مجله دانشکده پزشکی اصفهان
سال سی‌ام/شماره ۲۱۵/هفته اول بهمن ماه ۱۳۹۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۷/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۹/۲۸

بررسی اثر ژنوپروتکتیو عصاره‌های آبی و متانولی اندام هوایی کرفس کوهی بر آسیب ناشی از ماده‌ی ژنوتوکسیک متیل متان سولفونات

دکتر محمود اعتباری[۱]، دکتر سید ابراهیم سجادی[۲]، دکتر عباس جعفریان دهکردی[۳]، معصومه پناهی[۴]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: تخریب DNA به دنبال تماس با عوامل توکسیک گوناگون می‌تواند سبب افزایش خطر سرطان شود. گیاه کرفس کوهی یکی از گیاهان اندمیک ایران می‌باشد که مصرف خوراکی و دارویی دارد. با توجه به خوراکی بودن این گیاه، هدف از این مطالعه بررسی اثر محافظتی عصاره‌های آبی و متانولی کرفس کوهی بر آسیب به DNA ناشی از MMS (Methyl methanesulfonate) بود.

روش‌ها: روش ارزیابی Comet (Comet assay)، یک روش سریع، حساس و کم هزینه می‌باشد که در این مطالعه برای ارزیابی اثرات ژنوپروتکتیو کرفس کوهی بر روی رده‌ی سلولی $HepG_2$ مورد استفاده قرار گرفت. در این روش بعد از انکوبه کردن سلول‌ها با غلظت‌های مختلف از هر عصاره، سلول‌ها به مدت یک ساعت با MMS مجاورت داده شدند. سوسپانسیون سلولی به لام‌های پوشیده از آگاروز ۱ درصد اضافه شد و سپس به ترتیب مراحل لیز سلول، الکتروفورز، خنثی کردن و رنگ‌آمیزی صورت گرفت. با کمک نرم‌افزار Comet score، عوامل آسیب به DNA نظیر Tail length، درصد DNA in tail و Tail moment ارزیابی شد.

یافته‌ها: غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی آبی و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی متانولی باعث کاهش معنی‌دار در آسیب به DNA سلول‌های $HepG_2$ ناشی از MMS شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج بیانگر اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک عصاره‌های آبی و متانولی کرفس کوهی در برابر آسیب DNA ناشی از MMS می‌باشد. ممکن است استفاده از این گیاه بتواند از عوارض ناشی از مواد ژنوتوکسیک پیشگیری کند.

واژگان کلیدی: روش Comet، کرفس کوهی، ژنوپروتکتیو، آنتی‌ژنوتوکسیسیتی

ارجاع: اعتباری محمود، سجادی سید ابراهیم، جعفریان دهکردی عباس، پناهی معصومه. **بررسی اثر ژنوپروتکتیو عصاره‌های آبی و متانولی اندام هوایی کرفس کوهی بر آسیب ناشی از ماده‌ی ژنوتوکسیک متیل متان سولفونات.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۵): ۲۰۷۱-۲۰۶۲

مقدمه

امروزه استفاده از فراورده‌های گیاهی در مصارف خوراکی و دارویی رو به افزایش است. علاوه بر این، بسیاری از داروهای مورد استفاده نیز دارای منشأ

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای حرفه‌ای به شماره‌ی ۳۸۹۳۸۵ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- استادیار، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲- استاد، گروه فارماکوگنوزی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳- استاد، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴- دانشجوی دکترای داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی و مرکز تحقیقات علوم دارویی اصفهان، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
نویسنده‌ی مسؤول: دکتر محمود اعتباری
Email: etebari@pharm.mui.ac.ir

گیاهی می‌باشند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به داروهای ضد سرطان وین‌کریستین و وین‌بلاستین و داروی کاردیوتونیک دیگوکسین اشاره نمود. ایران فلات وسیعی می‌باشد که از اقلیم‌ها و محیط‌های گوناگون برخوردار است، به همین دلیل گونه‌های گیاهی متنوعی در آن یافت می‌شود (۱).

گیاه کرفس کوهی با نام علمی Kelussia odoratissima Mozaff. از گیاهان متعلق به خانواده‌ی چتریان (Umbelliferae) می‌باشد. این گیاه تنها گونه‌ی جنس Kelussia است و مونوتیپ ایران است که فقط در چند ناحیه‌ی محدود از ارتفاعات زاگرس مرکزی یافت می‌شود. این گیاه مصرف خوراکی زیادی دارد که بیشتر به عنوان چاشنی مصرف می‌شود (۲).

طی تحقیقات انجام شده روی خواص فارماکولوژیک این گیاه، اثرات ضد درد و التهاب (۳)، آرام‌بخش (۴)، فیبرینولیتیک (۵)، کاهنده‌ی اسید و پپسین معده (۶) و تقویت‌کننده‌ی حافظه (۷) مشاهده شده است. همچنین بر طبق مطالعات انجام شده، این گیاه دارای فلاونویید، ترکیبات فتالیدی، اسیدهای چرب و مواد فنولی می‌باشد که اثرات پیشگیری از سرطان (۸) و محافظت از کبد (۹) به آن‌ها نسبت داده شده است. همچنین به دلیل دارا بودن ترکیبات فنولی و فلاونویید‌ها، این گیاه دارای خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد و اثرات آنتی‌اکسیدانی است که با آلفا توکوفرول قابل مقایسه می‌باشد (۱۰).

عوامل مختلف فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیک می‌توانند بر ژنوم موجودات زنده اثرات نامطلوبی همچون جهش‌زایی و شکست کروموزومی داشته باشند، که می‌تواند باعث افزایش خطر بروز بیماری‌های ژنتیکی و یا مقدمه ایجاد سرطان‌های احتمالی شوند (۱۱).

تاکنون گزارش‌های متعددی مبنی بر استفاده از ترکیبات گیاهی به منظور محافظت از ژنوم و جلوگیری از تأثیر عوامل آسیب‌رسان به DNA منتشر شده است (۱۵-۱۲). روش Comet (Comet assay)، یک آزمون بسیار حساس جهت تعیین آسیب به DNA می‌باشد. این روش قادر به ارزیابی مستقیم شکست DNA تک رشته‌ای و دو رشته‌ای در سلول‌های منفرد می‌باشد. در تحقیقات متعدد از روش Comet برای تعیین اثرات ژنوتوکسیک ترکیبات و نیز جهت مشخص نمودن اثرات محافظتی ترکیبات طبیعی بر DNA در مطالعات درون‌تن (In vivo) و برون‌تن (In vitro) استفاده شده است (۲۱-۱۶، ۱۳).

برای این پژوهش سلول‌های $HepG_2$ (Liver hepatocellular cells) انتخاب گردیدند. این سلول‌ها حاوی آنزیم‌های با قابلیت متابولیسم هستند و در بروز و یا عدم بروز اثرات بیولوژیک ترکیبات شیمیایی و طبیعی نقش اساسی دارند (۱۳).

در این تحقیق، با توجه به وجود ترکیبات بیولوژیک فعال و عوامل آنتی‌اکسیدان و مؤثر در برداشت رادیکال‌های آزاد در کرفس کوهی و با عنایت به مصرف خوراکی آن، پتانسیل محافظتی عصاره‌های آبی و متانولی کرفس کوهی در مقابل MMS (Methyl methanesulfonate) که یک ماده‌ی آلکیله‌کننده می‌باشد و باعث شکست زنجیره‌ی DNA و آسیب به DNA می‌شود، بررسی شد.

روش‌ها

محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ و سرم جنین گاو (FBS

یا Fetal bovine serum) و آنتی‌بیوتیک از شرکت PAA (استرالیا) خریداری گردید. Tris-HCl، NaOH، NaCl، EDTA، ترایتون X-۱۰۰ و MMS از شرکت Merck (آلمان)، آگاروز با نقطه‌ی جوش پایین (Low melting-point یا LMP) و اتیدیوم بروماید و تریپان بلو از شرکت سیگما (آمریکا) و آگاروز با نقطه‌ی جوش معمولی (NMP یا Normal melting-point) از شرکت Cinnagen (ایران) تهیه گردید.

اندام‌های هوایی گیاه کرفس کوهی در ابتدای مرحله‌ی رویشی در اوایل فروردین سال ۱۳۹۰ از ارتفاعات زردکوه بختیاری جمع‌آوری گردیده بود و پس از شناسایی و خشک کردن مورد استفاده قرار گرفت.

۱۰۰ گرم گیاه پودرشده که از الک با مش ۸۰ عبور داده شده بود، جهت تهیه‌ی عصاره‌ی متانولی به روش Soxhlet مورد استفاده قرار گرفت. عصاره‌ی به دست آمده با استفاده از دستگاه روتاری خشک گردید. همچنین عصاره‌ی آبی به روش Maceration تهیه شد. به این منظور ۱۰۰ گرم پودر گیاه که از الک با مش ۸۰ عبور داده شده بود، به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شد. سپس به مدت ۲ ساعت روی دستگاه Shaker قرار داده شد. عصاره بعد از صاف شدن توسط قیف بوخنر، با دستگاه فریزدرایر خشک گردید. عصاره‌ی خشک شده برای انجام تحقیقات بعدی در یخچال نگهداری شد. جهت تهیه‌ی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها، ابتدا استوک غلیظ از هر عصاره تهیه گردید. برای این کار میزان لازم از هر عصاره توزین شد و در محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ حل گردید. سپس غلظت‌های رقیق‌تر با استفاده از محیط کشت RPMI-۱۶۴۰ تهیه شدند.

سلول‌های $HePG_2$ از بانک سلولی طبیعی ایران (National cell bank of Iran یا NCBI) به صورت تک لایه و در فاز لگاریتمی رشد تهیه شدند و برای رشد به محیط کشت کامل (حاوی ۴۵ میلی‌لیتر RPMI-۱۶۴۰، ۵ میلی‌لیتر FBS و ۲۵۰ میکرولیتر پنی‌سیلین/استرپتومایسین) انتقال داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و CO_2 نگهداری شدند.

هنگامی که دانسیته‌ی سلولی به سطحی رسید که همه‌ی فضای فلاسک اشغال شد، سلول‌ها با محلول بافر فسفات (PBS یا Phosphate buffered saline) شستشو داده شدند و با اضافه کردن تریپسین ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا گردیدند. برای شمارش سلول‌ها و تعیین تعداد سلول‌ها در هر میلی‌لیتر از سوسپانسیون سلولی، سوسپانسیون حاوی محیط کشت جدید به خوبی ورتکس گردید و سپس پیپتاژ شد تا به طور کامل یکنواخت شود و سلول‌ها نیز از هم جدا شوند. سوسپانسیون سلولی تهیه‌شده با میکروپیپت به لام هموسیتومتر منتقل شد و با استفاده از میکروسکوپ با بزرگنمایی ۱۰، سلول‌های زنده شمارش شدند. غلظت سوسپانسیون سلولی 10^6 سلول در هر میلی‌لیتر مطلوب در نظر گرفته شد و زمانی که بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها زنده بودند برای مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفتند (۲۱).

سلول‌ها در ابتدا در معرض غلظت‌های مختلف عصاره‌ها (۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ی آبی و غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۵ میکروگرم از عصاره‌ی متانولی) قرار داده شدند و پس از انکوباسیون و تعویض محیط کشت، به آن غلظت یک

میکرومولار از MMS اضافه گردید (۱۴-۱۳). در تمام مراحل از شاهد منفی (فقط سوسپانسیون سلولی) و شاهد مثبت (چاهک حاوی MMS و سوسپانسیون سلولی) نیز استفاده شد. پس از پایان انکوباسیون، با افزودن تریپسین عمل جداسازی سلول‌ها از کف چاهک انجام شد. محتوای چاهک‌ها به فالکون‌های پنج میلی‌لیتری منتقل شد و طی ۵ دقیقه با دور ۱۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید و محیط کشت تعویض شد. سوسپانسیون‌های سلولی حاوی محیط کشت جدید جهت انجام آزمون Comet استفاده شدند.

میزان شکست تک زنجیره و دو زنجیره‌ی DNA با استفاده از روش Comet سنجیده شد. ابتدا پوشش نازکی از محلول ۱ درصد آگاروز NMP در PBS عاری از Mg^{+2} و Ca^{+2} بر روی لام‌های سر سمباده‌ای قرار داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد خشک شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از مخلوط سوسپانسیون سلولی و آگاروز LMP در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تهیه گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از آن روی لام سر سمباده‌ای قرار داده شد و سپس به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد منجمد گردید.

در این مرحله لام‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در محلول لیز کننده‌ی (Lysing) تازه تهیه شده و سرد با pH = ۱۰-۱۰/۵ (۲۰۰ میلی‌مول NaoH، Triton X-100 ۱ درصد، ۱۰۰ میلی‌مول EDTA، ۲/۵ مول NaCl و ۱۰ میلی‌مول Tris HCl) قرار گرفتند و در نهایت با آب دیونیزه‌ی سرد به مدت ۱۵ دقیقه برای ۲ الی ۳ مرتبه شستشو داده شدند.

به منظور باز شدن DNA و تک زنجیره‌ای شدن آن، لام‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در بافر تانک با pH = ۱۳-۱۳/۵ (۳۰۰ میلی‌مول NaOH و ۱ میلی‌مول EDTA) گذاشته شدند و پس از آن الکتروفورز (بافر تانک با pH = ۱۳-۱۳/۵، ولتاژ ۲۵ ولت و جریان ۳۰۰ میلی‌آمپر) به مدت ۲۰ دقیقه در شرایط دمایی کمتر از ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و محیط تاریک انجام شد.

جهت خنثی کردن pH قلیایی لام‌ها، بافر خنثی کننده (Tris-HCl ۰/۴ مول با pH = ۷/۵) به لام‌ها اضافه شد. لام‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال قرار گرفتند. جهت رنگ‌آمیزی سلول‌ها به هر لام خشک‌شده ۲۰۰ میکرولیتر اتیدیوم بروماید با غلظت ۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اضافه گردید. پس از ۵ دقیقه مجاورت، در سه مرحله لام‌ها با آب دیونیزه شستشو داده شدند (۲۲). آزمایشات در سه روز مختلف تکرار گردید.

میزان حرکت DNA در میدان الکتریکی با استفاده از میکروسکوپ فلورسانت با بزرگنمایی × ۴۰۰ و شرایط Excitation filter برابر ۵۶۰-۵۱۵ نانومتر و Barrier filter برابر با ۵۹۰ نانومتر تعیین گردید و عکس گرفته شد (۲۱).

با کمک نرم‌افزار Comet score، فاکتورهای شاخص شکست DNA شامل Tail length، درصد DNA in tail و Tail moment به طور کمی تعیین شدند.

نتایج به صورت انحراف معیار ± میانگین گزارش داده شد و داده‌های مربوط به شاخص‌های Comet با استفاده از آزمون ANOVA و سپس برای مقایسه‌ی اختلاف بین گروه‌ها توسط آزمون تعقیبی Student-Newman-Keuls آنالیز گردیدند. $P < ۰/۰۵$

به عنوان معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد.

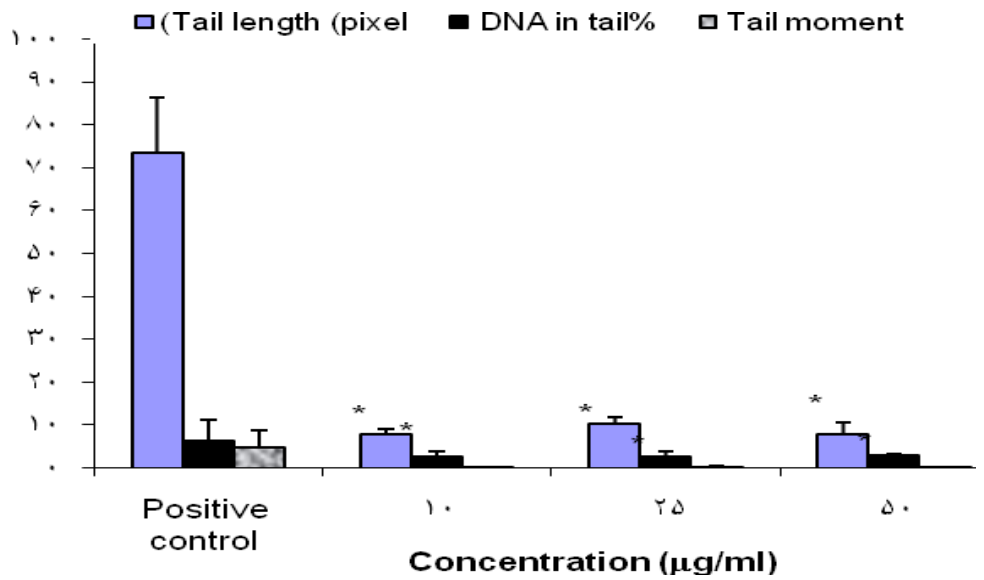
یافته‌ها

برای ارزیابی اثرات آنتی‌ژنوتوکسیتی عصاره‌ی آبی، سلول‌ها به مدت یک ساعت با غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره انکوبه شدند و پس از شستشو به مدت یک ساعت با غلظت یک میکروگرم در میلی‌لیتر از MMS که دارای اثرات ژنوتوکسیک می‌باشد، مجاورت داده شدند. میزان آسیب به DNA در سلول‌های $HepG_2$ در دو پارامتر Tail length و Tail momen نسبت به شاهد مثبت (MMS) کاهش معنی‌داری‌داشت ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۱).

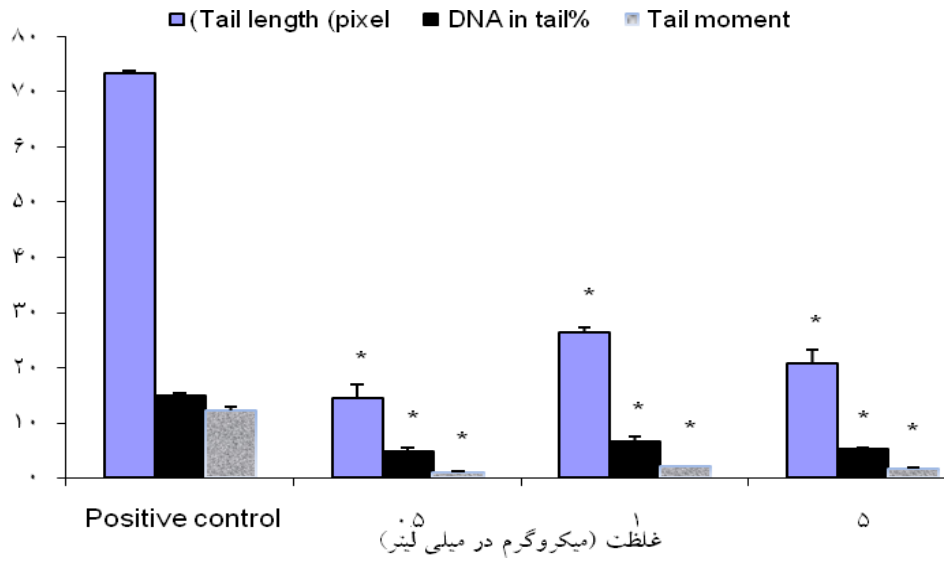
به منظور ارزیابی اثرات آنتی‌ژنوتوکسیتی عصاره‌ی متانولی، سلول‌ها به مدت یک ساعت با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از عصاره انکوبه شدند و پس از شستشو به مدت یک ساعت با غلظت ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از MMS که دارای اثرات ژنوتوکسیک می‌باشد، مجاورت داده شدند. میزان آسیب به DNA در سلول‌های HepG2 در هر سه پارامتر فوق نسبت به شاهد مثبت (MMS) کاهش معنی‌داری داشت ($P < ۰/۰۵$) (شکل ۲).

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره‌های آبی و متانولی کرفس کوهی در غلظت‌های مورد مطالعه دارای قابلیت محافظت از DNA در برابر ماده‌ی ژنوتوکسیک MMS بودند.



شکل ۱. تأثیر عصاره‌ی آبی کرفس کوهی بر میزان ژنوتوکسیسیته ناشی از غلظت ژنوتوکسیک ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از MMS روی سلول‌های $HepG_2$ در مقایسه با شاهد مثبت (سلول‌های $HepG_2$ تیمار شده با غلظت ژنوتوکسیک ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از MMS) به روش Comet *: $P < ۰/۰۵$



شکل ۲. تأثیر عصاره‌ی متانولی کرفس کوهی بر میزان ژنوتوکسیسیته‌ی ناشی از غلظت ژنوتوکسیک ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از MMS روی سلول‌های $HepG_2$ در مقایسه با نمونه‌ی شاهد مثبت (سلول‌های $HepG_2$ تیمار شده با غلظت ژنوتوکسیک ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر از MMS) به روش Comet. *: $P < ۰/۰۵$

روش مورد استفاده در این مطالعه Comet (Comet assay یا SCGE) بود، که در بین روش‌های مورد استفاده برای سنجش آسیب به DNA، یک روش بسیار حساس، آسان، کم هزینه و سریع برای اندازه‌گیری شکست رشته‌های DNA در سلول‌های منفرد می‌باشد (۲۴-۲۳، ۱۳).

رده‌ی سلولی مورد استفاده در این مطالعه $HepG_2$ بود. فرایند SCGE/$HepG_2$ طی مطالعه‌ی Uhl و همکاران استاندارد شد. آنان اثر پارامترهای مختلف (نقش تریپسین، جداسازی مکانیکی سلول‌ها، قابلیت زنده ماندن و تشکیل Comet) با استفاده از ترکیبات پروموتاژنی همچون N-nitrosodimethylamine، benzo [α] pyrene و 2-amino-3-methylimidaza-[4,5-f] quinoline که برای القای آسیب نیاز به فعال‌سازی دارند و ترکیباتی همچون N-nitrosomethylurea که به خودی خود فعال هستند و نیازی به آنزیم‌های متابولیزان ندارند، بررسی نمودند (۲۵).

طی مطالعه‌ی Knasmuller و همکاران نشان داده شد که سلول‌های $HepG_2$ واجد آنزیم‌های فاز اول و دوم بیوترانسفورماسیون هستند و قابلیت فعال‌سازی ترکیبات پروموتاژن را دارا می‌باشند. اثرات ژنوتوکسیک کارسینوژن‌هایی همچون آفلاتوکسین‌ها، آمین‌های آروماتیک هتروسیکلیک، هیدروکربن‌های آروماتیک پلی‌سیکلیک و آلکالوییدهای پیرولیزیدین در این سلول‌ها مطالعه توسط آنان مطالعه شد (۲۶).

در سال‌های اخیر مطالعات زیادی روی اثر آنتی‌ژنوتوکسیسیتی یا اثرات محافظتی عصاره‌های گیاهی بر آسیب‌های وارده به DNA انجام شده است. Ramos و همکاران اثر آنتی‌ژنوتوکسیک سه ماده‌ی روتین، کوئرستین و اورسولیک اسید را در برابر ترکیب ژنوتوکسیک t-BHP بر روی سلول‌های $HepG_2$، به روش Comet بررسی کردند. در این مطالعه اثر سه ترکیب فوق در سه حالت قبل از ماده‌ی ژنوتوکسیک، همراه آن و پس از مجاورت آن بررسی

شد. نتایج نشان دهنده‌ی اثرات مفید کوئرستین در پیشگیری از بروز آسیب در مصرف قبل و همزمان با ترکیب t-BHP بود (۲۷).

Scolastici و همکاران اثر ژنوپروتکتیو لیکوپن در گوجه فرنگی را روی سلول‌های $HepG_2$ در برابر یک ساعت مجاورت با H_2O_2 و ترکیب DEN که یک پروموتاژن می‌باشد، به روش Comet بررسی کردند. در این مطالعه لیکوپن در هر سه حالت پیشگیری از آسیب، مهار آسیب همزمان و ترمیم آن در برابر H_2O_2 مؤثر بود، در حالی که قابلیت ترمیم آسیب ناشی از ترکیب DEN در آن وجود نداشت (۱۴).

زارعی محمودآبادی و همکاران، اثر حفاظتی عصاره‌ی آبی زعفران بر ژنوتوکسیسیته ناشی از آلودگی با سولفور موستارد در سلول‌های ماکروفاژ موش سوری را به روش Comet بررسی کردند. در این تحقیق مشخص شد که عصاره هم در تماس قبل از آسیب و هم در تماس همزمان دارای اثرات سودمندی بوده است، ولی اثرات ترمیمی پس از القای آسیب مشاهده نشد (۱۵).

در این تحقیق قبل از مجاورت سلول‌ها با عامل آسیب‌رسان، سلول‌ها با غلظت‌های مختلف عصاره‌ها انکوبه شدند (روش تماس قبل از آسیب). هم عصاره‌ی آبی و هم عصاره‌ی متانولی از خود اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک در برابر MMS نشان دادند. بنابراین می‌توان گفت کرفس کوهی دارای پتانسیل محافظت از DNA می‌باشد.

طی مطالعات سعیدی و امیدبیگی (۱)، سجادی و همکاران (۲۸) و جابرالانصار (۸) وجود ترکیبات فنولی مانند فلاونوییدها، فرولیک اسید، فتالیدها و ویتامین E در این گیاه به اثبات رسیده است. طی مطالعه‌ی احمدی و همکاران نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل مقایسه با آلفاتوکوفرول در این گیاه به اثبات رسید (۱۰).

در مطالعه‌ی Ramos و همکاران ماده‌ی کوئرستین که یک فلاونویید می‌باشد، خاصیت آنتی‌ژنوتوکسیک از خود نشان داد (۲۷). همچنین مواد فنولی در مطالعه‌ی Zampini و همکاران از خود اثرات آنتی‌ژنوتوکسیک نشان دادند (۱۳). در مطالعه‌ی زارعی محمودآبادی و همکاران، زعفران به عنوان یک ماده‌ی آنتی‌اکسیدان خاصیت آنتی‌ژنوتوکسیکی از خود نشان داده است (۱۵).

در این مطالعه، گیاه کرفس کوهی اثر آنتی‌ژنوتوکسیک در برابر آسیب ناشی از MMS از خود نشان داد. این اثر می‌تواند ناشی از وجود عوامل آنتی‌اکسیدان و ترکیبات فنولی مانند فلاونوییدها، فرولیک اسید و فتالیدهای موجود در آن باشد.

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل انجام طرح تحقیقاتی به شماره‌ی ۳۸۹۳۸۵ در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد. نویسندگان بر خود لازم می‌دانند از مساعدت‌های معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر به عمل آورند. همچنین از خانم مینا میریان کارشناس آزمایشگاه کشت سلولی تشکر می‌گردد.

References

1. Saeedi K, Omidbaigi R. Evaluation of content and composition of fatty acids, total phenolic and essential oil content of Kelussia odoratissima Mozaff seed. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 2009; 25(1): 113-9.
2. Omidbaigi R, Sefidkon F, Saeedi K. Essential oil content and composition of Kelussia odoratissima Mozaff. as an Iranian endemic plant. J Essent Oil Bearing Plants 2008; 11(6): 594-7.
3. Haj Hashemi V, Ghannadi A, Soltani L. Analgesic and anti-inflammatory effects of Amirkabiria Odoratissima. J Res Med Sci 2003; 7(4): 121-5.
4. Rabbani M, Sajjadi SE, Sadeghi M. Chemical composition of the essential oil from Kelussia odoratissima Mozaff. and the evaluation of its sedative and anxiolytic effects in mice. Clinics (Sao Paulo) 2011; 66(5): 843-6.
5. Behagh A, Naderi Gh, Jaafarian A, Asgarian N. Evaluation of fibrinolytic effect of kelussia odoratissima Mozaff. J Med Plants 2006; 4(13): 19-25.
6. Shahrani M, Rafian M, Pilevarian A, Shirzad H, Hashemzadeh M, Yosefi H, et al. Effect of methanolic extract of Kelussia odoratissima Mozaff. on secretion of stomach acid and pepsin in wistar rats. J Shahrekord Univ Med Sci 2006; 8(4): 88-95.
7. Roghani M, Baluch Nejad Mojarrad T, Ramezani M. Evaluation of chronic oral administration effect of aerial part of Kelussia odoratissima Mozaff. on learning and memory in diabetic wistar rats. J Med Plants 2008; 7(27): 98-105.
8. Jaberolansar Z. Assessment of genetic diversity Kelussia odoratissima Mozaff.by using chromosomal characteristics of seed germination. [Thesis]. Isfahan, Iran: Isfahan University of Technology; 2005. p. 21-4.
9. Lee TF, Lin YL, Huang YT. Studies on antiproliferative effects of phthalides from Ligusticum chuanxiong in hepatic stellate cells. Planta Med 2007; 73(6): 527-34.
10. Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food Chem 2007; 105(1): 57-64.
11. Klaassen C. Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons. 7th ed. New York, NY: McGraw-Hill; 2007.
12. Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. Mutat Res 1994; 307(1): 395-410.
13. Zampini IC, Villarini M, Moretti M, Dominici L, Isla MI. Evaluation of genotoxic and antigenotoxic effects of hydroalcoholic extracts of Zuccagnia punctata Cav. J Ethnopharmacol 2008; 115(2): 330-5.
14. Scolastici C, Alves de Lima RO, Barbisan LF, Ferreira AL, Ribeiro DA, Salvadori DM. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. Toxicol In Vitro 2008; 22(2): 510-4.
15. Zarei Mahmoudabadi A, Sharif F, Jafari M. Effect of Crocus sativus L. marine extract on genotoxicity of Syrian mouse macrophages. Kowsar Med J 2011; 16(2): 79-86.
16. Valentin-Severin I, Le HL, Lhuguenot JC, Le Bon AM, Chagnon MC. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. Mutat Res 2003; 536(1-2): 79-90.
17. Laky B, Knasmuller S, Gminski R, Mersch-Sundermann V, Scharf G, Verkerk R, et al. Protective effects of Brussels sprouts towards B[a]P-induced DNA damage: a model study with the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/Hep G2 assay. Food Chem Toxicol 2002; 40(8): 1077-83.
18. Tice R, Vasquez M. Protocol for the application of the pH> 13 alkaline single cell gel (SCG) assay to the detection of DNA damage in mammalian cells [Online] 1999. Available from: URL: http://cometassay.com/Tice%20and%20Vasques.pdf.
19. Etebari M, Zolfaghari B, Jafarian-Dehkordi A, Rakian R. Evaluation of DNA damage of hydro-alcoholic and aqueous extract of Echium amoenum and Nardostachys jatamansi. J Res Med Sci 2012; 17(8): 782-5.
20. Etebari M, Khodarahmi GA, Jafarian-Dehkordi A, Nokhodian Z. Genotoxic effects of some l-[(benzofuran-2-yl)-phenylmethyl]-imidazoles on MCF-7 cell line. Res Pharm Sci 2012; 7(3): 189-95.
21. Etebari M, Ghannadi A, Jafarian-Dehkordi A, Ahmadi F. Genotoxicity evaluation of aqueous extracts of Cotoneaster discolor and Alhagi pseudoalhagi manna by comet assay. Res Pharmac Sci 2012; 7(5): S149.
22. Sardas S. Genotoxicity tests and their use in occupational toxicology as biomarkers. Indoor and Built Environment 2005; 14(6): 521-5.
23. Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. Mutat Res

1995; 339(1): 37-59.
24. Collins AR, Dobson VL, Dusinska M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? Mutat Res 1997; 375(2): 183-93.
25. Uhl M, Helma C, Knasmuller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells. Mutat Res 2000; 468(2): 213-25.
26. Knasmuller S, Parzefall W, Sanyal R, Ecker S, Schwab C, Uhl M, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. Mutat Res 1998; 402(1-2): 185-202.
27. Ramos AA, Lima CF, Pereira ML, Fernandes-Ferreira M, Pereira-Wilson C. Antigenotoxic effects of quercetin, rutin and ursolic acid on HepG2 cells: evaluation by the comet assay. Toxicol Lett 2008; 177(1): 66-73.
28. Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Moayedi N. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of kelussia odoratissima Mozaff. Jundishapur J Nat Pharm Prod 2012; 7(4): 159-62.

Journal of Isfahan Medical School
Received: 16.10.2012
Vol. 30, No. 215, 1st Week, February 2013
Accepted: 18.12.2012

Antigenotoxic Effects of Methanolic and Aqueous Extracts of Kelussia Odoratissima Mozaffarian against Damage Induced by Methyl Methanesulfonate

Mahmoud Etebari PhD[1], Seyed Ebrahim Sajjadi PhD[2], Abbas Jafarian-Dehkordi PhD[3], Masumeh Panahi[4]

Original Article

Abstract

Background: Kelussia odoratissima Mozaffarian is an endemic plant which grows wildly in Iran. The plant is used as food supplement and medical herb in traditional medicine. Extracts and essential oil of the plant have been proved to possess anti-inflammatory, sedative, fibrinolytic, antacid, memory enhancer and antioxidant effects. Damage to deoxyribonucleic acid (DNA) has a very important role in mutagenesis, aging, and cancer. This study aimed to evaluate the protective effects of methanolic and aqueous extracts of K. odoratissima on DNA damage induced by methyl methanesulfonate (MMS).

Methods: The comet assay method was selected to evaluate the antigenotoxicity as it is a fast, sensitive, inexpensive, and easy method to perform. Therefore, after incubation of different concentrations of extracts with liver hepatocellular cells ($HepG_2$) for one hour, cells were exposed to MMS for an hour. Then, cell suspension was added to precoated normal agarose slides. After lysing the cells with lysis solution, electrophoresis method was used to assess DNA damage. Using comet score, tail length, percent of DNA in tail, and tail moment were measured.

Findings: Concentrations of 5, 10, 50 µg/ml of aqueous extracts and 0.5, 1, 5 µg/ml of methanolic extracts of K. odoratissima significantly reduced MMS-induced damage to DNA of $HepG_2$ cells.

Conclusion: We observed the antigenotoxic or genoprotective effect of aqueous and methanolic extracts of K. odoratissima against DNA damage caused by MMS. Therefore, the use of K. odoratissima can probably prevent the complications of these damages.

Keywords: Comet assay, Kelussia odoratissima Mozaffarian, Genoprotective, Antigenotoxicity

Citation: Etebari M, Sajjadi SE, Jafarian-Dehkordi A, Panahi M. **Antigenotoxic Effects of Methanolic and Aqueous Extracts of Kelussia Odoratissima Mozaffarian against Damage Induced by Methyl Methanesulfonate.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(215): 2062-71

* This paper is derived from a Pharm D doctorate thesis No. 389385 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Assistant Professor, Department of Pharmacology and Toxicology AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
2- Professor, Department of Pharmacognosy AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
3- Professor, Department of Pharmacology and Toxicology AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
4- Pharm D Student, Department of Pharmacology and Toxicology AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran
Corresponding Author: Mahmoud Etebari PhD, Email: etebari@pharm.mui.ac.ir