فصلنامه

شناخت و کاربرد گیاهان دارویی

سال اول، شماره ۲، پاییز ۱۳۸۷، صفحات ۱۶- ۷

اثرات ضدجهشی و ضدسرطانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی بخش‌های رویشی و زایشی گیاه مرزنگوش (*Origanum vulgare* L.)

احمد مجد

استاد سیتولوژی و مورفوژنز، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

صدیقه مهرابیان

استاد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه تربیت معلم، تهران

سعیده سعادت *

کارشناسی ارشد علوم گیاهی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات، تهران

محل انجام پژوهش: مجتمع آزمایشگاهی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

تاریخ دریافت: ۸۸/۵/۶ **تاریخ پذیرش:** ۸۸/۷/۵

چکیده

ترکیبات ضدمیکروبی و ضدجهشی با منبع گیاهی، دارای قابلیت‌های درمانی بی‌شماری هستند. در این پژوهش، اثرات ضدجهشی و ضدسرطانی گیاه مرزنگوش (*Origanum vulgare* L.) مورد بررسی قرار گرفته است. گیاه مرزنگوش در مرداد و شهریور ۱۳۸۶ از دامنه‌های شمالی ارومیه، منطقه روستای سولیک (آبشار سولیک) جمع‌آوری شد. بررسی اثر آنتی‌اکسیدان و ضدجهش عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی مرزنگوش بر اساس روش Ames با استفاده از سویه جهش یافته سالمونلاتیفی‌موریوم TA100 و ماده سرطان‌زای آزید سدیم انجام شد و با افزودن میکروزوم کبد موش، اثر ضدسرطانی عصاره‌ها نیز به اثبات رسید. در هر آزمون یک شاهد مثبت، شامل آزید سدیم و شاهد منفی آب مقطر در نظر گرفته شد. هر آزمون سه بار به طور همزمان انجام و درصد بازدارندگی مطابق فرمول-1) 100×(T/M)تعیین شد. در این فرمول، T تعداد کلنی برگشتی در حضور نمونه و ماده جهش‌زا و M تعداد کلنی برگشتی کنترل است. نتایج آزمایش‌ها و بررسی‌های آماری آن‌ها نشان می‌دهد که بیشترین میزان خواص آنتی‌اکسیدان و ضدسرطانی مربوط به عصاره آبی اندام‌های رویشی و کمترین میزان این ویژگی‌ها مربوط به عصاره اتانولی اندام‌های رویشی است. براساس فرمول Ong که اگر میزان بازدارندگی از جهش‌های برگشتی (که توسط آزید سدیم در سویه سالمونلاتیفی موریوم TA100 القا شده است) از۴۰ درصد بالاتر باشد، عصاره مورد آزمایش دارای خواص ضدجهش قوی است، نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که گیاه مرزنگوش دارای خواص ضدجهشی و ضدسرطانی قوی است و میزان این خواص با تکوین گیاه مرزنگوش مرتبط است.

* **مسؤول مکاتبات:** خانم سعیده سعادت، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد علوم وتحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، پست الکترونیکی: saadat.313@gmail.com

واژه‌های کلیدی: اثر ضدجهشی، اثر ضدسرطانی، مرزنگوش، *Origanum vulgare* L.، *Salmonella typhimurium*

مقدمه

شیوع زیاد سرطان در ایران و جهان، یافتن داروهایی با عوارض جانبی و تداخل‌های دارویی کمتر و اثرات درمانی بهتر را اجتناب ناپذیر ساخته است؛ به‌طوری که امروزه بیش از ۶۰ درصد ترکیبات ضدسرطانی از منابع گیاهی، دریایی و میکروارگانیسم‌ها به دست می‌آید (۱). به علت علاقه وافر مردم و مصرف روزافزون داروهای گیاهی و اهمیتی که این بخش از منابع طبیعی ایران از نظر اقتصادی و درمانی دارد، ضرورت تحقیق در زمینه اثرات درمانی گیاهان دارویی آشکار است.

گیاه مرزنگوش با نام علمی *Origanum vulgare* L. از تیره نعناع (Labiatae) دارای مصارف دارویی، از جمله برای درمان آسم، زردی، یرقان، دردگلو، سرفه، سرماخوردگی، آنژین، برونشیت، دردهای عصبی، سخت شدن رگ‌ها، سیاتیک، رماتیسم، بیماری‌های چشم (ورم پلک چشم)، انواع زخم‌ها (زخم‌های ناشی از ضربه و کوفتگی) و جراحات مفاصل (جابه‌جاشدگی، از جادرفتگی) است. همچنین، استعمال این گیاه به عنوان داروی تسکین دهنده دردهای زنانه، گرفتگی مجاری ادرار و در موارد کم‌کاری اندام‌های کلیه، ریه، کبد، طحال و رحم نیز توصیه شده است (۲).

مرزنگوش از نظر ترکیبات شیمیایی، با داشتن ترکیبات فنلی از قبیل تیمول، کارواکرول، رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، فلاونوئیدها و ترپنوئیدها که خاصیت ضدجهشی و ضد سرطانی دارند، گیاه دارویی مهمی محسوب می‌شود (۱۰-۳).

امروزه برای سنجش فعالیت ضدجهشی ترکیبات مختلف از باکتری‌ها استفاده می‌شود که در زمانی کوتاه نتایج مناسبی را به دست می‌دهند. یکی از روش‌های سنجش ترکیبات بازدارنده جهش در باکتری‌ها، کاربرد روش ایمز (Ames) است. ایمز و همکارانش از سال ۱۹۷۵ فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی ترکیبات مختلف را مورد بررسی قرار دادند و از سویه‌های سالمونلاتیفی موریوم که بر اثر ایجاد جهش، قدرت سنتز هیستیدین را از دست داده بودند، استفاده کردند. این سویه‌ها در مقابل ماده سرطان‌زا در محیط فاقد هیستیدین، جهش برگشتی در جهت سنتز هیستیدین پیدا می‌کنند (۱۱).

از آن‌جا که خواص ضدجهشی و ضدسرطانی گیاه مرزنگوش در ایران تقریباً ناشناخته است، فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی بخش‌های رویشی (شامل ساقه و برگ) و زایشی (شامل گل و میوه) این گیاه در پژوهش حاضر مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد مورد آزمایش

اندام‌های رویشی و زایشی گیاهان مرزنگوش در مرداد و شهریور ماه ۱۳۸۶ از ارتفاعات مرزی ایران و ترکیه در حاشیه آبشار سولیک) واقع در ۳۰ کیلومتری شمال غرب ارومیه جمع‌آوری شدند. پس از شستشوی اولیه، نمونه‌ها در دمای اتاق و دور از نور مستقیم خورشید، خشک و به وسیله دستگاه خردکن پودر شدند. سترون کردن عصاره‌ها به کمک فیلتر میلی‌پور ۰/۴۵ میکرومتر انجام شد. عصاره گیاهان با خیساندن ۰/۱ گرم ازهر نمونه در ۱۰ میلی‌لیتر حلال‌های مختلف، شامل آب مقطر، اتانول ۸۰ درصد و متانول ۸۰ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه و انجام سانتریفوژ به مدت ۱۴ دقیقه در g ۱۰۰۰۰ تهیه شدند. از محیط‌های کشت شامل محیط گلوکز آگار حداقل، تاپ آگار، نوترینت آگار، مولر هینتون آگار و نوترینت براث به منظور کشت باکتری‌ها استفاده شد. از سدیم آزید، کریستال ویوله، آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و محلول هیستیدین - بیوتین نیز استفاده گردید.

آزمون‌های تأیید سویه مورد آزمایش (TA100)

برای تأیید سویه در تمامی آزمون‌های زیر، از کشت تازه شبانه استفاده شد.

جهش rfa: سویه مورد نظر، جهت بررسی حساسیت به کریستال ویوله آزمایش شد. برای این منظور یک دیسک کاغذی استریل آغشته به کریستال ویوله را در سطح پلیت کشت شده با سالمونلاتیفی‌موریوم (TA100) قرار داده، بعد از ۲۴ ساعت قطر هاله مهار رشد سنجیده شد (۱۲).

جهش uvrB: حساسیت به پرتو UV در سویه TA100 جهش uvrB را تأیید می‌کند. برای این منظور، نیمی از سطح پلیت کشت شده با سالمونلاتیفی موریوم (TA100) با کاغذ آلومینیومی پوشانیده شد و توسط لامپ UV پرتوتابی انجام گرفت (۱۱).

پلاسمید **R-factor**: سویه TA100 برای بررسی وجود عامل مقاومت به آمپی‌سیلین مورد آزمایش قرار گرفت. این آزمایش نشانه مناسبی برای کسب اطلاع در زمینه وجود پلاسمید است (۱۳).

آزمون اثر ضدجهشی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی مرزنگوش با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم

مرحله اول این آزمون، شامل افزودن ۰/۵ ml ماده مورد آزمایش (عصاره گیاه مرزنگوش) به ۰/۵ml کشت تازه شبانه سالمونلاتیفی موریوم (TA100) و ۰/۵ ml محلول هیستیدین و بیوتین در لوله آزمایش محتوی ۱۰ ml تاپ آگار و ماده سرطان‌زا است. محتویات این لوله پس از ۳ ثانیه تکان‌دهی در جنباننده (Shaker)، به طور یکنواخت در سطح محیط گلوکز آگار حداقل گسترده می‌شوند. هر لوله آزمایش برای ۳ پلیت به کار می‌رود که در این روش سه بار آزمایش همزمان انجام می‌شود. بعد از سخت‌شدن آگار، پلیت‌ها وارونه شده و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار می‌گیرند. برای هر ماده آزمایشی ۳ پلیت در نظر گرفته می‌شود. شاهد مثبت و منفی نیز باید در هر آزمون لحاظ شود. شاهد منفی، حاوی باکتری و آب مقطر استریل و شاهد مثبت نیز شامل باکتری و سدیم آزید است. بعد از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون در ۳۷°C، کلنی‌های برگشت‌یافته در پلیت‌های آزمایشی و شاهد، شمارش می‌شود.

بررسی فعالیت ضدجهشی عصاره‌های مورد آزمایش با استفاده از میکروزوم کبد موش (S9)

برای تهیه S9 از موش صحرایی نر استفاده شد. با شستشوی کبد موش در محلول استریل و سرد KCl ۰/۱۵ مولار و همگن‌کردن مخلوط توسط دستگاه هموژنایزر و انجام سانتریفوژ، محلول S9 تهیه می‌گردد (۱۱). این آزمون نیز مرکب از آمیختن ماده آزمایشی، سویه باکتری مورد آزمایش، محلول هیستیدین - بیوتین و مخلوط S9 در لوله آزمایش محتوی تاپ آگار است که در سطح محیط گلوکز آگار حداقل گسترده می‌شود. در این آزمون نیز شاهد مثبت و منفی در نظر گرفته می‌شود و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷°C، کلنی‌های برگشت یافته شمارش می‌گردد.

محاسبه درصد بازدارندگی جهش توسط عصاره‌های مورد آزمایش

مقدار درصد بازدارندگی جهش با استفاده از فرمول $S=(1-T/M)\times100$ محاسبه می‌شود (۱۴). در این فرمول، S مقدار درصد بازدارندگی از جهش، T تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در حضور عامل جهش‌زا و عصاره و در نهایت M تعداد کلنی‌های برگشتی در هر یک از پلیت‌های شاهد مثبت هستند (تعداد کلنی‌های برگشتی خودبه‌خودی در شاهد منفی باید از صورت و مخرج کسر کاسته شوند).

بررسی آماری نتایج

محاسبه آماری نتایج آزمایش‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و آنالیز واریانس چند طرفه (Multi-way ANOVA) انجام شد و مقایسه میانگین‌ها به کمک آزمون T-Test, Duncan, LSD در سطح احتمالی $p<0/05$ انجام شد.

نتایج

تأیید سویه باکتری

نتایج تأیید ژنوتیب سویه سالمونلاتیفی موریوم TA100 نشان داد که این سویه کاملاً جهش یافته بوده و برای انجام آزمون‌های ضدجهشی عصاره‌های گیاهی مناسب است.

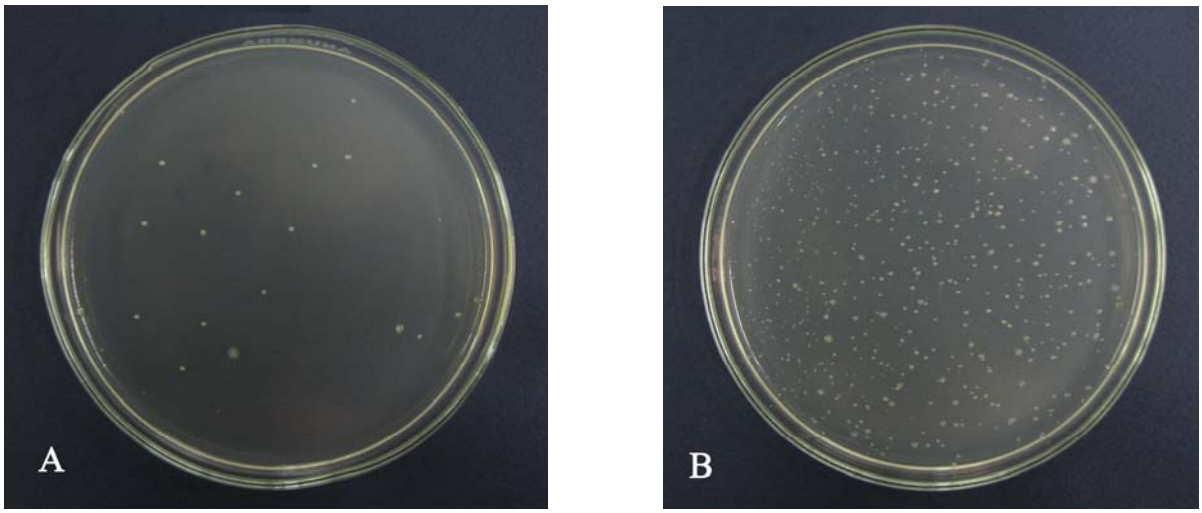
جهش rfa سبب فقدان جزئی لیپوپلی‌ساکاریدهای پوشش سطحی باکتری می‌شود و در نتیجه باکتری به کریستال‌ویوله نفوذپذیر شده و حضورکریستال‌ویوله در محیط، سبب مرگ باکتری می‌گردد.

جهش uvrB نشان‌دهنده جهش در ژن‌های تعمیر DNA در اثر آسیب UV است و با تابانیدن UV و قرار دادن نمونه در تاریکی، باکتری قادر به تعمیر بخش آسیب دیده نخواهد بود و در بخشی که در معرض UV بوده، باکتری‌ها رشد نمی‌کنند.

پلاسمید R در سویه TA100 دارای ژن مقاومت به آمپی‌سیلین است و در حضور دیسک آمپی‌سیلین، باکتری رشد می‌نماید.

اثر ضدجهشی گیاه مرزنگوش در حضور S9 و بدون S9 با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم

نتایج بررسی میزان ممانعت از جهش برگشتی عصاره‌های گیاه مرزنگوش در جدول ۱ و نمودارهای ۱ و۲ ارائه شده است. پلیت‌های شاهد مثبت (آزیدسدیم) به منظور القای جهش برگشتی استفاده می‌شوند. کلنی‌هایی که در پلیت‌های شاهد منفی (آب مقطر) رشد می‌کنند، نشان‌دهنده جهش برگشتی خودبه‌خودی هستند (شکل ۱). فعالیت ممانعت از جهش عصاره‌های پایه‌های رویشی و زایشی مرزنگوش با شاهد مثبت مقایسه و سنجیده می‌شوند و درصد مهار جهش، با استفاده از فرمول Ong (1983) محاسبه می‌شود (۱۵).



شکل ۱- A شاهد منفی، B شاهد مثبت

اثر ضدجهشی و ضدسرطانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی گیاه مرزنگوش

نتایج به دست آمده از تأثیر عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی بر جهش‌زایی آزید سدیم در غیاب S9 نشان می‌دهد که میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی در حضور عصاره‌های مختلف اندام‌های رویشی و زایشی به ترتیب عبارتند از: (عصاره‌های آبی: ۳۲۰، ۳۴۵، عصاره‌های اتانولی: ۳۹۱، ۳۵۵ و عصاره‌های متانولی: ۳۲۶، ۳۸۱) که

در مقایسه با میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت شاهد مثبت (۸۵۸) بسیارکمتر ودارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۵$ هستند.

میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی عصاره اتانولی اندام‌های رویشی، بیشترین و عصاره آبی اندام‌های رویشی، کمترین میانگین تعداد کلنی (بیشترین خاصیت ضدجهشی) را نشان می‌دهند و میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی در غیاب S9 برای عصاره‌های آبی و متانولی بخش زایشی، بیشتر از بخش رویشی است. به عبارت دیگر، عصاره‌های بخش زایشی، توان ممانعت کمتری برای جلوگیری از جهش‌های بازگشتی دارند که توسط آزید سدیم القا شده است؛ ولی تعداد کلنی‌های برگشتی در مورد عصاره اتانولی، اندام‌های رویشی، بیشتر از اندام‌های زایشی است (جدول ۱ و نمودار ۱). در غیاب S9 عصاره آبی و عصاره اتانولی اندام‌های رویشی به ترتیب بیشترین و کمترین درصد مهار جهش برگشتی را دارند (جدول ۱ و نمودار ۲). با توجه به نتایج مذکور، درصد مهار جهش عصاره‌های آبی و متانولی اندام‌های رویشی، بیشتر از اندام‌های زایشی است؛ ولی در مورد عصاره‌های اتانولی، عکس این حالت است و اندام‌های زایشی، درصد مهار جهش بیشتری دارند.

نتایج بررسی تأثیر عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی مرزنگوش بر مهار جهش‌زایی آزید سدیم در حضور S9 نشان می‌دهد که میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی در حضور عصاره‌های مختلف اندام‌های رویشی و زایشی به ترتیب عصاره آبی: ۲۹۲، ۳۷۸، عصاره اتانولی: ۶۴۱، ۴۸۷ و عصاره متانولی: ۴۳۱، ۴۷۲ است که در مقایسه با میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی در شاهد مثبت (۸۵۸)، بسیارکمتر و دارای اختلاف معنی‌داری در حد $p<۰/۰۵$ هستند.

میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی در حضور S9 برای عصاره اتانولی اندام‌های رویشی، بیشترین و برای عصاره آبی اندام‌های رویشی کمترین تعداد است و این میانگین تعداد در مورد عصاره‌های آبی و متانولی اندام‌های زایشی، بیشتر از اندام های رویشی است؛ ولی در مورد عصاره اتانولی، اندام‌های رویشی بیشتر از اندام‌های زایشی است (جدول ۲ و نمودار ۱). درصد مهار جهش عصاره‌های آبی و متانولی اندام‌های رویشی، بیشتر از اندام های زایشی است؛ ولی برای عصاره اتانولی عکس این حالت است (جدول ۲ و نمودار ۲).

بررسی آماری فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی نشان داد که در نتایج مربوط به تعداد کلنی‌های برگشتی، بین استفاده از S9 و عدم استفاده از آن، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد؛ ولی در مورد درصد مهار جهش، بین استفاده از S9 و عدم استفاده از آن، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). بنابراین در غیاب S9 و حضور S9، عصاره‌ها درصد ضدجهشی و ضدسرطانی متفاوتی نشان می‌دهند.

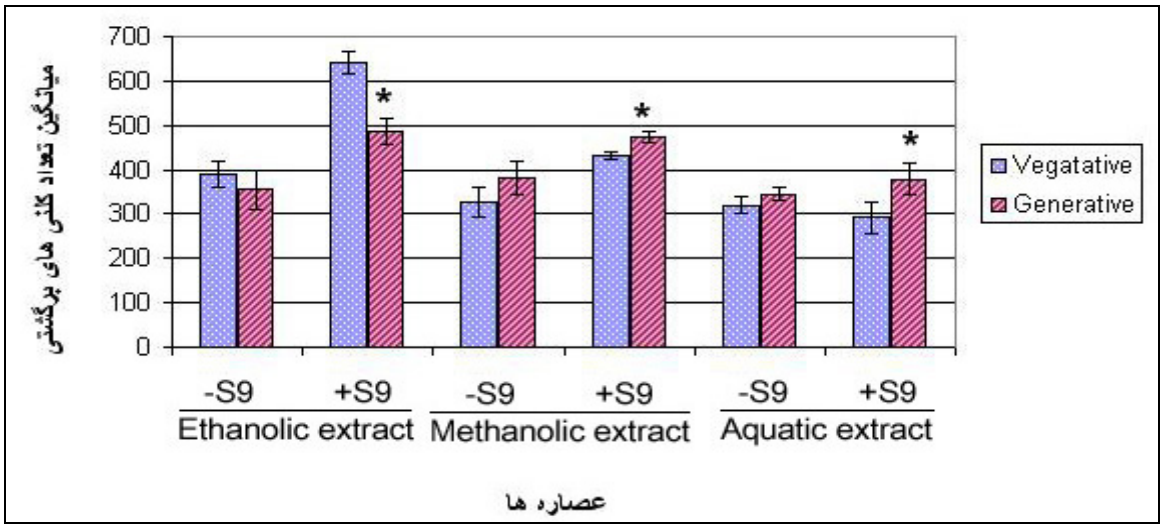
بررسی آماری فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی نشان داد که بین نتایج عصاره‌های اندام‌های رویشی و زایشی تفاوت معنی‌داری وجود ندارد و اندام‌های زایشی به مقدار جزئی تأثیر بیشتری نسبت به اندام‌های رویشی نشان می‌دهند.

بررسی آماری فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی نشان داد که در نتایج مربوط به تعداد کلنی‌های برگشتی، بین عصاره اتانولی و آبی، تفاوت معنی‌داری وجود دارد ($p<۰/۰۵$). نتایج به دست آمده نشان می‌دهد که درصد مهار جهش بین هر سه عصاره، دارای اختلاف معنی‌داری است ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱ - نتایج بررسی اثر ضدجهشی و ضدسرطانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی گیاه مرزنگوش با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم TA100.

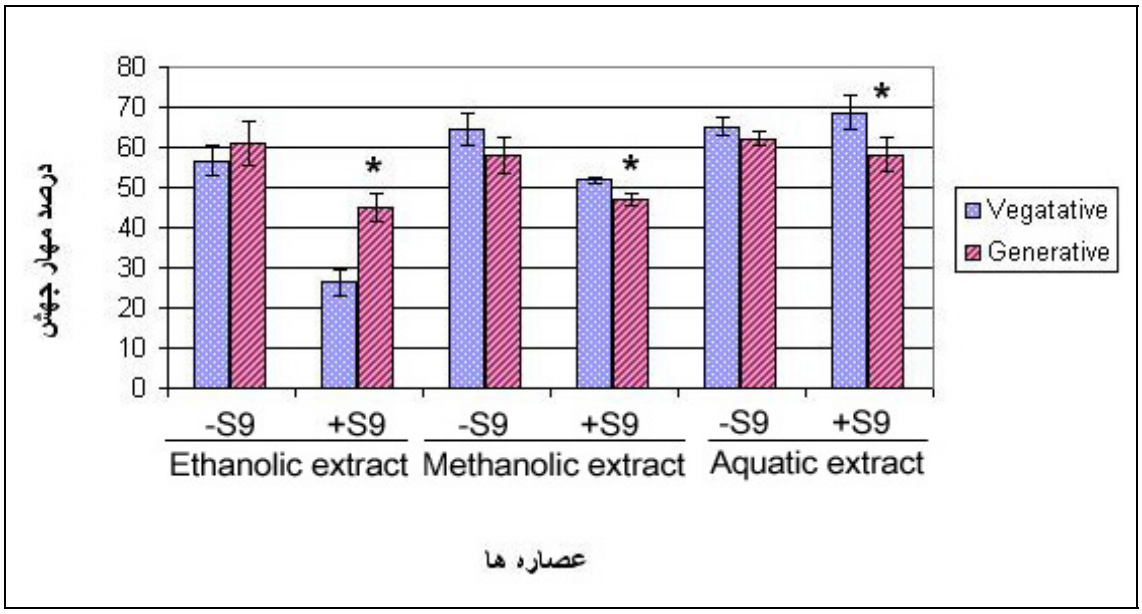
	(-S9) TA100		(+S9) TA100	
	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد مهار جهش	میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد مهار جهش
شاهد منفی	۳۴±۲/۵۱	-	۳۴±۲/۵۱	-
شاهد مثبت	۸۵۸ ±۲۳۹/۴۴	-	۸۵۸±۲۳۹/۴۴	-
عصاره اتانولی رویشی	۳۹۱± ۳۰/۱۰ *	۵۶/۶۸±۳/۶۵	۶۴۱±۲۵/۱۲*	۲۶/۳۰±۳/۰۵
عصاره اتانولی زایشی	۳۵۵±۴۴/۳۶ *	۶۰/۹۷±۵/۳۸	۴۸۷±۲۸/۹*	۴۵/۰۲±۳/۵۰
عصاره متانولی رویشی	۳۲۶±۳۴/۰۳ *	۶۴/۴۸±۴/۱۲	۴۳۱±۷/۶۳*	۵۱/۸۲±۰/۹۲
عصاره متانولی زایشی	۳۸۱± ۳۷/۳۲*	۵۷/۸۵±۴/۵۳	۴۷۲±۱۲/۴۵*	۴۶/۸۱±۱/۵۰
عصاره آبی رویشی	۳۲۰ ±۱۷/۷۰ *	۶۵/۲۵±۲/۱۴	۲۹۲±۳۵/۱۰*	۶۸/۶۹±۴/۲۵
عصاره آبی زایشی	۳۴۵± ۱۴/۴۹ *	۶۲/۲۲+۱/۷۵	۳۷۸±۳۵/۵۷*	۵۸/۲۵±۴/۳۱

S9-: بدون S9 و S9+: با حضورS9. نتایج به صورت Mean ± S.E.M. ارائه شده است. * نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین انواع عصاره‌ها با شاهد مثبت (p<۰/۰۵) است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی گیاه مرزنگوش در حضور S9 (+S9) و عدم حضور S9 (-S9) ± خطای معیار عصاره‌های مختلف (S.E.M.).

* نشان‌دهنده اختلاف گروه S9+ نسبت به S9 - در هر تیمار است (p<۰/۰۵).



نمودار ۲- مقایسه درصد مهار جهش عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی گیاه مرزنگوش در حضور S9 (S9+) و عدم حضور S9 (S9-) ± خطای معیار عصاره‌های مختلف (S.E.M.).

* نشان‌دهنده اختلاف گروه S9+ نسبت به S9 - در هر تیمار است ($p<0/05$).

بحث

کاربرد روش ایمز (Ames) در این تحقیق به عنوان آزمونی استاندارد و دقیق برای شناسایی ترکیبات بازدارنده جهش است. در روش ایمز، سویه‌های جهش یافته سالمونلاتیفی‌موریوم برای شناسایی ترکیبات ضدجهشی به طور گسترده‌ای استفاده می‌شود. در این پژوهش، جهش‌یافتگی سالمونلاتیفی‌موریوم TA100 با جدول پروفسور ایمز که در سال ۱۹۹۸ بر اساس آخرین تحقیقات ارائه شده است (۱۳) همسویی نشان داد و سوش TA100 تأیید شد.

در این بررسی، از شاهد مثبت و شاهد منفی استفاده شد. شاهد منفی نشان‌دهنده توانایی باکتری‌ها به جهش‌های برگشتی است و کلنی‌های رشد یافته، تأییدی بر این موضوع هستند. پلیت‌های شاهد مثبت نیز دارای ماده جهش‌زای آزید سدیم هستند. در حضور ماده جهش‌زای آزید سدیم، تعداد کلنی‌ها با جهش برگشتی به میزان زیادی افزایش یافت که این افزایش نشان‌دهنده جهش‌زا بودن آزید سدیم است. این نتایج با گزارش‌های Ames و همکارانش در سال۱۹۸۳ و ۱۹۹۸ در مورد جهش‌زا بودن آزید سدیم همسویی دارد (۱۱،۱۳).

فعالیت ضدجهشی با کاهش تعداد جهش‌های برگشتی در مقایسه با شاهد مثبت نشان داده می‌شود و روشی است که به طور رایج در آزمایشگاه‌های سراسر دنیا استفاده می‌شود (۱۶). بررسی نتایج نشان می‌دهد که تعداد کلنی‌های با جهش برگشتی در حضور عصاره‌ها در مقایسه با شاهد مثبت کاهش یافته است که نشان‌دهنده فعالیت ضدجهشی عصاره‌ها است.

درصد مهار جهش توسط عصاره‌های تهیه شده از اندام‌های رویشی و زایشی گیاه مرزنگوش نیز طبق فرمول Ong (1983) محاسبه می‌شود (۱۵). بر اساس این فرمول درصد مهار جهش بیش از ۴۰ درصد؛ ۲۵ تا ۴۰ درصد و کمتر از ۲۵ درصد؛ به ترتیب قوی، متوسط و ضعیف محسوب می‌شوند. نتایج به دست آمده از این تحقیق، با فرمول Ong (1983) مطابقت دارد؛ به طوری

که درصد مهار جهش همه عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی، بیش از ۴۰ درصد است. بنابراین، عصاره‌های ذکر شده بخش‌های رویشی و زایشی مرزنگوش، درصد مهار جهش قوی نشان می‌دهند.

بررسی تکوینی نتایج استفاده از عصاره اندام‌های رویشی و زایشی مرزنگوش در غیاب S9 نشان می‌دهد که بخش‌های رویشی و زایشی مرزنگوش دارای فعالیت ضد جهشی هستند و اختلاف معنی داری ندارند.

به منظور بررسی فعالیت ضد سرطانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی مرزنگوش، از عصاره میکروزومی کبد موش استفاده می‌شود. بررسی‌هایی که با استفاده از میکروسکوپ الکترونی بر روی بخش میکروزومی انجام شده نشان می‌دهد که میکروزوم ها از قطعاتی از سیستم واکوئلی و نیز قطعات شبکه آندوپلاسمی صاف و زبر و دستگاه گلژی ساخته شده‌اند و در یاخته‌های زنده و سالم دیده نمی‌شوند، بلکه ضمن خرد کردن یاخته‌ها، لوله‌ها و کیسه‌های شبکه آندوپلاسمی شکسته می‌شوند و قطعات غشایی شبکه به سرعت حفره‌های میکروزومی را به‌وجود می‌آورند. در غشای میکروزوم‌ها نوعی هموپروتئین به نام سیتوکروم P_{450} وجود داردکه در یاخته‌های کبدی، بیش از سایر یاخته‌ها یافت می‌شود و مقدار آن ضمن تیمار جانوران با عوامل القایی مختلف تغییر می‌کند (۱۷).

سیتوکروم P_{450} به صورت یک اکسیداز انتهایی عمل کرده و در کبد، عمل سم‌زدایی دارد و عوامل زیان‌بار و تعدادی از مواد دارویی را از طریق اکسیداسیون و نیز هورمون‌های استروئیدی را با هیدروکسیلاسیون غیرفعال می‌سازد (۱۸). در حضور عصاره میکروزومی، فعالیت متابولیکی برخی ترکیبات در جهت مهار جهش تقویت می‌شود. بنابراین، استفاده از عصاره میکروزومی به منظور بررسی فعالیت ضدسرطانی عصاره‌های گیاهی در بدن و برقراری ارتباط بین سیستم پروکاریوتی با سیستم یوکاریوتی ضروری است.

نتایج استفاده از عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی در حضور S9 با نتایج استفاده از عصاره‌های گیاهی در غیاب S9، دارای تفاوت معنی‌داری است. استفاده از S9 تأییدی بر فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی عصاره گیاه یا مواد مورد بررسی است و میزان مهار جهش همه عصاره‌ها به جز عصاره اتانولی اندام‌های رویشی، در حضور S9 بیش از ۴۰٪ و درصد مهار جهش عصاره اتانولی اندام‌های رویشی کمتر از ۴۰ درصد (۴۰-۲۵ درصد) است. بنابراین، عصاره‌های آبی و متانولی اندام‌های رویشی و زایشی و عصاره اتانولی اندام‌های زایشی، درصد مهار جهش قوی و عصاره اتانولی اندام‌های رویشی درصد مهار متوسط را نشان می‌دهند. در بین نتایج حاصل، عصاره آبی اندام‌های رویشی درصد مهار جهش قوی‌تری دارد. اندام‌های رویشی و زایشی گیاه، به تنهایی تفاوت معنی‌داری نداشته و عامل اصلی در تعیین خواص ضدجهشی و ضدسرطانی، نوع حلال به کار رفته برای استخراج عصاره است.

آنتی‌اکسیدان‌های فنلی، از ترکیبات اصلی مرزنگوش هستند که نقش مهمی در به تأخیر انداختن پیشرفت بیماری‌های مزمن و مرتبط با تنش اکسیداتیو از قبیل بیماری‌های قلبی- عروقی، سرطان، سندرم التهابی، آلزایمر و انواع دیابت ایفا می‌کنند (۱۹،۲۰). تأثیر حدود ۱۰۰ جزء خالص اسانس‌های مرزنگوش بررسی شده و این که فنل‌ها بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته‌اند، تأیید شده است (۲۱). ۴۰ درصد ترکیبات فنلی در آب و ۶۰ درصد در عصاره‌های اتانولی مرزنگوش یافت شده است (۲۲). اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های الکلی مرزنگوش عموماً به خاطر وجود رزمارینیک اسید و کافئیک اسید است (۳،۴،۲۳). رزمارینیک اسید، یک کافئویل استر (caffeoyl ester) است که توسط متانول به راحتی استخراج می‌شود و یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مهم است (۲۴،۲۵). تیمول و کارواکرول از اجزای اصلی اسانس مرزنگوش هستند که اثر آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی بر فرایند پراکسیداسیون چربی دارند (۵،۶) و در حلال‌های الکلی،

بیشتر از آب حل می‌شوند. بسیاری از فلاونوئیدهای گیاهی، اثر ضدسرطانی در نمونه‌های جانوری را نشان داده‌اند (۲۶،۲۷،۲۸). به علاوه، برخی فلاونوئیدهای گیاهی ممکن است از سرطان زایی در دستگاه گوارش ممانعت کنند (۹). اثر احتمالی ضدتوموری برخی از فلاونوئیدها نیز قابل توجه است (۲۹). گیاه مرزنگوش به علت داشتن این ترکیبات، دارای خاصیت ضدسرطانی است. قرن‌هاست که ترکیبات فلاونوئیدی به عنوان جزء فعال فیزیولوژیکی اصلی برای درمان بیماری‌های انسان استفاده می‌شود (۳۰) و نتایج تحقیق حاضر از فعالیت ضدجهشی و ضدسرطانی اندام‌های رویشی و زایشی مرزنگوش با مطالعات (۱۰) در مورد فعالیت زیاد مرزنگوش بر علیه سرطان مطابقت دارد. اثرات مثبت مرزنگوش بر سلامت انسان، به فعالیت آنتی‌اکسیدان آن، هم در اسانس مرزنگوش و هم در ترکیبات فنلی محلول آن مربوط می‌شود (۲۴،۲۵،۳۱). آسکوربیک اسید و کاروتنوئیدها نیز از آنتی‌اکسیدان‌های موجود در مرزنگوش هستند (۳۲) که آسکوربیک اسید در آب حل می‌شود. درصد جلوگیری از رادیکال (ABTS+)1-1-diphenyl-2 picryhydrazyl-2-radical در عصاره‌های آبی بیشتر از عصاره‌های اتانولی است (۲۲) و پیشنهاد شده است که حساسیت آزمایش‌ها به سمت آنتی اکسیدان‌های محلول در آب است. Rodriguez- Meizoso و همکارانش در سال ۲۰۰۶ از عصاره‌های آبی برای استخراج مواد آنتی‌اکسیدانی مرزنگوش استفاده کردند. در دماهایی مانند ۲۵°C بیشترین مقدار ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنل‌ها استخراج شد (۳۳). پروتوکاتچوئیک اسید هم یکی از ترکیبات فنلی با خاصیت آنتی‌اکسیدان است که در آب بیشتر از اتانول حل می‌شود (۲۲) و همان‌طور که قبلاً هم ذکر شد، دو نوع آنتی‌اکسیدان محلول در الکل و محلول در آب می‌توانند با یکدیگر همسو فعالیت کنند (۳۴).

نتایج آزمایش‌ها درباره خاصیت ضدجهشی و ضدسرطانی عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی مربوط به ترکیبات مختلف استخراج شده توسط حلال‌ها نشان می‌دهند که نوع حلال، در خواص آنتی‌اکسیدان عصاره‌ها مؤثر است و هر یک از حلال‌ها، نوع خاصی از ترکیبات را استخراج می‌کنند. این نتایج، با سایر گزارش‌های موجود مطابقت دارد (۶-۳، ۳۳،۳۲،۲۳،۳۲).

وجود خواص ضدجهشی و ضد توموری عصاره مرزنگوش، انجام تحقیقات بیشتر در مورد زمان برداشت بخش‌های زایشی، جنس خاک محل کشت یا رویش گیاهان، دمای محیط و نوع حلال‌هایی را که برای استخراج عصاره‌ها به کار گرفته می‌شوند، ضروری می‌سازد.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از تمام کسانی که در انجام این پژوهش همکاری داشته‌اند، به ویژه حوزه معاونت پژوهشی واحد علوم و تحقیقات تشکر می‌نماییم.

منابع

1- Srivastava, V., Negi, A.S., Kumar, J.K., Gupta, M.M., Suman, P.S., Khanuja, S. 2005. Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. J Bioorganic & Medicinal Chemistry 13 :5892-908

۲-عرفانی، ح. ۱۳۸۴. صد گیاه و هزار درمان، انتشارات سکه، صفحات ۴۲-۳۳۹.

3- Kramer, R.E. 1985. Antioxidants in clove. Journal of American Oil Chemical Society 62:111-3.

4- Herrmann, K., Schutte, M., Muller, H. 1981. Uber die antioxidative Wirkung von Gewuze. J Deutsch Lebensm– Rdsch 77:134-8.

5- Lagouri. V., Blekas. G., Tsimidou, M., Kokkini, S., Boskou, D. 1993. Composition and antioxidant activity of essential oil from Oregano plants grown in grown in Greece. J Lebensmitt. Unters. Forsch 197:20-3.

6- Tsimidou, M., Boskou, D. 1994. Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In: G. Charalambous (Ed.), Spices, herbs and edible fungi. Amsterdam: Elsevier. pp. 273-84.

7- Milos, M., Mastelic, J. Jerkovic, I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. Hirtum). J Food Chemistry 71:79-83.

8- Unver, A., Arslan, D., Ozcan, M.M. Akbulut, M. 2009. Phenolic content and antioxidant activity of some spices. World Applied Sciences Journal 6(3):373-7.

9- Skerget M., Kotnik P., Hadolin M., Rizner Hras A., Simonic M., Knez Z. 2005. Phenols, proanthocyanidins, flavones and flavonols in some plant materials and their antioxidant activities. J Food Chemistry 89:191-8.

10- Goun, E., Cunningham, G., Solodnikov, S., Krasnykch, O., Miles, H. 2002. Antithrombin activity of some constituents from *Origanum vulgare*. J Fitoterapia 73:692-4.

11- Maron, D.M., Ames, B.N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutation Research 113:173-215.

12- Ames, B.N., Mac-Cann, J., Yamasaki, E. 1976. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella* mammalian microsome mutagenicity test, Mutation Research. 31:347-9.

13- Ames, B.N., Gold, L.S. 1998. The causes and preventation of the role of environment. J Biotherapy 11:205-20.

14- Ong, T.M., Whong, W.Z., Stewart, J., Brockman, H.E. 1986. Chlorophyllin: a potent antimutagen against environmental and dietary complex mixtures. J Mutation Research Letters 173:111-5.

15- Ong, T.M., Whong, W.Z., Richard, G., Ames, B.N. 1983. Gastric cancer in coal miners: An hypothesis of coal mine dust causation. J Medical Hypotheses 12:159-65.

16- Gizatullin, F.S., Babynin, E.B. 1996. The selection induced his+ reversion *Salmonella typhimurium*. Mutat Res 357: 43-56.

17- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C.A., Krieger, M., Scott, M.P. Zipursky, S.L., Darnell, J. 2004.

Molecular cell Biology. W.H. Freeman and Company. 963.

۱۸- مجد ا.، شریعت زاده م.ع. ۱۳۸۴. زیست شناسی سلولی و مولکولی. نشر آییژ. صفحه ۳۰۳.

19- Shetty, K. 1997. Biotechnology to Harness the benefits of dietary phenolics: focus on *Lamiaceae*. Asia Pacific J Clin Nutr 6 :162-71.

20- Akyon, Y. 2002. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori.* J Clin Microbiol Infect 8:438-41.

21- Ruberto, G., Barrata, M.T. 2000. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. J Food Chemistry 69:167-74.

22- Chun, S.S., Vattem, D.A., Lin, Y.T., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. J Process Biochemistry 40:809-16.

23- Chevolleau, S., Mallet, J.F., Ucciani, E., Gamisans, J., Gruber, M. 1992. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. Journal of American Oil Chemical Society, 69:1269-71.

24- Peak, P.W., Pussel, B.A., Martyn, P., Timmermans, V., Charlesworth, J.A. 1991. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complement involves the C5 convertase. J Immunopharmacol 13:853-7.

25- Engleberger, W., Hadding, V., Etschenber, E., Graf, E., Leyck, S., Windelmann, J. 1988. Rosmarinic acid: A new inhibitor of complement C3-convertase with anti–inflammatory activity. J Immunopharmacol 10:729-37.

26- Miean, K.H., Mohamed, S. 2001. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin and apigenin) content of edible tropical plants. Journal of Agriculture and Food Chemistry 49:3106-12.

27- Merken, H.M., Beecher, G. 2000. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: A review. Journal of Agriculture and Food Chemistry 48:577-99.

28- Karakaya S., Sedef Nehir E.L. 1999. Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods. J Food Chemistry 66:289-92.

۲۹- شریعت‌زاده، م. ع.، فانی، ع.، ملکی‌راد، ع. ا.، دزفولیان، ع. ر.۱۳۸۶. رادیکال‌های آزاد، آنتی‌اکسیدان‌ها و اثرات آنها در سلامت و بیماری، نشر آییژ، صفحه ۱۸۳.

30- Havsteen B. 1983. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. J

Biochemical pharmacology, 32(7):1141-8.

31- Eguchi, Y., Curtis, O.F., Shetty, K. 1996. Interaction of hyperhydricity–prevent *Pseudomonas* sp. with oregano (*Origanum vulgare)* and selection of high phenolics and rosmarinic acid- producing lines. Food Biotechnology 10(3):191-202.

32- Capecka, E., Mareczek, A., Leja, M. 2005. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. J Food Chemistry 93:223-6.

33- Rodriguez-Meizoso, I., Marin, F.R., Herrero, M., Senorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibanez, E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41:1560-5.

34- Shetty, K., Wahlqvist, M.L. 2004. A model for the role of proline–linked pentose phosphate pathway in phenolic phytochemical biosynthesis and mechanism of action for human health and environmental aplications. Asia Pacific J Clin Nutr 13:1-24.