهار رشد میکروبی) با روش رقت لوله ای تعیین شد.برای بررسی اثرات جهش زایی، از آزمون ایمز با استفاده از سویه ی سالمونلا تیفی موریم TA 100، استفاده شد. ژنوتیپ سویه با استفاده از فاکتورهای عدم سنتز هیستیدین، حضور فاکتورR، موتاسیون rfa و موتاسیون uvrB تائید شد. دراین تحقیق از ۴ غلظت۰.۵، ۱،۵،۱و۲ میلی گرم بر میلی لیتر(غلظت های کمتر از MIC ۰,۱ پر سیاوشان) کنترل مثبت (سدیم آزید) و کنترل منفی (متانول) در حضور و عدم حضور آنزیم های کبدی استفاده شد.

یافته ها: در ۴ غلظت مورد بررسی، تغییر معنی داری در کلنی برگشتی نسبت به کنترل منفی مشاهده نشد. همچنین در حضور آنزیم های کبدی، تغییر معنی داری در تعداد کلنی ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: در تحقیق برون تنی (In vitro) اخیر، می توان چنین نتیجه گیری کرد که مصرف گیاه پر سیاوشان، احتمالا تغییری در ژن های باکتری سالمونلا تیفی موریوم سویه ی TA100 و در نهایت روی ژن های انسان ایجاد نمی کند و یا موجب تغییرات جهش زا و ژنتیکی نمی شود.

کلید واژگان: جهش زایی، تست ایمز (Ames test)، پر سیاوشان (Adiantum capillus – veneris)، سالمونلا تیفی موریوم TA_{100}

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۷/۱۸ دریافت مقاله‌ی اصلاح‌شده: ۱۳۹۱/۱۰/۲۰ اعلام قبولی: ۱۳۹۱/۱۰/۲۵

مقدمه

مکانیسم های مختلف آسیب DNA، باعث تغییراتی در ساختار DNA و ایجاد جهش می شود. اغلب تغییرات سرطانی متعاقب آسیب به DNA و ایجاد جهش حاصل می شوند. بنابراین ضروری بررسی اثرات آسیب به DNA و جهش زائی ترکیبات مختلف مورد تماس و یا مصرف توسط انسان مشخص می‌شود(۱).شناخت عوامل جهش‌زا از دو نظر اهمیت دارد. اولاً تغییرات ژنتیکی ایجاد شده اغلب مضر هستند. ثانیاً حتی جهش هایی که در سلول‌های سوماتیک ایجاد می شوند و به نسلهای بعدی منتقل نمی‌شوند، نیز برای جاندار مضر می‌باشند. همانطوریکه قبلاً تصور می‌شد، سرطان می تواند در اثر جهش در سلول‌های سوماتیک، اتفاق بیفتد.

در سال های اخیر، استفاده از گیاهان دارویی افزایش پیدا کرده است که ناشی از اعتقاد به بی خطر و موثر بودن فرآورده‌های گیاهی است(۲،۳و۴). اگرچه مصرف بسیاری از داروهای گیاهی بی خطر می باشد، اما بایستی در نظر داشت که مصرف فرآورده های گیاهی ممکن است همراه با اثرات سمی باشد. بی خطر بودن مصرف گیاه در زنان باردار، حائز اهمیت بیشتری است (۲،۴،۵و۶).

مطالعات اخیر نشان داده است که برخی از ترکیبات گیاهی مانند Safrol در گیاه *Sassafras albidum*و Cycasin در گیاهان خانواده های *Cycadaceae* و *Zamiaceae* و آلکالوییدهای پیرولیزیدین در گیاهان خانواده های گاوزبان(*Boraginaceae*)، کاسنی (*Asteraceae*) و ارکیده (*Orchidoceae*) دارای اثرات سمی ژنی با احتمال ایجاد سرطان می باشند(۶-۱۳).

پرسیاوشان با نام علمی(*Adiantum capillus–verenis*) از خانواده آدیانتاسه (*Adiantacea*) است (۱۴). محل رویش این گیاه در اروپای جنوبی ،کوههای آلپ وسواحل آتلانتیک وهمچنین شمال ایران است(۱۵). اجزاء اصلی این گیاه طب سنتی ایران شامل فلاونوئیدها، استرهای سولفات، هیدروکسی سینامیک اسید، قندها(۱۶) و انواع مختلف تری ترپنوئید ها(۱۷-۱۸) استرولها (۱۹) ،تانن (اسید تانیک و اسید گالیک)، مواد تلخ، صمغ، موسیلاژ، کوئینیک اسید، شیکیمیک اسید است (۲۱-۲۰). در طب سنتی، این گیاه به عنوان تونیک، مدر، درمان ناراحتی های تنفسی، تومور طحال، کبد و اندام‌های داخلی توصیه شده است(۱۴). اثرات ضد یرقان، هپاتیت(۲۲) ضد میکروبی(۲۴-۲۳)، آنتی اکسیدانی (۲۵)، ضد التهاب (۲۶) و ضد دیابت (۲۸-۲۷) نشان داده شده است.

این گیاه به علت داشتن فلاونوئید ها و فنول ها خاصیت ضد تومور دارد(۱۴). تری ترپنوئید ها این گیاه با مهار سیکلو اکسیژناز دارای فعالیت ضد التهابی هستند.تری ترپنوئید ها متابولیت های ثانویه پنتاسیکلیک هستند که مشتقات مختلفی دارند از جمله CEMB (cyanoenone of methyl boswellates) دارند. CEMB از قوی ترین مهار کننده های تولید NO است (باعث القای تولید اینترفرون گاما می شود) و موجب مهار سنتز DNA وفعالیت ضد تومور می شود. ازتری ترپنوئید های پنتاسیکلیک دیگر این گیاه،CDDO(-2 cyano,3,12-dioxoolean-1,9(11)-diene -28-oic acid) و مشتقات آن است که فعالیت موثری در توقف تکثیر سلولی در لوکمی های انسانی دارد(۳۴-۲۹). مشتقات مختلف تری ترپنوئیدها دارای فعالیت القایی آپوپتوز(مرگ برنامه ریزی شده سلول ها) در بسیاری از انواع رده های سلولی سرطانی از جمله لوکمی میلوژنوس(۲۹-۳۰)، استئو سارکوما (۳۲)، سرطان پوست (۳۳) و سرطان پروستات (۳۴) دارند.

از آنجائیکه در طب سنتی از برگ گیاه استفاده می شود نه فراکسیون های خاص آن، بر همین اساس در این مطالعه تصمیم گرفته شد که اثرات عصاره متانولی که دارای بیشترین ترکیبات استخراج شده می باشد، استفاده شود. بر همین اساس در پژوهش اخیر احتمال ایجاد سمیت ژنی عصاره متانولی پرسیاوشان با استفاده از تست

Ames مطالعه شد تا سلامت استفاده از این گیاه در دوزهای معمول مصرف، بررسی شود.

روش بررسی

گیاه پر سیاوشان دارای شاخه های سیاه، سخت، باریک و براق که به صورت پیوسته و چند شاخه روی زمین می خزند که طول این شاخه ها به ۷۰–۲۰ سانتی متر می رسد. شاخه های ظریفی دارد و برگ های سفت و تیره پهن و کوچکی مانند برگ‌های گشنیز، به صورت بریده بریده دارد. ساقه و گل و میوه و دانه ندارد. این گیاه به ارتفاع۳۰cm–۱۵ می روید که محل های رویش آن در مناطق خوزستان تهیه و توسط گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور تایید شد.شماره هرباریوم این گیاه A13004001/1M می باشد. باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA_{100} از گروه میکروب شناسی دانشگاه شاهد تهیه ودر محیط نوترنیت براث (Nutrient Brath)کشت و آزمایش های تأیید سوش بر روی آن انجام شد.

آزمون های تأیید سوش TA100

سویه ی باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA_{100} می بایست واجد موتاسیون rfa و موتاسیونuvrB بوده و جهت رشد نیازمند اسید آمینه ی هیستیدین و اسید آمینه بیوتین میباشد (۳۵).این موتاسیون ها به این جهت مهم هستند که در صورت اینکه باکتری فاقد آنها باشد در همه ی محیط ها رشد می کند. این سویه ی آزمایشگاهی، در یکی از ژن های اپران هیستیدین، دارای جهش بوده و برای رشد خود به هیستیدین نیاز دارد.

نیازمندی به هیستیدین

دو سری لوله ی آزمایش حاوی محیط کشت مایع LB broth استفاده شد. سری اول حاوی۰.۱ میلی گرم در میلی لیتر هیستیدین ،۰.۱ میلی گرم در میلی لیتر بیوتین و سری دوم حاوی تنها ۰.۱ میلی گرم در میلی لیتر بیوتین و فاقد هیستیدین بودند. لوله ها حاوی ۰.۲ میلی لیتر از سویه ی کشت شده برای ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجهٔ سانتی گراد قرار داده و نتایج بررسی شد(۳۵).

نیازمندی به بیوتین

دو سری لوله ی آزمایش حاوی۰,۲ میلی لیتر از سویه‌ی استفاده شد. سری اول واجد ۰.۱ میلی گرم در میلی‌لیتر هیستیدین و ۰.۱ میلی گرم در میلی لیتر بیوتین و سری دوم حاوی تنها ۰.۱ میلی‌گرم در میلی لیتر از هسیتیدین و فاقد بیوتین بودند. لوله‌ها برای ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد(۳۵).

بررسی حضور فاکتور R

از کشت یک شبه تازه سویه باکتری بر سطح پلیت آمپی سیلین، گسترش مناسبی تهیه و به مدت ۱۲ ساعت در دمای $37\ ^{\circ}C$ انکوبه شد. رشد باکتری در پلیت آمپی سیلین موید حضور فاکتور R در سویه می باشد.

بررسی موتاسیون rfa

۰.۲ میلی لیتر از سویه ی کشت شده با پیپت استریل به تعدادی پلیت منتقل شد. مقداری از محیط کشت LB agar حاوی ۰.۲ میلی گرم در میلی لیتر هیستیدین و ۰,۱میلی گرم در میلی لیتر بیوتین، به هر پلیت اضافه و تکان داده شد. پس از انجماد کامل محیط، بر روی هر کدام از دیسک های کاغذ صافی استریل، ۱۰ میکرو لیتر از محلول کریستال ویولت با غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر تزریق و پس از خشک شدن دیسک کاغذی، در ۵ نقطه از هر پلیت گذاشته شد. پلیت ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه قرار داده و هاله ی شفاف اطراف دیسک که نشانگر عدم رشد سلول ها و جهش Rfa می باشد، بررسی شد(۳۵).

بررسی موتاسیون uvrB

۰.۲ میلی لیتر از سویه ی باکتری با پیپت استریل به تعدادی پلیت منتقل شد. مقداری از محیط کشت LB agar حاوی ۰,۱ میلی گرم بر میلی لیتر هیستیدین و ۰,۱ میلی گرم بر میلی لیتر بیوتین به هر پلیت اضافه شد. پس از انعقاد کامل محیط، با یک تکه مقوا نیمی از پلیت پوشانده و نیم دیگر پلیت از فاصله ی ۳۰ سانتی متری به

مدت ۸ تا ۱۰ ثانیه تحت اثر لامپ uv با طول موج کوتاه قرار داده شد. در ادامه پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه در گرمخانه قرار دادهشد. عدم رشد در اطراف قسمت اشعه دیده، نشان دهنده ی جهش uvrB و تایید سویه ی TA100 می باشد(۳۵).

اطمینان از عدم حضور هیستیدین در عصاره با انجام کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)

۲میلی گرم عصاره خشک پر سیاوشان در ۲میلی لیتر متانول حل شد. محلول استاندارد هیستیدین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر نیز تهیه شد. با لوله ی مویین از محلول نمونه و استاندارد بر روی صفحه ی سیلیکاژل پشت آلومینیومی (۵×۲۰ سانتی متر) لکه گذاری و در تانک فاز متحرک (n–بوتانل۶۰ : اسید استیک ۱۵ : آب مقطر ۲۵) قرار داده شد. با طی۱۵ سانتی متر مسیر حلال، کروماتوگرام از تانک بیرون و پس ازخشک شدن کامل، محلول نانهیدرین در استون با غلظت ۰٫۵گرم بر ۱۰۰ میلی لیتر به عنوان معرف اسپری شد (۳۶).

تعیین MIC پرسیاوشان

با توجه به حلالیت نمونه در آب (عصاره متانولی)، از روش رقت لوله ای برای اندازه گیری MIC (کمترین غلظت مهار رشد میکروبی) استفاده شد. ۸ لوله آزمایش استریل انتخاب و در ۵ لوله به ترتیب غلظت های ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵ و۲.۵ (ml محیط کشت/mg عصاره خشک) ازعصاره گیاه تهیه شد. دو لوله دیگر به عنوان کنترل منفی و لوله فاقد عصاره گیاهی به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. محیط کشت مورد استفاده آبگوشت LB broth غنی شده با هیستیدین وبیوتین بود. به پنج لوله اول حاوی غلظت های مختلف عصاره گیاهی(۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵و۲.۵mg/ml) و کنترل مثبت، ۰٫۱ میلی لیتر از کشت یک شبه سوی باکتری TA_{100} اضافه شد. لوله های فوق به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و کمترین غلظت مربوط به لوله فاقد کدورت، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (۳۵–۳۶).

ردیابی آفلاتوکسین در عصاره گیاهی

برای ردیابی آفلاتوکسین از کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد. فاز متحرک شامل کلروفرم ۵/۵، استون ۱۲/۵، آب مقطر ۲/۵ بود و محلول آفلاتوکسینB_1 با غلظت 1µg/ml به عنوان محلول استاندارد در نظر گرفته شد. لکه ها با لامپ UV (366 nm) ملاحظه شد (۳۶).

ساخت محلول های مورد نیاز

با توجه به غلظت MIC گیاه پرسیاوشان که ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر تعیین شد، ۴ محلول با غلظت های کمتر یا مساوی ۰/۱ غلظت MIC تهیه شد (غلظت های ۰/۵ و ۱ و ۱/۵ و ۲ میلی گرم در میلی لیتر متانول).محلول سدیم آزید با غلظت ۰/۰۱ میلی گرم در میلی لیتر (کنترل مثبت) و متانول (کنترل منفی) و ۶ لوله جهت استریل شدن ،۱۵ دقیقه اتوکلاو شد. در ادامه تست یک بار بدون حضور و بار دیگر در حضور آنزیم های کبدی انجام شد (۳۵–۳۶).

انجام تست بدون حضور آنزیم های کبدی

به ۱ لیتر از LB agar۰.۰۸ گرم هیستیدین و ۰.۱۲ گرم بیوتین افزوده و اتوکلاو شد. ۱۲ عدد پلیت (از هر غلظت ۲ پلیت، ۲پلیت برای کنترل مثبت و ۲ پلیت برای کنترل منفی) آماده شد. برای هر غلظت، ابتدا ۰.۵ میلی لیتر از عصاره به پلیت اضافه و در سطح پراکنده شد. از لوله ی حاوی باکتری با ۰.۵ مک فارلند به غلظت^{8}۱۰×۱/۵ به میزان ۰.۲ میلی لیتر به پلیت اضافه و پراکنده شد.

در کنترل مثبت۰.۵ میلی لیتر سدیم آزید و در کنترل منفی ۰.۵ میلی لیتر متانول به همین ترتیب به پلیت ها (هر کدام ۲ پلیت) اضافه شد (۳۷، ۳۹). بنابراین ۱۲ پلیت به صورت وارونهبه مدت ۴۸ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ درجه قرار داده شد. برای اطمینان از صحت و دقت بررسی، مطالعه در سه روز متوالی انجام شد (۳۶پلیت). نتایج در جدول ۱ آورده شده است.

انجام تست در حضور آنزیم های کبدی

این مرحله دقیقا شبیه به انجام تست در صورت عدم حضور آنزیم های کبدی است با این تفاوت که در

مرحله‌ی اول به ۱ لیتر از LB agar بعد از افزودن ۰.۰۸ گرم هیستیدین و ۰.۱۲ گرم بیوتین،۲۰ میلی لیتر از مخلوط S۹ تازه تهیه شده اضافه شد. برای تهیه S۹ از کبد موش صحرایی(rat) استفاده شد. یک موش صحرایی نر با وزن تقریبی ۲۵۰ گرم انتخاب و به مدت ۵ روز، روزانه۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم فنوباربیتال داخل صفاقی تجویز شد. در روز ششم کبد موش جدا و با محلول سرد KCL۰/۱۵ مولار شستشو داده شد. کبد هموژن شده در دستگاه سانتریفوژ با ۷۸۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. قسمت رویی لوله های سانتریفوژ (فراکسیون S9) به لوله های استریل منتقل شد. تمام مراحل در شرایط استریل و در کنار شعله انجام شد. نتایج تست در حضور آنزیم های کبدی جدول ۲ آورده شده است (۳۵).

یافته ها

تایید ژنوتیپ سویه ی باکتری

نیازمندی به هیستیدین و بیوتین

لوله های حاوی هیستیدین و بیوتین پس از ۲۴ ساعت کاملاً کدر شدند که بیانگر رشد میکروب می باشد.درحالی که لوله های حاوی فقط هیستیدین ویا فقط بیوتین همچنان شفاف بوده و رشد میکروب در آن مشاهده نشد(شکل ۱).

نتیجه بررسی حضور فاکتور R

حضور فاکتور R با مشاهده مقاومت به آمپی سیلین تایید شد.

نتیجه بررسی موتاسیون rfa

هاله عدم رشد در اطراف تمامی دیسک های حاوی کریستال ویوله تشکیل شد.میانگین قطر هاله عدم رشد در حدود ۱۴ میلی متر اندازه گیری شد.

نتیجه بررسی موتاسیون uvrB

باکتری در قسمت تحت تاثیر اشعه uv،رشد نداشت. در حالی که در قسمت فاقد تابش پلیت رشدکافی مشاهده شد.

بررسی حضور هیستیدین در عصاره گیاهی

پس از اسپری معرف نانهیدرین، ظهور لکه ها ی مربوط به استاندارد هیستیدین و نمونه ی عصاره بر روی صفحه کروماتوگرام مشاهده شد. با مقایسهRfهیستیدین ($Rf_{His} = 0.22$) با نمونه عدم وجود هیستیدین تایید شد(شکل ۲).

تعیین MIC نمونه عصاره گیاهی

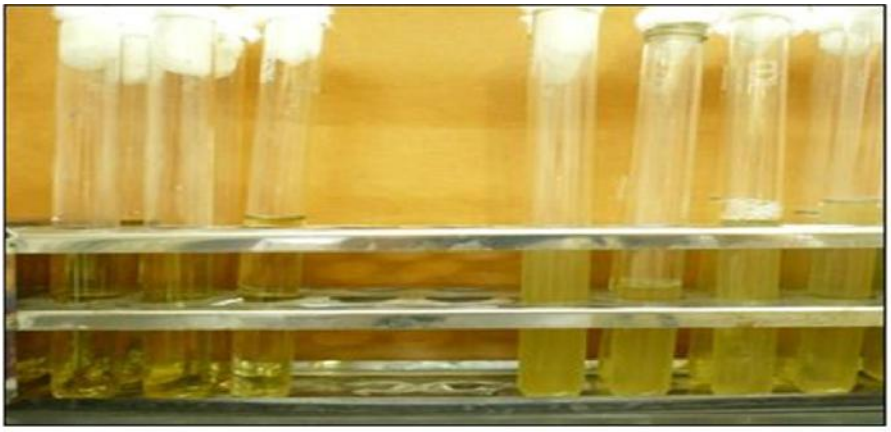
MIC عصاره متانولی گیاه پر سیاوشان برای سویه ی باکتری TA_{100} به میزان۲۰mg/ml می باشد.

ردیابی آفلاتوکسین در گیاه

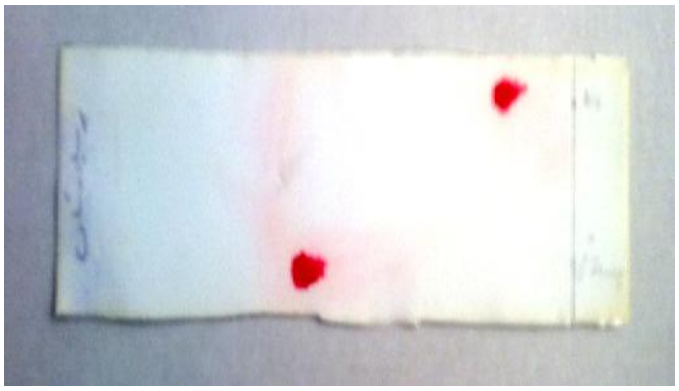
پس از قرار دادن کاغذهای TLC در زیر اشعه ی UV با توجه به اینکه آفلاتوکسین در طول موج ۳۶۶nm در زیر لامپ UV فلورسانس آبی دارد، هیچ اثری از آفلاتوکسین دیده نشد.

تحلیل آماری

محاسبهٔ آمار توصیفی از جمله میانگین ، SD و مقایسه پارامترهای مورد مطالعه بین گروه های نمونه و کنترل منفی بنابه ضرورت با استفاده از آزمون آماری paired T-test با سطح معنی دار $P<0.05$ و توسط نرم افزار Excelانجام شد.



شکل ۱: تایید ژنوتیپ سویه ی باکتری TA_{100}(لوله های سمت راست تیره تر (رشد باکتری)و لوله های سمت چپ عدم رشد دیده می شود).



شکل ۲: بررسی حضور هیستیدین در عصاره ی گیاهی با استفاده از معرف نانهیدرین(لکه ی استاندارد هیستیدین و نمونه عصاره بر روی صفحه کرو ماتوگرام مشاهده می شود).

جدول ۱: نتایج انجام تست با چهار غلظت عصاره ی گیاه پرسیاوشان (۰,۵،۱،۱,۵،۲ میلی گرم بر میلی لیتر) بدون حضور آنزیم های کبدی (آزمایش ها سه بار تکرارشده است). شمارش کلنی ها و IF به صورت Mean±SD نشان داده شده است.

		تکرار۱		تکرار۲		تکرار۳			
	غلظت(mg/ml)	Plate1	Plate2	Plate1	Plate2	Plate1	Plate2	میانگین± SD	فاکتور القایی (IF) IF±SD
پرسیاوشان	غلظت(0.5)	118	94	113	102	96	115	106.3± 10.3	1.02±0.18
	غلظت(1)	99	113	112	93	109	108	105.6±7.9	1.01±0.08
	غلظت(1.5)	117	110	103	119	123	118	115±7.2	1.10±0.19
	غلظت(2)	77	88	111	97	91	122	97.6±16.3	0.94±0.16
کنترل	کنترل مثبت ($NaN_3O.O1$)	400	460	470	390	470	360	425±47.6	4.09±0.34
	کنترل منفی (methanol)	90	112	108	106	108	98	103.6±8.4	1

جدول ۲: نتایج انجام تست با چهار غلظت عصاره ی گیاه پر سیاوشان (۰,۵،۱،۱,۵،۲ میلیگرم بر میلی لیتر) با حضور آنزیم های کبدی(آزمایش ها سه بار تکرارشده است). شمارش کلنی ها و IF به صورت Mean±SDنشان داده شده است.

		تکرار۱		تکرار۲		تکرار۳			
غلظت(mg/ml)		Plate1	Plate2	Plate1	Plate2	Plate1	Plate2	میانگین± SD	فاکتور القایی(IF) IF ±S D
پرسیاوشان	غلظت(0.5)	101	102	116	108	103	94	104±7.4	1.09±0.07
	غلظت(1)	118	105	116	91	113	104	107.83± 10	1.13±0.10
	غلظت(1.5)	115	105	96	99	76	110	100.16± 13.7	1.05±0.14
	غلظت(2)	113	86	92	103	95	103	98.66±9 .6	1.04±0.12
کنترل	کنترل مثبت (NaN3 O.O1)	410	450	400	380	390	460	415±32. 7	4.38±0.48
	کنترل منفی (Methanol)	100	102	98	92	90	86	94.66±6 .2	1

بحث

امروزه گیاهان دارویی مختلف از جمله گیاه پرسیاوشان در جامعه مصرف زیادی دارند. این گیاه حاوی مقادیری تری ترپنوئید می باشد. این تر کیبات خاصیت ضد تومور دارند و روی DNA اثر می گذارند. با توجه به کاربرد بسیار زیاد این گیاه سعی شد تا توسط تست ایمز بررسی شود که آیا این گیاه خاصیت ایجاد سرطان و ایجاد تغییرات ژنتیکی را دارد؟ یا توانایی ایجاد جهش در صورت مصرف این گیاه وجود دارد یا خیر؟

برخی از مواد سرطانزا برای آنکه به تست ایمز جواب بدهند باید قبلاً فعال شده باشند. اکثر مواد سرطانزا مخصوصاً ترکیبات طبیعی، اگر مستقیماً در تماس با باکتری در حال رشد قرار داده شوند موجب جهش نمی شوند و لازم است ابتدا در مجاورت عصاره کبد پستانداران قرار گیرند تا فعال شوند. این فرآیند به طور طبیعی در هنگام متابولیزه شدن مواد بیگانه در کبد صورت می‌گیرد. با توجه به مشابهت متابولیسم روده ای و کبدی انسان با موش (۳۹-۳۸)، در این مطالعه از آنزیم های کبدی موش استفاده شدو از طرفی با توجه به اینکه در ایران از دم کرده ی برگ های پر سیاوشان به عنوان رفع گلو درد و خلط سینه استفاده می شود، در این مطالعه از عصاره برگ ها استفاده شد.

باکتری ها به دلیل هزینه کم و حساسیت زیاد در سنجش و تشخیص سرطان زایی مواد مشکوک در آزمون هایی مانند آزمون ایمز استفاده می شوند. در هنگام انجام تست، تعداد زیادی باکتری (حدود ۵×۱۰^{۸} باکتری در هر پلیت) در معرض ماده موتاژن قرار میگیرد و با توجه به انجام سریع و به صرفه آن، از آزمون های موثر در ارزیابی سریع مواد مختلف از جمله عصاره های گیاهی می باشد(۴۲-۴۰).

آفلاتوکسین دارای خاصیت جهش زا میباشد (۳۷) و به همین علت می بایستی وجود آن در عصاره بررسی می شد تا احتمال خطاء در آزمون وجود نداشته باشد.

در این آزمون از باکتری سالمونلا تیفی موریوم سویه TA_{100} که حساسیت بالایی در شناسایی میزان جهش زایی مواد مختلف مخصوصا ترکیبات شیمیایی و گیاهی دارد، استفاده شد. این سویه دارای موتاسیون hisG46

در ژن hisG (ژن کد کننده بیوسنتز هیستیدین)می باشد و مواد موتاژنی را که سبب استخلاف جفت باز در یکی از جفت های G-C می شوند را شناسایی می کند. TA_{100} همچنین دارای فاکتورR (فاکتور مقاومت به آمپی سیلین) می باشد، وجود موتاسیون rfa سبب نفوذ مولکولهای درشت به داخل باکتری و افزایش قدرت ارزیابی مواد موتاژن در این سویه می شود. با توجه به موتاسیون rBuv، این سویه در مقابل اشعه uv قادر به رشد نخواهد بود(۴۳، ۳۵). زمانی که سویه ها در برابر ترکیبات جهش زا قرار می گیرند، با ایجاد جهش در اپران هیستیدین این سویه ها، باکتری مذکور از حالت وابستگی به هیستیدین به حالت غیر وابسته در می آید. میزان جهش زا بودن با توجه به غلظت و اثر وابسته به دوز، قدرت جهش زائی ماده را مشخص می کند.

در این تحقیق پس از طی کردن مراحل مختلف کشت جهت آنالیز داده ها، ابتدا میانگین کلنی های برگشتی مربوط به هر غلظت نسبت به میانگین تعداد کلنی های برگشتی پلیت های کنترل مورد بررسی قرار داده شد. فاکتور القا یا فاکتور IF(Induction factor) بیانگر نسبت کلنی های برگشتی ایجاد شده در پلیت های حاوی نمونه، به پلیت کنترل منفی می‌باشد. یک ماده زمانی موتاژن محسوب می شود که علاوه بر آنکه فاکتور IF آن ۲ یا بیشتر از ۲ باشد، تغییر در تعداد برگشتی ها نیز متناسب با غلظت بوده و اثر وابسته به دوز داشته باشد. فاکتور بین 1.7 و1.9 همراه با اثر وابسته به دوز، نشان دهنده اثر ضعیف موتاژنی است و اگر فاکتور مذکور کمتر از 1.6 باشد ماده ی مورد نظر موتاژن یا دارای سمیت سلولی نمی باشد(۴۶-۴۴).

با انجام TLC ، از عدم حضور هیستیدین در عصاره-ی گیاه اطمینان و سوش $_{100}$ TA تأییدشد. در ادامه مشخص شد این گونه دارای فاکتورR،موتاسیون rfaو موتاسیون uvrB است. انجام آزمایش در حضور و نیز در عدم حضور آنزیم های کبدی با شمارش تعدادکلنی های برگشتی و نیز بررسی فاکتور القایی (IF) نشان داد کهIF در تمام غلظت ها کمتر از ۱/۶ می باشد.آزمون Paired T-testارتباط معنی داری بین غلظت های استفاده شده و افزایش تعداد کلنی های نمونه نسبت به کنترل منفی،نشان نداد.با مراجعه به جداول مشخص می شود که فاکتور القاء در تمام غلظت‌های مورد استفاده در حضور و یا عدم حضور آنزیمهای کبدی کمتر از ۱,۶ می باشد که نشان دهنده عدم قدرت جهش زا بودن عصاره گیاه می باشد.

این گیاه دارای ترکیبات پلی فنولی، ترپنوئید، اسید های چرب و موم، آلکالوئید، ترکیبات N – اکسید و فیبر با خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد التهابی قوی است (۴۷). مطالعات نشان میدهد که ترکیبات مختلف فلاونوئید، دارای پتانسیل قوی ممانعت از ایجاد موتاژنسیته در برابر ترکیبات موتاژن(۴۸) مانند آمین های هتروسیکلیک (۴۹) می باشد. در ضمن ترکیبات پلی فنل، دارای یک نقش دوگانه محافظتی در کاهش خاصیت کارسینوژنیسیتی، از طریق کاهش فراهمی زیستی کارسینوژن ها و مداخله با بیوترانسفورماسیون کبدی هستند (۴۸). بر همین اساس می توان پیشنهاد کرد که احتمالا ترکیبات فلاونوئید گیاه گل پر سیاوشان قادر به ممانعت از بروز احتمالی اثرات ژنی ترکیبات ترپنوئید گیاه هستند. در بررسی موتاژنیسیته ۱۰ ترکیب فلاونوئید کوئرستین (Quercetin)، ۵ و ۳ هیدروکسی فلاون (3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone)، فلاون (flavones)، گالانژین (Galangin)، کریسین (Chrysin)، فیستین (Fisetin)، لوتئولین (Luteolin) و کامپفرول (Kaempferol) مشخص شد که ترکیب کوئرستین از طریق فعال شدن متابولیک در کبد (حضور عصاره کبدی) قادر به ایجاد موتاژنیسیته در سوش های 98، 100 و TA 102 است (۴۸). با توجه به احتمال فعال سازی متابولیک برخی از فلاونوئید ها در حضور عصاره کبدی، آزمایش در حضور عصاره کبدی نیز انجام شد که نشان دهنده نتائج مشابه با عدم حضور عصاره بود.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج مشخص می شود که گیاه پرسیاوشان در غلظت های مختلف دارای اثر موتاژنی بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA $_{100}$ نمی باشد.در تحقیق برون تنی (In vitro) اخیر، می توان چنین نتیجه گیری کرد که مصرف گیاه پر سیاوشان، احتمالا تغییری در ژن ایجاد نمی کند و به عبارت ساده تر موجب تغییرات جهش زا و ژنتیکی نمی شود.

قدردانی

این مقاله از پایان نامه خانم فرزانه کیانی‌پور، دانشجوی داروسازی استخراج شده است که به عنوان طرح مصوب دانشگاه در مرکز تحقیقات سم‌شناسی تصویب و در گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات سم‌شناسی اجراء شد. بدین وسیله از مرکز تحقیقات سم‌شناسی، پرسنل محترم دانشکده پزشکی و داروسازی علوم پزشکی جندی‌شاپور صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

منابع

1-Deloi N, Khosravinia MR. [Culture of genetic engineering]. Tehran: National Center for Genetic Research and Biotechnology publication; 1994. [In Persian]
2-Esmith P, Hansel K. [Side effect of herbal drug]. Mashhad: Mashhad university publication; 1997. [In Persian]
3-Gardiner P, Kemper KJ, Legedza A, Phillips RS. Factors associated with herb and dietary supplement use by young adults in the United States. BMC Complement Altern Med 2007;7:39.
4-Ernst E. Systematic reviews of herbal medicines. Am J Med 2004;117:533.
5-Ayinehchiy Y. Materia of medical herbs and medicinal plants. Tehran: Tehran University Publication; 1991. p.1035.
6-Ernst E. Risks of herbal medicinal products. Pharmacoepidemiol Drug Saf 2004;13(11):767-71.
7-Rietjens IM, Boersma MG, van der Woude H, Jeurissen SM, Schutte ME, Alink GM. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. Mutat Res 2005;574(1-2):124–38.
8-Mei N, Guo L, Liu R, Fuscoe JC, Chen T. Gene expression changes induced by the tumorigenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in liver of Big Blue rats. BMC Bioinformatics 2007;8Suppl7:S4.
9-Fu PP, Xia Q, Lin G, Chou MW. Pyrrolizidine alkaloids--genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms. Drug Metab Rev 2004;36(1):1–55.
10-Montbriand MJ. Herbs or natural products that may cause cancer and harm part four of a four-part series. Oncol Nurs Forum 2005;32(1):E20-9.
11-Woo Y, Lai D, Arcos J, Argus M. Safrole, estragole and related compounds, In: Arcos JC, Argus MF, Woo Y, eds. Chemical Induction of Cancer. New York: Springer-Verlag; 1988. P. 267.
12- Birdsey MB. A brief description of the cycads. Fed Proc 1972;31:1467-9.
13-Louw WKA, Oelofsen W. Carcinogenic and neurotoxic component in the cycad Encephalartos altensteinii Lehm. (familyZamiaceae). Toxicon 1975;13:447–52.
14-Singh M, Singh N, Khare PB, Rawat AK. Antimicrobial activity of some important Adiantum species used traditionally in indigenous system of medicine. J Ethnopharmacol 2008;115(2):327–9.
15-Heber, PDR for herbal medicine. 3rd ed. London: Thomson publication; 2004. P. 542-3.
16-Imperato F. Sulphate esters of hydroxycinnamic acid-sugar derivatives from Adiantum capillus-veneris. Phytochemistry 1982;21:2717-8.
17-Abdel-Halim OB, Ibraheim ZZ, Shiojima K. Oleanane triterpenes from Adiantum capillus-veneris growing in Egypt. Alex J Pharm Sci 2002;16:87-92.
18-Jankowaski CK, Aumelas A, Thuery P, Reyes-Chilpa R, Jimenez-Estreda M, Barrios H, et al. X-ray,$^{1}H/^{13}$ C2D and 3D NMR studies of the structures of davallene and adipedatol, two triterpenes isolated from American Adiantum capillus-veneris. Polish J Chem 2004;78:389-408.
19-Guarrera PM, Lucchese F, Medori S. Ethnophytotherapeutical research in the high Molise region (central-southern Italy). J Ethnobiol Ethnomed 2008;4:7.
20-Zargari A. [Medical plants]. Tehran: Tehran University Publications; 1996. P. 513-38. [In Persian]
21-Hooper D. Useful plants and drugs of Iran and Iraq. Chicago: Field Museum Press; 1937. P. 115.
22-Abbasi AM, Khan MA, Ahmad M, Zafar M, Khan H, Muhammad N, et al. Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation Afr J Biotechnol 2009;8(8):1643-50.

23-Besharat M, Rahimian M, Besharat S, Ghaemi E. Antibacterial effects of Adiantum capillus-veneris ethanolic extract on three pathogenic bacteria in vitro. J Clin Diagn Res 2008;2:1242-3.
24-Guha P, Mukhopadhyay R, Gupta K. Antifungal activity of the crude extracts and extracted phenols from gametophytes and sporophytes of two species of Adiantum. Taiwania 2005;50(4):272-83.
25-Victor B, Maridaas M, Ramesh U, Prabhu JMA. Antibacterial activity of essential oils from the leaves of Adiantum capillus-veneris Linn. Malaysian J Sci 2003;22:65-6.
26-Gupta V, Bansal P, Kumar P, Kaur G. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of Adiantum capillus. Res J Pharm Tech 2010;3:432-4.
27-Kumar A. Antioxidant effect of Adiantum capillus-veneris Linn. on human lymphocyte: an in vitro study. J Cell Tissue Res 2009;9:1899-902.
28-Purmorad F, Hosseinimehr SJ, Shahabimajd N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. Afr J Biothecnol 2006;5:1142-5.
29-Konopleva M, Tsao T, Ruvolo P, Stiouf I, Estrov Z, Leysath CE, et al. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia. Blood 2002;99(1):326–35.
30-Konopleva M, Tsao T, Estrov Z, Lee RM, Wang RY, Jackson CE, et al. The synthetic triterpenoid2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic acid induces caspase-dependent and -independent apoptosis in acute myelogenous leukemia. Cancer Res 2004;64(21):7927–35.
31-Place AE, Suh N, Williams CR, Risingsong R, Honda T, Honda Y, et al. The novel synthetic triterpenoid, CDDO-imidazolide, inhibits inflammatory response and tumor growth in vivo. Clin Cancer Res 2003;9(7):2798–806.
32-Ito Y, Pandey P, Sporn MB, Datta R, Kharbanda S, Kufe D. The novel triterpenoid CDDO induces apoptosis and differentiation of human osteosarcoma cells by a caspase-8 dependent mechanism. Mol Pharmacol 2001;59(5):1094–9.
33-Hail N Jr, Konopleva M, Sporn M, Lotan R, Andreeff M. Evidence supporting a role for calcium in apoptosis induction by the synthetic triterpenoid 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9- dien-28-oic acid (CDDO). J Biol Chem 2004;279(12):11179–87.
34-Hyer ML, Shi R, Krajewska M, Meyer C, Lebedeva IV, Fisher PB, et al. Apoptotic activity and mechanism of 2-cyano-3,12-dioxoolean-1,9-dien-28-oic-acid and related synthetic triterpenoids in prostate cancer. Cancer Res 2008;68(8):2927–33.
35-Maron DM, Ames BN. Revised methods for salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983;113(3-4):173-215.
36-Fazlibazzaz S, Izadyar AR. [Antimutagenic properties of fractions of herbal extract of norozak]. Iranian J Med Sci 2001;4:241-50. [In Persian]
37-Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. Mutat Res 1975;31(6):347-64.
38- Mattocks AR. Chemistry and toxicology of pyrrolizidine alkaloids. Florida. Academic Press 1986:4019–27.
39-.Ballantyne B, Marrs T, Syversen T. General and Applied Toxicology. New York: Groves Dictionary INC; 1999.
40-Yazdi E. [Changes in the genetic material]. Tehran: ghalam publications; 1368. [In Persian]
41-Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. Mutat Res 2000;455(1-2):29–60.
42-Gee P, Maron DM, Ames BN. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains. Proc Natl Acad Sci U S A 1994;91:11606–10.
43-Barnes W, Tuley E, Eisenstadt E. Base-sequence analysis of His+ revertants of the hisG46 missense mutation in Salmonella typhimurium. Environmental Mutagenesis 1982;4:297.
44-Willi J. The salmonella typhimutium reverse Mutation Assay. United State Environ Mental Protection Aganey. Health Effects Tests Guidelines 1996;219.
45-United States Environmental Protection Agency. Health Effects Tests Guidelines: OPPTS 870.5265, The Salmonella typhimurium Reverse Mutation Assay EPA712-C-96-219. Boston: United States Environmental Protection Agency; 1996.
46-Organization for Economic Cooperation and Development. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: Bacteria Reverse Mutation Test Guideline 471. City: OECD; 1997.
47-Rajurkar NS, Gaikwad K. Evaluation of phytochemicals, antioxidant activity and elemental content of Adiantum capillus veneris leaves. J Chem Pharma Res 2012;4(1):365-74.
48-Resende FA, Vilegas W, Dos Santos LC, Varanda EA. Mutagenicity of flavonoids assayed by bacterial reverse mutation (Ames) test. Molecules 2012;17(5):5255-68.
49-Bear WL, Teel RW. Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity. Anticancer Res 2000;20(5B):3609-14.

Evaluation of the Mutagenic Effect of Methanol Extract of *Adiantum capillus-veneris* Plant by Ames test

Farzaneh Kianipour[1], Amir Jalali[2*], Meisam Mousavi[3], Amir Siahpoosh[4], Ahmad Farajzadeh Sheikh[5]

1,3-Student in Pharmacy.
2 -Assistant Professor of Pharmacology and Toxicology.
4-Assistant Professor of Pharmacognosy.
5-Associate Professor of Microbiology.

1-Student in Pharmacy, School of Pharmacy and Toxicology Research Center, Ahvaz, Iran.
2-Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy and Toxicology Research Center, Ahvaz, Iran.
3-Student in Pharmacy, Student Research Committee, Ahvaz, Iran.
4-Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy and Medicinal Plants and Natural Products Research, Ahvaz, Iran.
5-Department of Microbiology, School of Medicine, Ahvaz, Iran.

[*]Corresponding Author:
Amir Jalali; Department of Pharmacology and Toxicology, Toxicology Research Center and School of Pharmacy, Ahvaz Jundisahpur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran,.
Tel:+986113738378
Email: amjalali@hotmail.com

Abstract

Background and Objective: Triterpenoids have been isolated from *Adiantum capillus- veneris.* These triterpenoids have antitumor effect. Their effect on DNA has been identified. Thus, the purpose of the present study was to obtain reliability of the non mutagenic effect of the methanolic *Adiantum capillus-veneris* extract using Amest test.

Subjects and Methods: Long maceration process (for 48 hrs) was carried out in order to extract all constitutes. Thin layer chromatography (TLC) method was used to evaluate aflatoxin B1 contamination and histidine amino acid presence. Minimum inhibitory concentration (MIC) was determined with dilution method. *Salmonella typhimurium* strain TA100 was used for determination of mutagenicity. The genotype was confirmed by using histidine requirement, R- factor presence, rfa and uvrB mutations tests. The mutagenicity assay was performed at four extract concentrations (0.5, 1, 1.5 and 2mg/ml). Sodium azide (NaN_3) and methanol were used as the mutagens (positive control) and negative control, respectively in the absence or presence of liver-metabolizing enzymes.

Results: *Adiantum capillus-veneris* did have not significant mutagenic activity against negative control. The presence of liver-metabolizing enzymes did not exhibit a significant change on the number of colony formed.

Conclusion: The results from this *in vitro* tests demonstrated that use of the extract from *Adiantum capillus-veneris* plant in traditional medicine does not carry the risk of mutagenic or genomic changes.

Keywords: Mutagenicity, Ames test, *Adiantum capillus-veneris,* Salmonella typhimurium, Strain TA 100.

►*Please cite this paper as:*
Kianipour F, Jalali A, Mousavi M, Siahpoosh A, Farajzadeh Sheijh A. Evaluation of the mutagenic effect of methanol extract of Adiantum capillus-veneris plant by Ames test. Jundishapur Sci Med J 2013;12(5):547-559

Received: Oct 9, 2012 Revised: Jan 9, 2013 Accepted: Jan 14, 2013