

بررسی اثرات عصاره و اسانس آویشن باغی (*Thymus vulgaris*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و میخک (*Eugenia caryophyllata*) بر روی سلول‌های Vero, Hela, Hep2 در محیط کشت سلولی با روش MTT

ناهید رحیمی فرد^۱، سعیدرضا پاکزاد^۲، شهرام شعبی^۳، محمدحسین هدایتی^۴،
هما حاجی مهدی پور^۵، وحیده مطهری نیا^۶، لایلا مهرافشان^۷، آیدا جوادی^۸، مرتضی پیرعلی همدانی^{۹*}

۱- دانشیار، اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو و مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو- وزارت

بهداشت و درمان و آموزش پزشکی

۲- استادیار اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو و وزارت بهداشت و درمان

۳- استادیار اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو و وزارت بهداشت و درمان

۴- مربی واحد کنترل کیفیت انیستیتو پاستور

۵- استادیار اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و دارو و وزارت بهداشت و درمان

۶- دکتری داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی

۷- دکتری داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی

۸- دکتری داروسازی واحد علوم دارویی دانشگاه آزاد اسلامی

۹- دانشیار مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

*آدرس مکاتبه: تهران، خیابان امام خمینی، نرسیده به تقاطع ولی عصر، اداره کل آزمایشگاه های کنترل غذا و

دارو، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی

تلفن: ۶۶۴۰۶۱۷۴ (۰۲۱)، نمابر: ۶۶۴۰۴۳۳۰ (۰۲۱)

پست الکترونیک: piralihm@tums.ac.ir ampirali@fdo.ir

تاریخ تصویب: ۸۸/۳/۵

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۷

چکیده

مقدمه: با افزایش کاربرد اسانس ها و عصاره ها در فرآورده های غذایی، دارویی مختلف به همان نسبت می بایستی تاثیر کاربرد وسیع آنها از نظر سلامت نیز ارزیابی شود.

هدف: کاربرد نگهدارنده های صنعتی و شیمیایی در فرآورده های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی رو به افزایش است. به دلیل اثرات جانبی و موتازنی این ترکیبات و مطالعه در مورد مواد طبیعی که قابلیت جایگزین شدن با نگهدارنده های شیمیایی را داشته باشند ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه درصد viability سلول های Vero, hep2, Hela در مواجهه با رقت های انتخابی از عصاره و اسانس آویشن باغی و شیرازی و میخک در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و با روش MTT تعیین و مقایسه شده است. عصاره ها با روش پر کولاسیون و به کار بردن متانول به عنوان حلال و اسانس ها با دستگاه کلونجر تهیه شدند. عصاره ها سانتریفیوژ شده و سریال رقتی از عصاره و اسانس با غلظت های ۰/۱۸۷۵، ۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ppm تهیه و سپس با رده های سلولی Vero, Hela, hep2 در محیط کشت مجاور شدند.

نتایج: تمام اسانس ها و عصاره های مورد بررسی در غلظت های خاصی اثر سایتوتولوژیک بر روی هر سه رده سلولی نشان دادند. مقادیر این غلظت ها از حداقل ۰/۰۴ تا حداکثر ۳ میکروگرم در میلی لیتر را شامل می شد.

نتیجه گیری: از نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود که در کاربرد اسانس ها در فرآورده های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی توجه به ایمنی^۱ اهمیت بیشتری پیدا می کند.

کل واژگان: اثرات سایتوتولوژیک، آویشن باغی، آویشن شیرازی، میخک، رده های سلولی Vero, Hela, hep2، روش MTT

¹ Safety



مقدمه

اسانس و عصاره‌ها می‌توانند به عنوان منبع غنی جهت تهیه گیاهان دارویی و به عنوان نگه‌دارنده و آنتی‌اکسیدان در فرآورده‌های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی مطرح باشند و به نظر می‌رسد که در آینده به دلیل ایمنی بالاتر، به طور کلی ترکیبات طبیعی مانند این نوع ترکیبات جایگزین سایر عوامل شیمیایی شوند. همچنین باید توجه داشت که حتی مواد طبیعی مانند عصاره‌ها و اسانس‌ها نیز ممکن است در دوزهای خاصی و بالاتر از حدود تعیین شده دارای اثرات آلرژیک، سمیت و حتی موتاژنی بر روی برخی رده‌های سلول‌ها باشند. لذا هدف از این مطالعه بررسی و تعیین غلظت ایمن عصاره و اسانس برخی از گونه گیاهان پر مصرف قرار گرفت [۱،۲].

مواد و روش‌ها

تمام عصاره‌ها در این تحقیق با روش پر کولاسیون و با به کار بردن متانول به عنوان حلال استخراج و اسانس‌ها نیز با کمک دستگاه کلونجر تهیه شدند. عصاره‌ها سانتریفیوژ شده و سریال رقتی از عصاره و اسانس با غلظت‌های ۰/۱۸۷۵، ۰/۳۷۵، ۰/۷۵، ۱/۵، ۳، ۶، ۱۲ و ۲۴ ppm تهیه شد [۳].

رده‌های سلولی Vero, Hela, hep2 در محیط کشت MEM: Modified Eagle Medium, RPMI1640 رشد یافتند و به این محیط، ۱۰٪ FBS ۱ mM اسید آمینه‌های غیرضروری و ۱ mM سدیم پیروات اضافه شد و در انکوباتور ۳۷ درجه با ۵٪ CO₂ قرار گرفت. سلول‌ها در حد نهایی فاز رشد خود به وسیله محلول تریپسین - EDTA جدا شده و سانتریفیوژ (۳۰۰×g) انجام شد و با روش Trypan blue dye exclusion درصد viability مشخص شد [۴،۵].

۵۰۰۰ سلول زنده در میکروپلیت‌های ۹۶ Well کشت داده شد و ۴۸ ساعت درون انکوباتور قرار گرفت. بعد از گذشت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون محیط کشت با سریال رقت‌های انتخابی عصاره و اسانس در محیط کشت جدید جایگزین شد. سلول‌ها جهت بررسی اثر سایتوتوکسیک عصاره

و اسانس به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت با رقت‌های انتخابی به صورت تریپلیکیت مجاور شدند. (با گذشت ۷۲ ساعت کنترل سلولی (کنترل منفی) در فاز رکود رفته و در ۲۴ ساعت نیز سلول‌ها به مقدار مطلوب رشد خود نرسیدند). به همین دلیل در این مطالعه داده‌های حاصل از مجاورت ۴۸ ساعت با روش MTT مورد توجه قرار گرفت [۸].

روش MTT براساس کاهش و تبدیل 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide به ترکیبات نفوذ ناپذیر و غیرقابل حل فورمازان استتوسط آنزیم‌های دهیدروناز میتوکندریایی استوار است و این ترکیبات در سلول‌های زنده تجمع پیدا می‌کنند [۷].

پس از زمان مجاورت محیط کشت خارج شده و سلول‌ها به همراه محیط کشت جدید شامل محلول MTT (۵ mg/ml in PBS) به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار گرفت. جهت حل شدن کریستال‌های فورمازان محلول اسیدی شده ۱۰۰ ماکرولیت propan-2-ol (۰/۰۴ MHCl) اضافه شد و ۱۵ دقیقه در shaker قرار گرفت. جذب نوری^۱ در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه ELISA reader ثبت شد. مشاهده شد که در کنترل منفی (control cell+MTT) بالاترین مقدار جذب نوری به دست آمد که بیانگر زنده بودن سلول است [۶].

نتایج

از رسم نمودارهای غلظت^۲، کنترل مثبت^۳، کنترل منفی (کنترل سلولی) بر حسب جذب نوری نتایج مطابق با جداول شماره ۱، ۲ و ۳ به دست آمد:

بحث

تمام اسانس‌ها و عصاره‌های مورد بررسی در غلظت‌های خاصی اثر سایتوتولوژیک بر روی هر سه رده سلولی نشان دادند شکل شماره‌های ۱، ۲، ۳.

¹ OD
³ DMSO

² Concentration



جدول شماره ۱- غلظت‌های توکسیک عصاره و اسانس میخک بر روی سه رده سلول Vero, Hela, Hep2

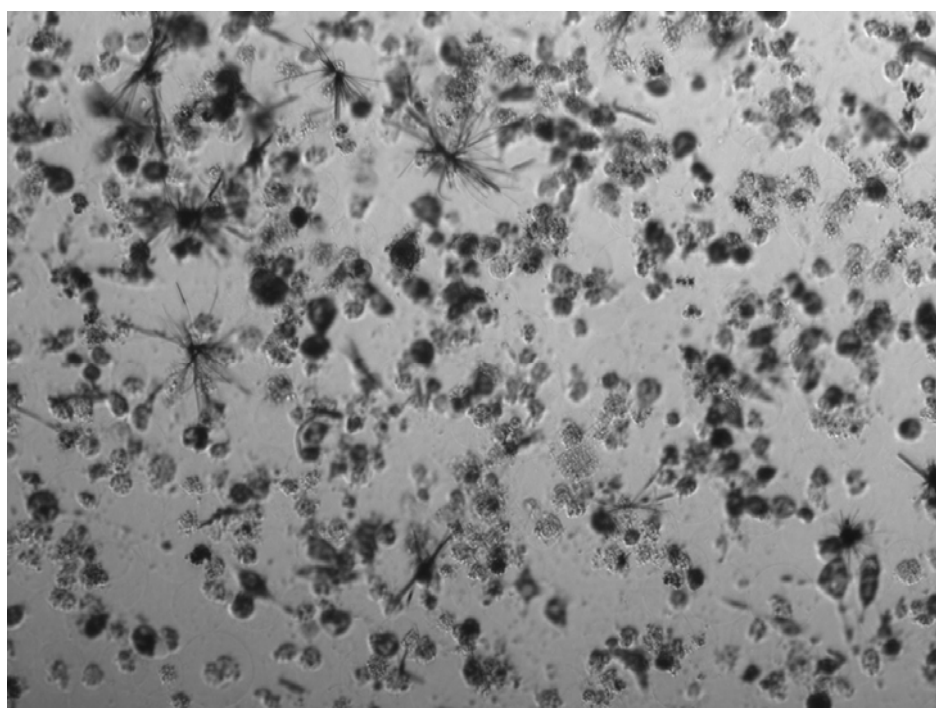
عصاره میخک	اسانس میخک
HEP2	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm
HELA	اثر توکسیک از ۰/۳۷۵ تا ۱/۵ ppm
VERO	اثر توکسیک از ۰/۷۵ تا ۳ ppm

جدول شماره ۲- غلظت‌های توکسیک عصاره و اسانس آویشن باغی بر روی سه رده سلول Vero, Hela, Hep2

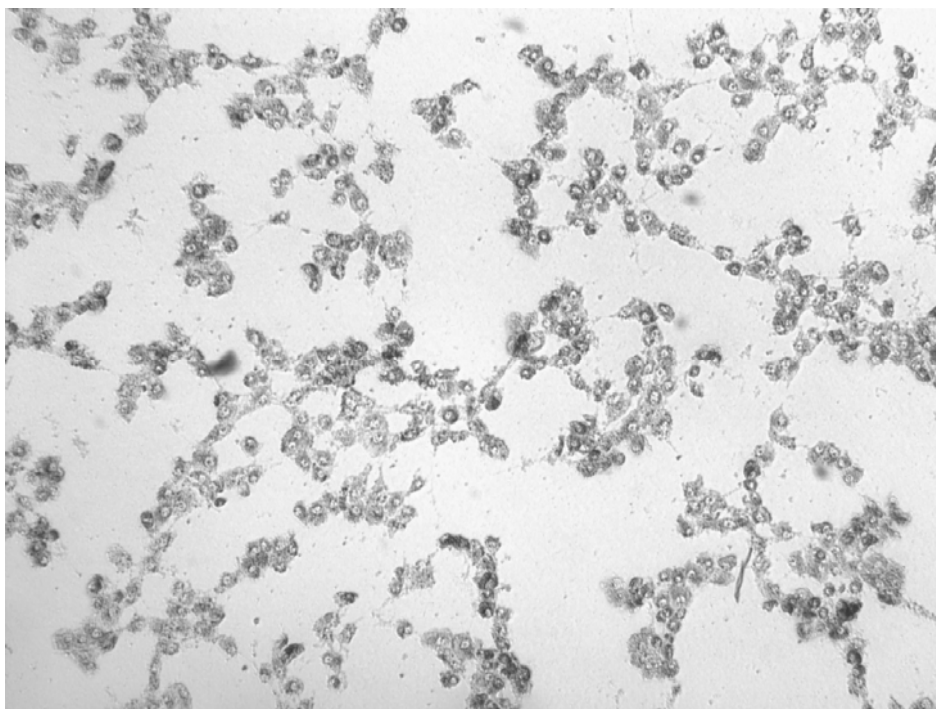
عصاره آویشن باغی	اسانس آویشن باغی
HEP2	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm
HELA	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۳۷۵ ppm
VERO	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm

جدول شماره ۳- غلظت‌های توکسیک عصاره و اسانس آویشن شیرازی بر روی سه رده سلول Vero, Hela, Hep2

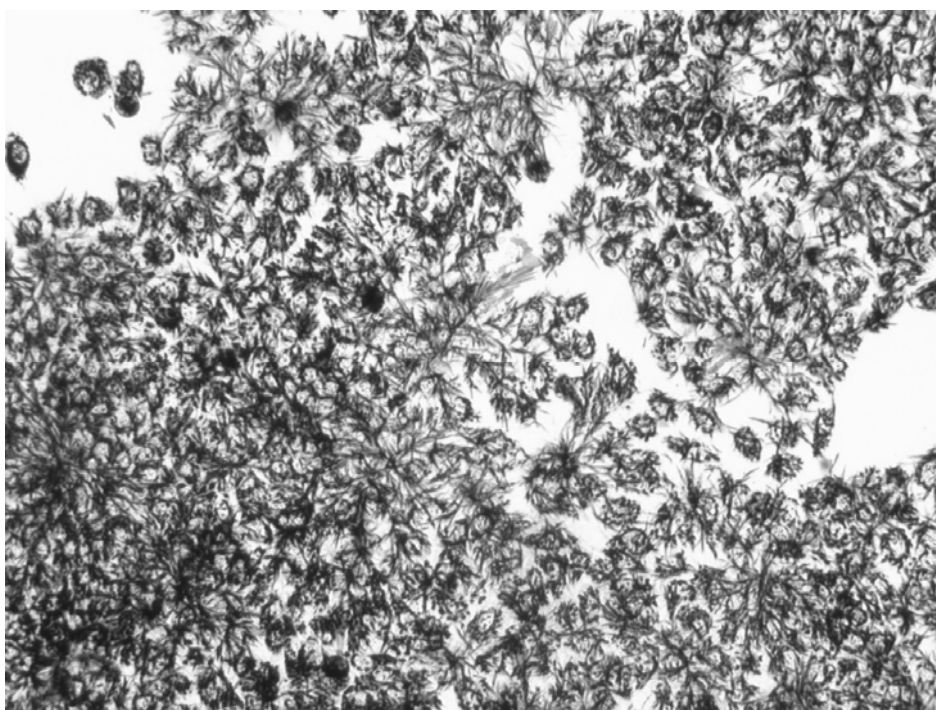
عصاره آویشن شیرازی	اسانس آویشن شیرازی
HEP2	اثر توکسیک از ۰/۰۹۳۷۵ تا ۰/۷۵ ppm
HELA	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۳۷۵ ppm
VERO	اثر توکسیک از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۷۵ ppm



شکل شماره ۱ - سلول‌های Hela پس از اثر سایتوتوکسیک اسانس‌ها و عصاره‌ها



شکل شماره ۲ - سلول‌های Vero پس از اثر سایتوتوکسیک اسانس‌ها و عصاره‌ها



شکل شماره ۳ - سلول‌های hepII پس از اثر سایتوتوکسیک اسانس‌ها و عصاره‌ها

میانگین بیشترین و کمترین غلظت توکسیک عصاره و اسانس آویشن شیرازی بر روی هر سه رده سلولی فوق به شرح زیر است:

اسانس: از ۰/۰۷۸۱۲۵ تا ۰/۲۵ ppm

عصاره: از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۶۲۵ ppm

که می توان نتیجه گرفت که اسانس ها در مقایسه با عصاره ها در غلظت های پایین تر اثر توکسیک نشان داده اند. لذا در این بحث پیشنهاد می شود که در کاربرد اسانس ها در فرآورده های غذایی، دارویی و محصولات آرایشی و بهداشتی توجه به ایمنی اهمیت بیشتری پیدا می کند.

میانگین بیشترین و کمترین غلظت توکسیک عصاره و اسانس آویشن باغی بر روی هر سه رده سلولی فوق به شرح زیر است:

اسانس: از ۰/۰۷۸۱۲۵ تا ۰/۲۵ ppm

عصاره: از ۰/۱۸۷۵ تا ۰/۶۲۵ ppm

میانگین بیشترین و کمترین غلظت توکسیک عصاره و اسانس میخک بر روی هر سه رده سلولی فوق به شرح زیر است:

اسانس: از ۰/۱۵۶۲۵ تا ۱ ppm

عصاره: از ۰/۴۳۷۵ تا ۱/۷۵ ppm

منابع

1. Robert Yuan, Lin Traditional Chinese medicine: "An approach to scientific proof and clinical validation". Pharmacology & Therapeutics, cosmos press, 2000, pp: 191 - 8.
2. G Miller, Lucinda, et al. Herbal Medicinals and clinician's guide. USA, pharmaceutical products press, 1988, pp: 158 - 9.
3. The Medicinal Herbs Pharmacopea, vol 2, 2002, pp: 632 - 7.
4. Teimoori A. Pharm.D. Thesis, Islamic Open University, Faculty of Pharmacy- No.1403, 2004, pp: 28 - 45.
5. Freshney RI. Culture of Animal Cell: A Manual of basic Technique, 3 ed; Wiley-Liss, New York, 1994, pp: 153 - 7.
6. Carmichael J and et al. *Cancer Res.* 1987; 47: 936 - 7.
7. Slater TF and et al. *Biochim. Biophys. Acta.* 1963; 77, 383.
8. McAteer JA and Douglas WHJ. Monolayer Cell Culture Techniques Techniques. in: Methods in Enzymology, Vol. 58: Cell Culture. W.B. jakoby and I. H. Pastan, Eds. Academic Press, New York, 1979, pp: 132 - 40.