

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

\*ناهید دارابی<sup>۱</sup>، دکتر مهربان فلاحتی<sup>۲</sup>، دکتر محمود محمودیان<sup>۳</sup>

### چکیده

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

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

**یافته‌ها:** نتایج اثرات سمی وابسته به غلظت را برای عصاره آبی گلرنگ  $IC_{50}=112\mu l/ml$  و عصاره اسپند  $IC_{50}=476\mu l/ml$  نشان داد. سمیت مشتقات دی هیدرو پیریدین تا غلظت  $100\mu l/ml$  مورد بررسی قرار گرفت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج حاصل از این آزمون با نتایج حاصل از سایر روش‌های تعیین LD<sub>50</sub> در سنجش مواد مذکور (موش کوچک و بزرگ و میگوی آب شور و کشت سلول‌های پستانداران) تا حد زیادی هماهنگ می‌باشد.

**کلمات کلیدی:** حیوانات آزمایشگاهی، ساکارومیسس سرویسیه، سمیت، عصاره اسپند، گلرنگ، مشتقات دی هیدرو پیریدین

### مقدمه

رفع این مشکلات روش‌های دیگری ابداع شد که دارای نتایج مشابه باشند (۲) در انتخاب این روش‌ها به نکات زیر توجه شده است:

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

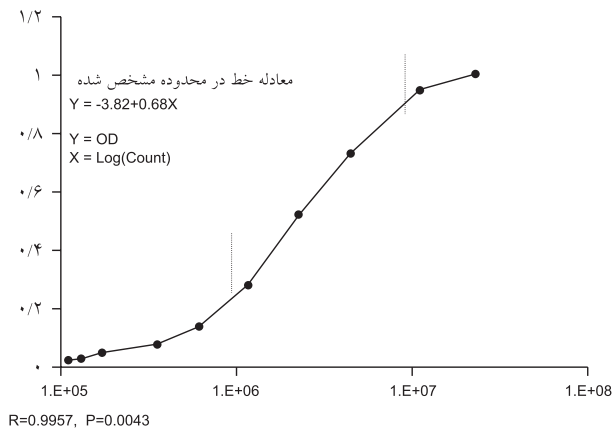
آزمایش‌های سم شناسی حاد اولین قدم برای تعیین میزان خطر یک ترکیب شیمیایی برای انسان بوده است. بهترین راه در این مورد استفاده از مناسب و بررسی یک سری آزمون‌های مرحله‌ای بر روی آن‌ها بوده است. امروزه بسیاری از آزمون‌هایی که بر روی حیوانات انجام می‌شد منسوخ گردیده است. همچنین به دلیل قیمت بالا، پیچیدگی و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

۱- مربی، دانشگاه علوم پزشکی ارتش جمهوری اسلامی ایران، مرکز تحقیقات ۶۶۰ ارتش (نزاجا)، گروه میکروب شناسی (\*نویسنده مسؤل)  
تلفن: ۰۹۱۲۵۳۳۹۲۲۰

۲- دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه فارغ شناسی  
۳- استاد، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده پزشکی، گروه فارماکولوژی

## یافته‌ها

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



نمودار ۱- منحنی رشد سلولهای *Saccharomyces cerevisiae*

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

برای عصاره آبی گلرنگ ۶ غلظت ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ میکرو مولار از این منحنی رشد سلول مخمر در برابر زمان رسم گردید. به کمک این نمودار، درصد رشد سلول مخمر در محدوده فاز لگاریتمی در برابر غلظت تعیین و منحنی این رشد در برابر غلظت‌های فوق رسم گردید که ۵۰ درصد مهار رشد آن (IC<sub>50</sub>) انتخاب شد. (نمودار ۲)

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

## دیودیپین و مبودیپین و نیفدیپین:

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

دارد، (۸) یعنی اثر مواد سمی مختلف بر روی عملکرد سلول‌ها به صورت تغییر در سرعت تکثیر سلول‌ها انعکاس می‌یابد. (۹) و با توجه به ارتباط منطقی که بین تعداد در فاز لگاریتمی رشد و کدورت سلول‌ها در این مرحله وجود دارد  $r=0.99$  به سهولت می‌توان با اندازه‌گیری کدورت سلولی سمیت مواد را تعیین کرد.

## مواد و روشها

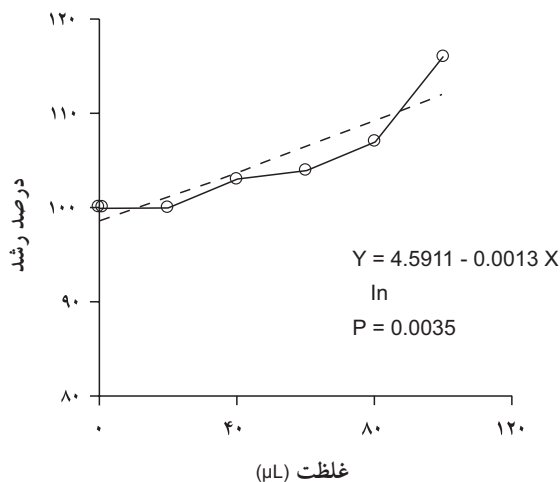
این مطالعه به روش تجربی (Experimental) و با استفاده از میکروارگانیزم ساکارومیسس سرویسیه (PTCC-۵۰۵۲) تهیه شده از مرکز بیو تکنولوژی سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران و با مواد عصاره آبی گلرنگ، آکالوئیدهای اسپند، مشتقات دی هیدرو پیریدین (نیفدیپین، مبودیپین و دیودیپین)، عصاره مخمر (merck)، پیتون (biolife) و آگار (biomenious) و تهیه محیط کشت مایع جهت نگه‌داری سلول مخمر (۱۰) به صورت "گلوکز ۲٪ - عصاره مخمر ۱٪ و پیتون ۰/۵٪" صورت گرفته است.

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

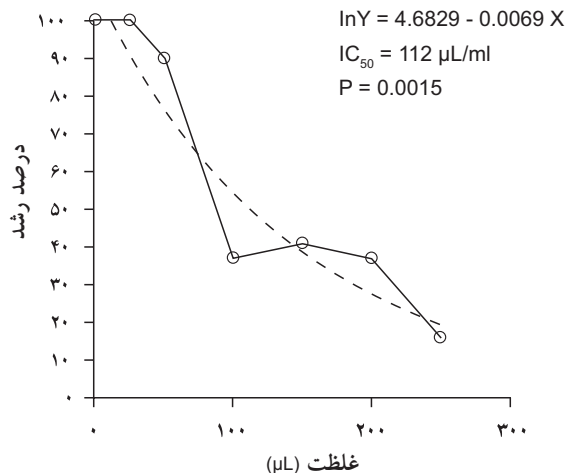
یک کلنی از کشت ۳۶ ساعته مخمر به محیط کشت مایع استریل تلقیح شد. این نمونه با تکثیر انکوباتور ۳۰ درجه سانتی گراد با سرعت و گرمای متوسط انکوبه شد. در زمان‌های متوالی به روش شمارش کلنی تعداد سلول‌ها در واحد میلی متر تعیین شد و رابطه آن با کدورت سلولی در طول موج ۵۲۵ نانومتر متوسط اسپکتروفتومتر تعیین گردید. در مرحله بعد رشد ساکارومیسس سرویسیه در حضور غلظت‌های مختلف از مواد مورد آزمایش در همان شرایط قبلی هر یک ساعت به مدت ۸-۱۰ ساعت و بعد از ۲۴ ساعت اندازه‌گیری شد.

سرعت رشد در فاز لگاریتمی تعیین و منحنی دوز - پاسخ به صورت سرعت در برابر غلظت‌های مختلف رسم گردید و ۵۰٪ مهار رشد معادل IC<sub>50</sub> از این منحنی به دست آمد.

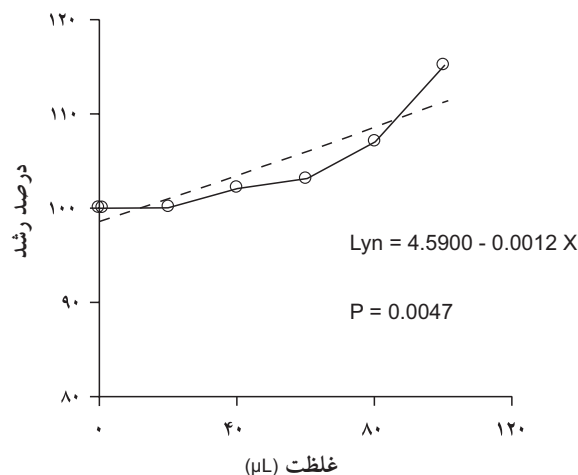
در طول بررسی سمیت هر ماده از دو نمونه کنترل منفی و مثبت استفاده شد کنترل منفی حاوی حلال و سوسپانسیون و سلول‌های مخمری بود و با توجه به اثرات سمی شناخته شده نمک‌های کادمیم از کادمیم سولفات به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. (۱۱، ۱۲)



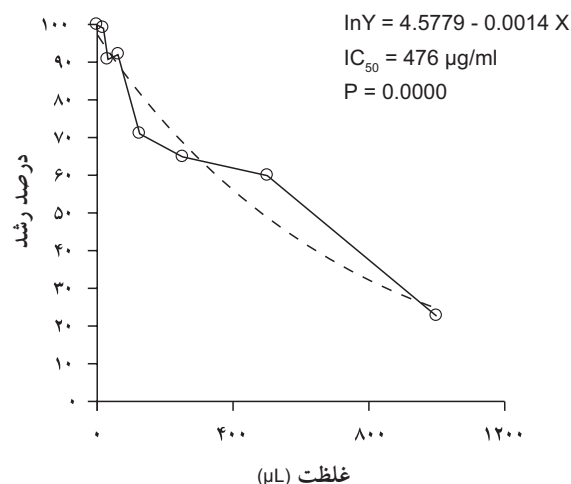
نمودار ۵- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف مبودپین



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



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

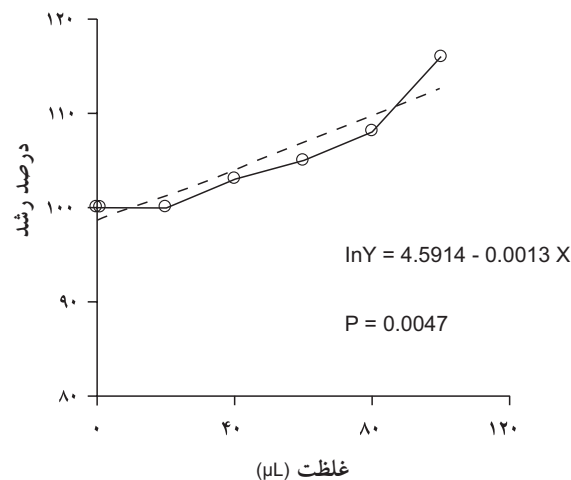


نمودار ۳- درصد رشد سلولهای مخمر در برابر غلظتهای مختلف عصاره اسپند

### بحث و نتیجه گیری

ارزیابی اولیه سمیت حاد یک ترکیب شیمیایی در انسان میسر نیست. از طرفی افزایش روز افزون مواد شیمیایی استفاده از روش های سریع و ارزان در بررسی سمیت مواد ضروری به نظر می رسد. از جمله این روش ها استفاده از آزمون رشد مخمر در تعیین سمیت حاد مواد می باشد. (۱۳)

موادیکه سمیت آنها با این روش مورد بررسی قرار گرفت شامل عصاره آبی گلرنگ و آلکالوئیدهای اسپند و مشتقات دی هیدروپیریدین بود. با توجه به مطالعات قبلی غلظت های صفر تا ۲۵۰ میکرومتر برای عصاره آبی گلرنگ انتخاب شد و با توجه به منحنی رشد ۵۰ درصد  $100 \mu\text{l/ml}$  به دست آمد.



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

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

این نتایج دارای ارزش قابل مقایسه با سایر روش‌های مشابه بخصوص سیتوتوکسیتی با استفاده از سلول‌های پستانداران دارد. در روش مذکور ۵۰ درصد مهار رشد این عصاره  $100 \mu\text{l/ml}$  مشاهده شده است. (۱۴)

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

و در این مطالعه  $IC_{50}$  برابر  $476 \mu\text{g/m}$  بدست آمد. ترکیبات دیگر مشتقات دی هیدروپیریدین بودند که از بلوک کننده‌های کانال کلسیمی هستند (۱۶) منحنی رشد این ترکیبات هیچ‌گونه اثر سمی روی سلول‌های مخمری نشان نداد.

## References

- Cascobi, I, lochman, E. R, Roth, (1995) Effect af a heterogeneous set of exenobiotics o R NA Synthesis of yeast cells. *Ecotoxicol. Environ. saf.* 30:252-258
- Ham burger, A. W. (1991) Invitro evaluation of chemotherapeutic agents cancer. *Invest.* 9:683-690
- Aqeel, A., khursheed, A., sabiha, S., siddiqui, B., sabira, B., Faizi, sh., salimuzzaman, s. (1992) study of invitro antimicrobial activity of harmine, harmaline and their derivatives. *j. Enthopharmacology.* 35:289-294
- ۴- تولومیس قوام میراستاری. اصول زهر شناسی صفحه (۲۰۶ و ۱۹۸ و ۳۲ و ۲۸ و ۲۰) چاپ اول:
- ۵- میثمی، ف، ذوالفقاری، م. ا، رسایی، ن.، (۱۳۷۴) ارزیابی سمیت حاد دارویی ضد سرطان (ABC) کتاب خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره فیزیولوژی و فارماکولوژی صفحه: ۱۷۳.
- Aarons, H. D., victor rossi, G., Raymond, F., orzechowski, F., Darryl, h. (1977) Cardiovascular actions of three harmama alkaloids, harmine, harmaline and harmalol, *J. pharmaceutical Seienees.* 9:1244-1248
- Cascorbi, I., (1991) yeast growth rate cytotoxicity test. *Invitox. Protocol.* 33:1-11.
- Deacon. J. W. (1997) modern mycology. Third edition. chapter 3, pp: 61-62.
- Reid, R. J., kauh, A., B jornti, M. (1997) Campotheein sensitivity in mediated by pleiotropic drug resistance net work in yeast. *J. Biol. ehem.* 18:12091-12099
- ۱۰- حسین‌زاده، ح، رضائی، م، کسانیان ناینی، م، (۱۳۷۸) ارزیابی آزمون مخمر جهت تعیین سمیت حاد مواد، مجله علوم پزشکی جلد ۲. شماره ۴.
- Friberg, I., Nordberg, G. F., vouk, V. B., Hand book on the toxicology of metals, Elsevier wewyork (1986), vol;2, pp: 131, 140.
- Henderson, G. (1989) A comparison of the effect of chromate, molyb date and cadmium on respiration in the yeast *saccharomyces cere visiae* *Biol. Metal.* 2:83:38.
- Campanella, L., Favero, G., Tonasset:, M. (1995) Immobilised yeast cells biosensor for total toxicity testing. *Sci. Total. Environ* 171:227-234
- Nobakht. M., Fattahi, M., Hoormand, M., Milanian, I., Rahbar, N., Mahmoudian, M. (2000) A. study on the tetratogenic and cytotoxic effect of saf flower extract. *J. Enthro phamacol.* 73: 453:459.
- Shapira, Z., terkel, J., Egozi, y., ~ yska, A., Friedman. (1989) Abortifa cient potential for the epigeal parts of peganum harmal. *g. enthro pharmacol* 27:319-329
- Fisher, M., schnell, n., chattaway, J., Daries, p., Dixon, G., sander, D. (1997) the *saccharomyces creveisiae* cchi gene is invoved in alcium infulex and mating. *FEBS letters.* 419:259-262.
- Bjomsti, M. a., kanb, M., Benedetti, p. (1997) yeast *saccharomyces cerevisiae* a model system to study the cytotoxic activity antitumor drug campothecin. *Cacer chemo therapy and phracology* 34:s1-ss.
- Tiara, z., kanzawa, sh., Dohara, ch., Ishida, sh., Matsomoto, M sakiya, y. (1997) In tercalation of six B-carbolin derivatives into DNA. *JPN. g. Toxicol. Environ. Health.* 2:33-91

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

\*Darabi N; MSc<sup>1</sup>, Falahati M; PhD<sup>2</sup>, Mamudian M; PhD<sup>3</sup>

### Abstract

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

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

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

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

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

---

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

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

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