ORIGINAL ARTICLE

# *Activity of Avicennia marina Methanol Extracts on Proliferation of Lymphocytes and their Mutagenicity Using Ames Test and In Silico Method*

Sara Khajehzadeh[1],
Mandana Behbahani[2]

[1]MSc Student in Microbial Biotechnology, Faculty of New Science and Technology, Isfahan University, Isfahan, Iran
[2]Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of New Science and Technology, Isfahan University, Isfahan, Iran

(Received September 23, 2014 Accepted December 26, 2015)

## *Abstract*

**Background and purpose:** *Avicennia marina* (family *Acanthaceae*) has been used as traditional medicine in Iran to treat some diseases such as ulcers, rheumatism and burns. The present study investigated the in silico and in vitro mutagenicity of the fruit, leaf, seed and stem extracts of *Avicennia marina* and their effects on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) proliferation.

**Materials and methods:** In this experimental study, air dried and powdered plant materials were extracted by methanol using maceration. The extracts were evaporated to dryness by rotary evaporator at 40°C and were diluted using different PBS concentrations (50, 100, 500, 1000, and 1500 µg/ml). The effect of the methanol extract of this plant on lymphocyte proliferation was measured using MTT assay. The mutagenicity of these extracts was also investigated using Ames test. In silico analysis of 15 dominant compounds of the plant was performed by Toxtree 2.6.6 software.

**Results:** The methanol extracts of the leaf and root had the highest and lowest inducing effect on lymphocyte proliferation, respectively. Leaf and stem extracts of *Avicennia marina* did not show any mutagenicity on this strain. In silico analysis demonstrated that among 15 compounds, four triterpenoids (Taraxerol, Betulin, Lupeol, and Gossypol) had weak mutagenicity.

**Conclusion:** *Avicennia marina* showed positive effects on proliferation of lymphocytes and their mutagenicity, therefore, it could be considered as a good candidate in treatment of immunodeficiency diseases.

***Keywords:*** *Avicennia*, lymphocytes, methanolic extract, MTT assay, mutagenicity

**J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(135): 32-42 (Persian).**

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و ششم شماره ۱۳۵ فروردین سال ۱۳۹۵ (۴۲-۳۲)

# بررسی تاثیر عصاره های متانولی گیاه *Avicennia marina* بر رشد و تکثیر لنفوسیت و جهش زایی آن ها با استفاده از آزمون ایمز و روش های بیوانفورماتیکی

سارا خواجه زاده[1]
ماندانا بهبهانی[2]

## چکیده

**سابقه و هدف:** گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* متعلق به خانواده آکانتاسه می‌باشد که در گذشته برای درمان بیماری‌های مختلفی نظیر زخم معده، آبله، روماتیسم و سوختگی‌ها به کار می‌رفته است و در سال‌های اخیر اثرات مطلوب درمانی آن در بررسی‌های متعددی به اثبات رسیده است. هدف از این پژوهش بررسی تاثیر عصاره متانولی اندام‌های مختلف این گیاه بر تکثیر لنفوسیت‌های انسانی و پتانسیل جهش زایی آن در شرایط in vitro و in silico می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** دراین بررسی تجربی، نمونه‌های مورد نظر پس ازجمع‌آوری، خشک و آسیاب شدند. سپس عصاره‌های متانولی تهیه شده از بخش‌های مختلف گیاه با روش غوطه‌ور سازی، به وسیله روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و با استفاده از PBS استریل به غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق گردید. تاثیر عصاره‌های ذکر شده بر رشد و تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با آزمون MTT و قابلیت جهش‌زایی آن با استفاده از آزمون ایمز بررسی شد. هم چنین پیش بینی جهش‌زایی ۱۵ ترکیب غالب این گیاه با نرم افزار Toxtree2.6.6انجام گردید.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد از بین عصاره‌های بخش‌های مختلف گیاه حرا، برگ و ریشه به ترتیب بیش‌ترین و کم‌ترین اثر تحریک کنندگی بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها دارند. هم‌چنین برگ و ساقه گیاه حرا فاقد پتانسیل جهش‌زایی در غلظت‌های مختلف می‌باشند. نتایج حاصل از پیش‌بینی جهش‌زایی ۱۵ ترکیب گیاه حرا نشان داد ۴ تری ترپنوئید تاراکسرول، بتولین، گوزیپول و لوپئول در سطح ضعیف جهش‌زایی قرار می‌گیرند.

**استنتاج:** با توجه به اثرات مطلوب عصاره متانولی برگ و ساقه گیاه حرا بر تکثیر و رشد لنفوسیت‌ها و عدم جهش‌زایی آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که برگ و ساقه این گیاه می‌تواند کاندید مناسبی جهت بررسی‌های بیش‌تر برای ساخت داروهایی با منشأ گیاهی در درمان بیماری‌های نقص ایمنی باشد.

**واژه های کلیدی:** آزمون MTT، جهش‌زایی، گیاه حرا، عصاره متانولی، لنفوسیت

## مقدمه

نقص در کنترل پاسخ‌های ایمنی و عدم موفقیت سیستم ایمنی در ایجاد پاسخ‌های مناسب منجر به بیماری‌های خود ایمن، نقص ایمنی و افزایش استعداد فرد در ابتلا به عفونت‌های مختلف می‌شود. تعدیل کننده‌های

**مولف مسئول: ماندانا بهبهانی– اصفهان:** دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم و فناوری های نوین E-mail: Ma_behbahani@yahoo.com
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم و فن آوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
۲. دانشیار، گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران
تاریخ دریافت : ۱۳۹۴/۷/۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۳۹۴/۷/۴ تاریخ تصویب : ۱۳۹۴/۱۰/۵



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

سیستم ایمنی به دوگروه کلی تحریک‌کننده و سرکوب‌کننده پاسخ‌های ایمنی تقسیم می‌شوند که گروه اول در انواع مختلف بیماری‌های عفونی و گروه دوم در پیوند عضو و بیماری‌های خود ایمن از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند(۱). با توجه به اهمیت این موضوع، طی سال‌های اخیر بخش عمده‌ای از تحقیقات دارویی به شناسایی و معرفی ترکیبات تعدیل‌کننده سیستم ایمنی جهت معرفی آن‌ها به عنوان داروهای موثر در درمان بیماری‌های خود ایمن و یا تقویت‌کننده پاسخ‌های ایمنی معطوف شده است. شیوع بیماری‌های جدید نظیر سرطان، بیماری‌های ویروسی و خود ایمن، مقاومت‌های دارویی، هزینه بالای درمان با داروهای شیمیایی و اثرات جانبی نامطلوب آن‌ها موجب شد تا تحقیقات بسیاری بر روی ترکیبات موثر گیاهان دارویی و پتانسیل تعدیل‌کنندگی آن‌ها بر سیستم ایمنی صورت گیرد(۲). از جمله گیاهانی که اثرات تعدیل کنندگی سیستم ایمنی برای آن ها توسط مطالعات و تجربیات مختلف اثبات شده است، دو گیاه جینسینگ و اکیناسه‌آ پورپوره‌آ را می‌توان نام برد که در حال حاضر در بازار دارویی ایران فراورده‌های رسمی این گیاهان وجود دارد(۴،۳). گیاه حرا با نام علمی *Avicennia marina* متعلق به خانواده *Acanthaceae*، یکی از گونه‌های گیاهی غالب اکوسیستم مانگرو می‌باشد. ابوعلی سینا برای نخستین بار از این گیاه به عنوان گیاه دارویی در درمان جذام استفاده نمود. به همین دلیل به افتخار این دانشمند ایرانی، اویسنا نام‌گذاری شده است(۶،۵). از دیگر مصارف درمانی این گیاه در طب سنتی می‌توان به درمان آبله، زخم معده، سوختگی‌ها و روماتیسم اشاره نمود. از جمله خواص دارویی این گیاه می‌توان به خواص ضد باکتریایی(۷)، ضد ویروسی(۸)، ضد قارچی(۹)، ضد اکسیدانی(۱۰)، ضد التهابی(۱۱)، ضد سرطانی(۱۲) و ضد دیابتی(۱۳) اشاره نمود که اثر بخشی آن‌ها طی بررسی‌های آزمایشگاهی ثابت شده است. با وجود گزارش‌های متعدد در خصوص اثرات مطلوب درمانی و ترکیبات موثر دارویی گیاه حرا، بررسی پتانسیل جهش‌زایی گیاه حرا به منظور معرفی آن به بازار دارویی به‌عنوان یک گیاه ایمن از اهمیت بالایی برخوردار است. برای اولین بار در سال ۲۰۱۲، اثر ضد جهشی عصاره اتانولی و آبی برگ‌های جوان و بالغ گیاه حرا بر روی باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 در حضور و عدم حضور سیستم متابولیکی کبدی با استفاده از تست ایمز بررسی گردید(۱۴). تست ایمز یک سنجش باکتریایی متداول برای شناسایی ترکیبات تولیدکننده جهش‌های ژنی بوده و هم‌چنین ارزش پیش‌بینی بالایی برای تست‌های سرطان‌زایی را نشان می‌دهد(۱۵). در این پژوهش برای اولین بار تاثیر عصاره متانولی اندام‌های مختلف گیاه حرا بر تکثیر و رشد سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) مورد ارزیابی قرار گرفت. هم چنین سمیت و جهش‌زایی ۱۵ ترکیب جدا شده از گیاه حرا (جدول شماره ۱)که اثرات ضد میکروبی و ضد سرطانی آن اثبات شده است(۱۶)، با روش‌های بیوانفورماتیکی پیش بینی و در شرایط آزمایشگاهی جهش‌زایی عصاره متانولی اندام‌های مختلف این گیاه با استفاده از تست ایمز بررسی گردید.

## مواد و روش ها

*تهیه نمونه‌های گیاهی و عصاره‌گیری:* در بررسی تجربی انجام گرفته، نمونه‌های گیاهی در شهریور ماه ۱۳۹۳ ازمنطقه حفاظت‌شده مند دراستان بوشهر جمع‌آوری و قسمت‌های مختلف نمونه گیاهی (برگ، ساقه، بذر و ریشه) بعد از شستشو به طور جداگانه در سایه خشک و آسیاب گردید. مقدار ۵۰ گرم از نمونه‌های آسیاب شده همراه با ۱۵۰ میلی‌لیتر متانول ۹۶ درصد در شیکر با دور rpm ۱۶۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت قرار داده شد. عصاره‌های به دست آمده بعد از ۳ بار عبور از کاغذ صافی با دستگاه تحت خلا روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد تغلیظ و توسط دستگاه فریز درایر خشک شدند. ۱۰ میلی‌گرم از هر کدام از عصاره‌ها در ۵۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO ) حل کرده و به



[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

وسیله محلول بافر فسفات (PBS) به غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق گردیدند.

*استخراج، نگهداری و کشت سلول‌های لنفوسیت:* ابتدا ۱۰ میلی لیتر خون از اهداکنندگان سالم که در محدوده سنی ۲۲ تا ۳۰ سال می باشند و سابقه مصرف داروهای تاثیرگذار بر سیستم ایمنی و مصرف آنتی‌بیوتیک را نداشتند، در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد هپارین جمع‌آوری شد. سپس در شرایط استریل به فالکون‌های ۱۵ میلی‌لیتری حاوی ۵ میلی‌لیتر لنفودکس منتقل و در سانتریفیوژ با دور rpm ۱۸۰۰به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بعد از اتمام سانتریفیوژ، محتویات فالکون به سه فاز مجزا که به وضوح قابل تشخیص می‌باشند، تقسیم می‌گردد. لنفوسیت‌های جدا شده در لایه سفید رنگ میانی تحت شرایط استریل به وسیله پیپت پاستور از سایر لایه‌ها جدا گردید و به پلیت‌های حاوی محیط کشت RPMI شامل: ۱۰ درصد سرم جنین گاوی، u/ml ۱۰۰ پنی‌سیلین، mg/ml ۱۰۰ استرپتومایسین، mM ۲ گلوتامین، mM ۱ پیرووات منتقل و به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور ۵ درصد $CO_2$ کشت داده شدند.

*بررسی رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت با استفاده از روش MTT :* جهت بررسی اثر عصاره‌ها بر رشد و تکثیر لنفوسیت‌ها از آزمون رنگ سنجی MTT با استفاده از محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تترازولیوم بروماید فیلتر شده استفاده شد. اساس این روش احیای کریستال‌های زرد رنگ تترازولیوم با فرمول مولکولی ($C_{18}H_{16}BrN$) و ایجاد کریستال‌های آبی رنگ نامحلول فورمازان در اثر فعالیت آنزیم سوکسینات دهیدروژناز در میتوکندری سلول‌های زنده موجود در چاهک‌های کشت می‌باشد. میزان فورمازان تولید شده به نسبت سلول‌های زنده وابسته است. برای انجام این تست ابتدا در هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه ۱۸۰ میکرولیتر سوسپانسیون سلولی (۶۰۰ هزار سلول در میلی‌لیتر) و ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی افزوده تا حجم نهایی به ۲۰۰ میکرولیتر برسد. پس از آن که سلول‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، به هر چاهک ۲۰ میکرولیتر MTT فیلتر شده افزوده و به مدت ۴ ساعت دیگر انکوباسیون را ادامه داده، پس از اتمام انکوباسیون به منظور حل کردن کریستال‌های نامحلول MTT از ۱۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۴ مولار HCL در ۲ پروپانول به همراه ۱۰ درصد تریتون X100 استفاده و جذب MTT در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از غلظت‌های ۳-۱ درصد DMSO به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر غلظت از عصاره سه بار تکرار انجام شده و میزان تکثیر لنفوسیت‌ها از فرمول (۱) محاسبه گردید.

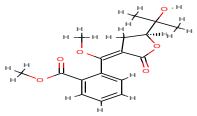
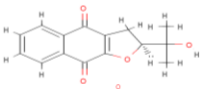
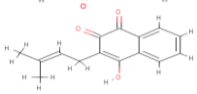
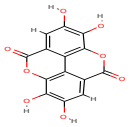
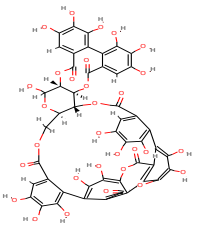
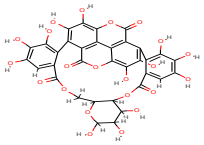
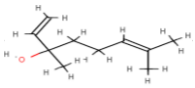
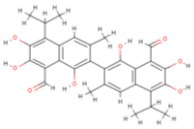
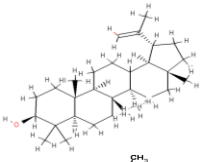
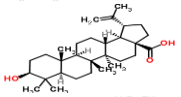
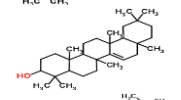
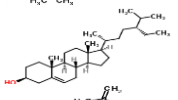
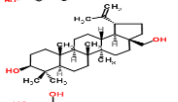
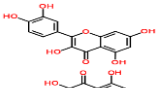
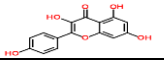
$$\text{درصد بقا} = \frac{\text{جذب حاصل از هر نمونه}}{\text{جذب کنترل منفی}} \times ۱۰۰ \quad \text{فرمول (۱)}$$

*جذب کنترل منفی*

*پیش‌بینی جهش‌زایی ترکیبات گیاه حرا:* در این بررسی ساختار سه بعدی ۱۵ ترکیب گیاه حرا که در مطالعات قبلی اثرات ضد سرطانی و ضد میکروبی آن‌ها اثبات شده است، با فرمت SDF از پایگاه داده‌ای مربوط به ترکیبات شیمیایی Pubchem گرفته شده است (جدول شماره ۱). سپس پتانسیل جهش‌زایی آن ها در آزمون ایمز با استفاده از نرم‌افزار Toxtree 2.6.6 مورد بررسی قرار گرفت. بررسی میزان جهش‌زایی عصاره متانولی اندام‌های مختلف گیاه حرا با آزمون ایمز: در آزمون ایمز به منظور بررسی قابلیت جهش‌زایی، از سویه‌های مختلف باکتری سالمونلا تیفی موریوم که در اپرون مربوط به سنتز هیستیدین آن جهش‌های مختلفی ایجاد شده است، استفاده می‌گردد. در صورت قرارگیری این باکتری در معرض یک ماده جهش‌زا، باکتری جهش یافته از حالت اگزوتروف به حالت پروتروف (تیپ وحشی) تبدیل شده و در محیط حداقل (فاقد هیستیدین) قادر به رشد می‌گردد(۱۷). در این پژوهش از سالمونلا تیفی موریوم سویه TA98 استفاده گردید. این سویه علاوه بر وابستگی به هیستیدین دارای دو جهش rfa و UVrB و یک فاکتور مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ناشی از حضور پلاسمید PKM101 نیز می‌باشد.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

**جدول شماره ۱:** نتایج حاصل از پیش بینی جهش زایی ترکیبات ضد میکروبی و ضد اکسیدانی گیاه حرا در آزمون ایمز با نرم افزار Toxtree 2.6.6

| ردیف | نوع ترکیب | نام ترکیب | ساختار دو بعدی | جهش زایی در آزمون ایمز |
|---|---|---|---|---|
| ۱ | | Avicennone A |  | - |
| ۲ | نفتوکینون | Stenocarpoquinone B |  | - |
| ۳ | | Lapachol |  | - |
| ۴ | | Ellagic acid |  | - |
| ۵ | تانن | Punicalagin |  | - |
| ۶ | | Punicalin |  | - |
| ۷ | | Linalool |  | - |
| ۸ | | Gossypol |  | + |
| ۹ | | Lupeol |  | + |
| ۱۰ | تریتوئید | Betulinic acid |  | - |
| ۱۱ | | Taraxerol |  | + |
| ۱۲ | | B.sitosterol |  | - |
| ۱۳ | | Betulin |  | + |
| ۱۴ | فلاونوئید | Quercetin |  | - |
| ۱۵ | | Kaempherol |  | - |

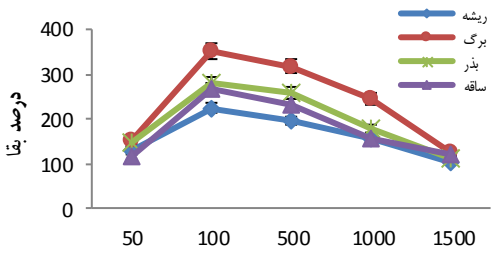
*آزمون‌های تایید ژنوتیپ سویه TA98:* جهت تایید سویه TA98 آزمون‌های وابستگی به هیستیدین، عدم رشد در حضور تابش پرتوهای UV، مقاومت به آمپی‌سیلین و حساسیت به کریستال ویوله در محیط مستر (حاوی نوترینت آگار، کلرید سدیم، بیوتین و هیستیدین) انجام گرفت(۱۸). به این منظور تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری موسوم به نیم مک‌فارلند را در میکروتیوپ‌های ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۱ میلی‌لیتر PBS حل کرده و روی محیط مستر به صورت یکنواخت با سواپ استریل پخش گردید. برای اطمینان از عدم رشد باکتری در غیاب هیستیدین، به‌طور جداگانه مقادیر مساوی از سوسپانسیون باکتری روی محیط حداقل (حاوی گلوکز، آگار، اسید سیتریک یک آبه، پتاسیم فسفات دی بازیک، منیزیم فسفات و سدیم آمونیوم فسفات) و مستر به صورت یکنواخت تلقیح شد. به منظور تایید مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین، از دیسک استاندارد آمپی‌سیلین حاوی ۱۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک استفاده گردید. پس از پخش یکنواخت باکتری‌ها در محیط مستر برای تعیین جهش UVrB نصفی از پلیت را با فویل آلومینیومی کاملا پوشانده و به مدت ۱۰ ثانیه در فاصله ۳۰ سانتی‌متری لامپ UV قرار داده شد. جهت بررسی جهش rfa از دیسک آغشته به کریستال ویوله استفاده گردید. بررسی میزان جهش‌زایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی در شرایط in vitro: به این منظور دیسک‌های کاغذی آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره روی محیط کشت حداقل حاوی کشت یکنواخت سالمونلا تیفی موریوم TA98 قرار گرفت. در صورت جهش‌زا بودن در اطراف دیسک‌ها، کلونی‌های سفید رنگ مشاهده می گردد. در این بررسی از ۱۰۰ میکرولیتر محلول ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر سدیم آزید به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد. برای هر غلظت از عصاره‌های مختلف سه بار تکرار صورت گرفت. در نهایت تعداد کلونی‌های رشد کرده در مجاورت عصاره‌های گیاهی را با کنترل مثبت و منفی مقایسه گردید.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

*آنالیز آماری داده‌ها:* در پژوهش حاضر تاثیر عصاره متانولی اندام‌های مختلف گیاه حرا بر تکثیر و رشد سلول‌های لنفوسیت و تعیین پتانسیل جهش‌زایی آن‌ها در سه تکرار انجام شد. سپس میانگین و خطای معیار میانگین برای آن‌ها محاسبه گردید. به منظور مقایسه میانگین داده‌های به دست آمده و تعیین معنی‌دار بودن اختلاف داده‌ها، با استفاده از نرم‌افزار SPSS 21 آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) انجام گردید و اختلاف معنی‌دار میانگین داده‌ها در سطح ($p<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

## یافته ها

*نتایج حاصل از اثر عصاره‌های متانولی بر تکثیر لنفوسیت‌ها :* داده‌ای به دست آمده نشان داد، عصاره‌های متانولی حاصل از بخش‌های مختلف گیاه حرا تا غلظت ۱۰۰µg/ml قادر به افزایش سلول‌های لنفوسیت به صورت وابسته به غلظت بوده و در غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰µg/ml، خاصیت تحریک‌کنندگی رشد وتکثیر سلول‌ها کاهش می‌یابد (نمودار شماره ۱). به‌طوری‌که تمام عصاره‌ها در غلظت، ۱۰۰ بیش‌ترین و در غلظت ۱۵۰۰، کم‌ترین تاثیرگذاری را بر تکثیر لنفوسیت‌ها داشته‌اند. برگ‌ها در غلظت، ۱۰۰ قادر به افزایش سلول‌های لنفوسیت تا ۳/۵برابر می‌باشند، ولی ریشه تا ۲برابر، میزان لنفوسیت را افزایش می‌دهد. ترتیب اثربخشی‌عصاره بخش‌های مختلف گیاه به ترتیب شامل: برگ، بذر، ساقه و ریشه می‌باشد.




**نمودار شماره ۱:** اثر گذاری عصاره متانولی بخش های مختلف گیاه *Avicennia marina* بر رشد و تکثیر لنفوسیت های انسانی (به دلیل اختلاف معنی دار در کلیه داده ها $p<۰/۰۵$ ستاره بر روی نمودارها قرار نگرفت)

*نتایج حاصل از بررسی جهش‌زایی*

*نتایج حاصل از پیش بینی جهش‌زایی ایمز:* نتایج پیش‌بینی جهش‌زایی ۱۵ ترکیب مورد مطالعه در آزمون ایمز نشان داد که ۴ ترکیب از بین ۱۵ ترکیب مورد بررسی، در سطح ضعیف جهش‌زایی و ۱۱ ترکیب دیگر بدون اثرات جهش‌زایی می‌باشند که این ۴ ترکیب، همگی در گروه تری‌ترپنوئیدها قرار می‌گیرند (جدول شماره ۱).

*نتایج آزمون‌های تایید سویه TA98:* باکتری‌های تلقیح شده به محیط، حداقل توانایی رشد روی این محیط را نداشته و فقط در محیط کشت مستر حاوی هیستیدین و بیوتین قابلیت رشد دارد. باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم در معرض پرتوهای UV رشد نمی‌کنند. هم‌چنین در اطراف دیسک آغشته به کریستال ویوله، رشدی مشاهده نگردید. این نتایج نشان‌دهنده تایید دو جهش rfa و UVrB در این سویه می‌باشد. رشد باکتری‌ها در اطراف دیسک آمپی‌سیلین نیز تاییدکننده حضور پلاسمید PKM101 در این باکتری است (تصویر شماره ۱).

*نتایج حاصل از میزان جهش‌زایی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاه حرا:* تعداد کلنی‌های رشد یافته روی محیط حداقل حاوی کنترل منفی(آب مقطر) وکنترل مثبت (سدیم آزید) به ترتیب حدود ۳۳ و ۹۵ کلونی شمارش شد. بعد از شمارش کلنی‌های برگشتی و مقایسه این اعداد بین نمونه‌ها و کنترل منفی طبق فرمول ۲، در مورد جهش‌زا بودن یا نبودن عصاره‌های گیاهی نتیجه‌گیری شد.

فرمول (۲) $\text{نرخ جهش‌زایی} = \frac{\text{تعداد کلنی‌های برگشتی نمونه}}{\text{تعداد کلنی‌های کنترل منفی}}$

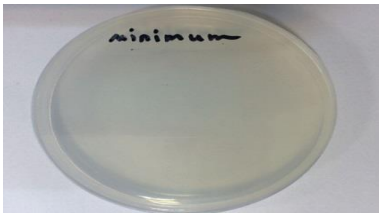
تعداد کلنی‌های کنترل منفی

اگر این نسبت از ۲ بیش‌تر باشد، نشانه جهش‌زا بودن نمونه‌های مورد مطالعه می‌باشد(۱۹). طبق نتایج جدول شماره ۲ و براساس فرمول بالا، تمامی عصاره‌ها تا غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، فاقد خاصیت جهش‌زایی می‌باشند.

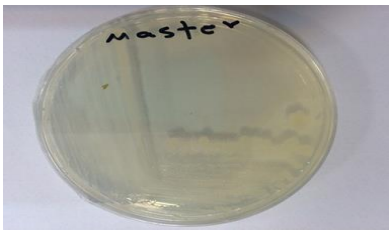
[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

عصاره‌های برگ و ساقه گیاه حرا در هیچ کدام از غلظت‌های مورد مطالعه، جهش زا نمی‌باشند. در صورتی که ریشه و بذر در غلظت‌های بالا دارای قابلیت جهش‌زایی می‌باشند. خاصیت جهش‌زایی ریشه از بذر بیش‌تر می‌باشد، به طوری که در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر جهش‌زا بوده و در غلظت ۱۵۰۰، بیش ترین جهش‌زایی مشاهده گردید.

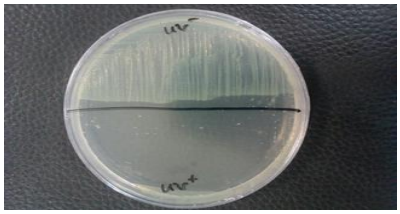
الف- عدم رشد در محیط حداقل فاقد هیستیدین



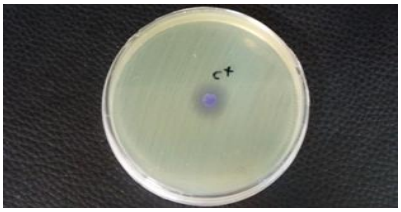

ب- رشد باکتری در محیط مستر حاوی هیستیدین



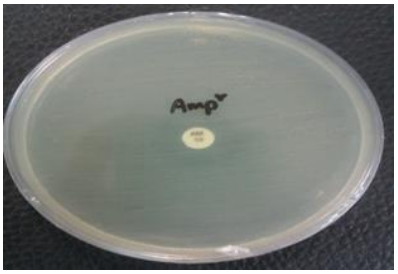

ج- عدم رشد پس از تماس باUV



د- عدم رشد در اطراف دیسک کریستال ویوله



و- مقاومت به آمپی سیلین




**تصویر شماره ۱:** نتایج آزمون های تایید سویه TA98

**جدول شماره ۲:** نتایج حاصل ازبررسی جهش‌زایی غلظت‌های مختلف عصاره های گیاه حرا (میانگین تعداد کلنی های برگشتی در حضور غلظت های مختلف عصاره)

| منشا | غلظت‌های مختلف عصاره (میکروگرم بر میلی‌لیتر) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| عصاره | ۵۰ | ۱۰۰ | ۵۰۰ | ۱۰۰۰ | ۱۵۰۰ |
| برگ | ۳۶±۱ | ۳۹±۲ | ۴۳±۳ | ۴۸±۲ | ۵۰±۱ |
| ساقه | ۴۰±۲ | ۴۵±۳ | ۴۹±۱ | ۵۳±۳ | ۵۱±۲ |
| ریشه | ۵۱±۴ | ۵۴±۱ | ۵۶±۲ | ۶۷±۱ | ۷۵±۱ |
| بذر | ۴۳±۱ | ۵۰±۲ | ۵۵±۴ | ۶۵±۲ | ۶۹±۲ |

## بحث

با توجه به کاربرد وسیع گیاه حرا در طب سنتی، در سال‌های اخیر مطالعات بسیاری در خصوص بررسی اثرات درمانی این گیاه انجام شده است. چندین مطالعه انجام گرفته بر روی گونه اویسنیا مارینا، پتانسیل ضد اکسیدانی و ضد سرطانی این گیاه را به علت وجود فلاونوئیدها، نفتوکینون‌ها و ایریدوئید گلیکوزیدهای موجود در برگ آن عنوان نمودند(۲۱،۲۰). بررسی‌های انجام شده قبلی در خصوص خواص ضد باکتریایی این گیاه نیز نشان داد، عصاره گلیسرینی برگ حرا دارای اثرات ضد باکتریایی قابل ملاحظه‌ای بر اشریشیاکولای، سودوموناس ائروژینوزا به عنوان باکتری‌های گرم منفی و استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان باکتری گرم مثبت می‌باشد(۲۲).

مطالعه زندی و همکارانش روی اثر ضد ویروسی گیاه حرا بر ویروس پولیو در کشت سلولی نشان داد که عصاره گلیسرینی برگ حرا اثر قابل توجهی در ممانعت از عفونت‌زایی این ویروس در کشت سلول Vero داشته و می‌تواند کاندید مناسبی جهت بررسی‌های بعدی و طراحی دارو با منشأ ضد ویروسی باشد(۲۳). نتایج بررسی‌های انجام گرفته توسط نمازی و همکاران روی اثر مهارکنندگی عصاره آبی و الکلی برگ گیاه حرا بر ویروس HIV و HSV مشخص کرد که عصاره متانولی این گیاه اثر مهارکنندگی بر تکثیر ویروس HSV دارد و هم چنین ترکیب موثر آن لوتئولین معرفی گردید(۲۴). تحقیقات دارویی گسترده‌ای طی سال‌های اخیر در خصوص شناسایی و معرفی ترکیبات گیاهی با توان تعدیل‌کنندگی پاسخ‌های ایمنی انجام گرفته است.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

بررسی‌ها نشان داد ترکیبات طبیعی استخراج شده از گیاهان مانند پلی‌فنل‌ها، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها و ترپن‌ها دارای آثار تحریک کنندگی و افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن و کنترل عفونت‌ها می‌باشند . *Lien* و همکارانش در این پژوهش نشان دادند که دو ترپنوئید اورسولیک اسید و اولئانولیک اسید و مونوترپن لینالول جدا شده از گیاه*Plantago major* موجب افزایش تکثیر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و ترشح IFN-γ می‌شوند(۲۵). برای اولین در این پژوهش اثر عصاره متانولی بخش‌های مختلف گیاه حرا بر رشد و تکثیر سلول‌های لنفوسیت بررسی گردید. نتایج این بررسی نشان داد، عصاره متانولی حاصل از بخش‌های مختلف گیاه حرا موجب افزایش رشد و تکثیر لنفوسیت‌های انسانی تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌گردد. این افزایش رشد وابسته به غلظت بوده، به طوری که در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، بیش‌ترین میزان رشد مشاهده گردید. برگ این گیاه بیش‌ترین اثر را بر تکثیر سلول‌های لنفوسیت دارد و این می‌تواند به دلیل ترکیبات فعال زیستی موجود در برگ گیاه حرا مانند فلاونوئیدها و ترپنوئیدها باشد که در مطالعات قبلی اثرات تحریک کنندگی آن ها بر سیستم ایمنی گزارش شده است(۲۶). هم‌چنین بررسی‌های انجام گرفته توسط *Fang* و همکاران بر روی ساختار و فعالیت ایمنولوژیکی پلی‌ساکاریدهای پکتیکی جدا شده از ساقه اویسنیا مارینا نشان داد که این پلی‌ساکاریدها اثر مناسبی بر لیپوپلی‌ساکارید القا کننده تکثیر لنفوسیت B دارد(۲۷).

مطالعه *Chiou* و همکارانش بر روی گیاه *Andrographis paniculata*، یکی دیگر از جنس‌های خانواده *Acanthaceae*، نشان داد که عصاره متانولی بخش‌های هوایی این گیاه موجب افزایش تکثیر و القا IL-2 در سلول‌های لنفوسیت خون محیطی و مهار تولید نیتریک اکساید می‌شود(۲۸). با توجه به گزارش‌های متعدد قبلی در خصوص ترکیبات موثر و خواص دارویی گیاه حرا، لازم است پیش از استفاده گسترده آن به عنوان گیاه دارویی از لحاظ ایمنی، مصرف توسط انسان مورد بررسی قرار گیرد. آزمون ایمز یک سنجش باکتریایی متداول برای بررسی پتانسیل جهش‌زایی و سمیت ژنتیکی ترکیبات دارویی می‌باشد. تاکنون مطالعات بسیاری بر روی اثرات جهش‌زایی گیاهان مختلف انجام گرفته است که برخی از آن‌ها ایمنی و برخی پتانسیل جهش‌زایی گیاهان دارویی را نشان داده‌اند.

مطالعه *Phapale* و همکاران روی اثر جهش‌زایی ترکیبات فنلی موجود در گیاه *Fronia limonia*، که جزو پرکاربردترین گیاهان دارویی در طب سنتی هندوستان می‌باشد، نشان داد که این گیاه نه تنها فاقد هرگونه اثر جهش‌زایی در آزمون ایمز است، بلکه دارای اثرات ضد جهشی نیز می‌باشد(۲۹). نتایج پژوهشی مشابه توسط Resende و همکارانش روی عصاره اتیل استات گیاه دارویی *Baccharis dracunculifolia* نشان داد که این گیاه فاقد اثرات جهش‌زایی در آزمون ایمز می‌باشد(۳۰). نتایج این تحقیقات در برخی موارد حاکی از جهش زا بودن و سمیت این گیاهان می‌باشد. مطالعه *Eren* و همکاران نشان داد که عصاره آبی گیاه دارویی *Limonium globuliferum* موجب آسیب‌های کروموزومی در سلول‌های مریستمی پیاز شده و نتایج حاصل از آزمون ایمز این گیاه نیز پتانسیل جهش‌زایی آن را اثبات کرد(۳۱).

برای اولین بار در این پژوهش، پتانسیل جهش‌زایی عصاره متانولی اندام‌های مختلف گیاه حرا با روش‌های آزمایشگاهی و بیوانفورماتیکی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمایشگاهی این پژوهش نشان داد که عصاره‌های متانولی برگ و ساقه گیاه حرا فاقد هر گونه اثر جهش‌زایی در آزمون ایمز می‌باشند. نتایج پژوهش قبلی انجام گرفته توسط کرمی و همکارانش بر روی خواص ضد جهشی عصاره‌های اتانولی و آبی برگ گیاه حرا بر روی سویه دیگری از باکتری جهش یافته *سالمونلا تیفی موریوم* نشان داد که عصاره برگ این گیاه موجب ممانعت از جهش در باکتری جهش یافته می‌شود و عصاره اتانولی نسبت به عصاره آبی فعالیت

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

ضد جهشی بالاتری را نشان می‌دهد(۱۴). نتایج بررسی بیوانفورماتیکی بر روی قابلیت جهش‌زایی ترکیبات مورد مطالعه نشان داد که ۴ ترکیب تری‌ترپنوئیدی تاراکسرول، بتولین، گوزیپول و لوپئول، پتانسیل رسیدن به آستانه جهش‌زایی را دارند. با توجه به این که برگ و ساقه این گیاه هیچ‌گونه جهش‌زایی در بررسی‌های آزمایشگاهی نشان ندادند، احتمالاً تجمع این ترپنوئیدها در ریشه و بذر، بیش‌تر از سایر قسمت‌های این گیاه می‌باشد. به طوری که نتایج آزمایشگاهی این پژوهش نیز نشان داد، ریشه و بذر این گیاه در غلظت‌های بالا دارای قابلیت جهش‌زایی می‌باشند.

در پایان با توجه به اثرات مثبت برگ و ساقه گیاه حرا بر تکثیر لنفوسیت‌ها و عدم جهش‌زایی آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت، برگ و ساقه این گیاه کاندید مناسبی جهت بررسی‌های بیش‌تر در شرایط in vino برای ساخت داروهایی با منشا گیاهی در درمان بیماری‌های نقص ایمنی می‌باشند.

## سپاسگزاری

بودجه پژوهشی این پژوهش توسط دانشکده علوم و فن آوری‌های نوین دانشگاه اصفهان تامین شده است، لذا بدین وسیله از معاونت پژوهشی و کلیه مسئولین دانشکده تشکر و قدردانی به عمل می آید.

## References

1. Philippi ME, Duarte BM, Da Silva CV, De Souza MT, Niero R, Cechinel Filho V, et al. Immunostimulatory activity of Calophyllum brasilianse,ipomoea pes-caprae and matatba elaeagnoides demonstrated by human peripheral blood mononuclear cells prolipheration. Acta Pol Pharm 2010; 67(1): 69-73.
2. Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plant in Latin America: a personal view. J Ethnopharmacol 2005; 100(1-2): 131-134.
3. Tan BK, Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. Curr Med Chem 2004; 11(11): 1423-1430.
4. Song JY, Han SK, Son EH, Pyo SN, Yun YS, Yi SY. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. Int immunopharmacol 2002; 2(7): 857-865.
5. Abeysinghe PD, Pathirana RN, Wanigatunge RP. Evaluation of antibacterial activity of different mangrove plant extracts. RJS 2006; 1(1): 104-112.
6. Bobbarala V, Vadlapudi VR, Naidu KC. Antimicrobial potentialities of Mangrove plant Avicennia marina. JPR 2009; 2(6): 1019-1021.
7. Ravikumar S, Gnanadesigan M, Suganthi P, Ramalakshmi A. Antibacterial potential of chosen mangrove plants against isolated urinary tract infections bacterial pathogens. Int J Med Med Sci 2010; 2(3): 94-99.
8. Behbahani M. Evaluation of anti-HIV-1 activity of a new iridoid glycoside isolated from Avicenna marina, in vitro. Int Immunopharmacol 2014; 23(1): 262-266.
9. Alizadeh Behbahani B, Shahidi F, Tabatabaei Yazdi F, Mohebbi M. Antifungal effect of aqueous and ethanolic mangrove plant extract on pathogenic fungus "in vitro". I J A P P 2013; 4(7): 1652-1658.
10. Beula JM, Gnanadesigan M, Rajkumar PB, Ravikumar S, Anand M. Antiviral, antioxidant and toxicological evaluation of mangrove plant from South East coast of India. Asian Pacific J Tropical Biomed 2012; 2(1): 352-357.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

11. Zamani Gandomani M, Forouzandeh Molaali E, Zamani Gandomani Z, Madani H, Moshtaghian SJ. Evaluation of Anti-Inflammatory Effect of Hydroalcoholic Extract of Mangrove (Avicennia Marina) Leaves in Male Rats. MJTUMS 2012; 34(4): 80-85 (Persian).
12. Momtazi-borojeni AA, Behbahani M, Sadeghi-aliabadi H. Antiproliferative activity and apoptosis induction of crude extract and fractions of Avicennia marina. Iran J Basic Med Sci 2013; 16(11): 1203-1208.
13. Fathi Moghaddam H, Mokhtari M, Kamaei L, Ahangarpour A. Effects of Avicennia Marina Leaves Aqueous and Hydro Alcoholic Extract on Streptozotocin-Induced Diabetic Male Rats. J Rafsenjan Univ Med Sci 2011; 10(4): 245-254 (Persian).
14. Karami L, Majd A, Mehrabian S, Nabiuni M, Salehi M and Irian S. Antimutagenic and anticancer effects of Avicennia marina leaf extract on Salmonella typhimurium TA100 bacterium and human promyelocytic leukaemia HL-60 cells. Sci Asia 2012; 38(4): 349-355.
15. McCann J, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/ microsome test: Assay of 300 chemicals: Discussion. Precede Nat Acad Sci 1976; 73(3): 950-954.
16. Khafagi I, Gab-Alla A, Salama W, Fouda, M. Biological activities and phytochemical constituents of the gray mangrove Avicennia marina (Forssk.) Vierh. EBB Soc 2003; 5: 62-69.
17. Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat Res 1983; 113(3-4): 173-215.
18. Ame BN. The detection of chemical mutagens with enteric bacteria. In Chemical Mutagens, Principles and Methods 1971; 267-282.
19. Rezai-Basiri M, Samini M, Ghazi-Khansari M, Sahebgharani M, Partoazar A. Monitoring Ames assay on urine of clinical pathology laboratories technicians. J Pharmacol Toxicol 2008; 3(3): 230-235.
20. Feng Y, Li XM, Duan XJ, Wang BG. Irridoid glucosides and flavones from the aerial parts of Avicennia marina. Chem biodivers 2006; 3(7): 799-806.
21. Han L, Huang X, Dahse HM, Moellmann U, Fu H, Grabley S, et al. Unusual naphthoquinone derivatives from the twigs of Avicennia marina. J Nat Prod 2007; 70(6): 923-927.
22. Tajbakhsh S, Mahmudpur M, Haghighi MA. Antibacterial activity of Avicennia marina leaves extract on Staphylococcus aureus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. ISMJ 2005; 8(1): 1-7.
23. Zandi K, Taherzadeh M, Yaghoubi R, Tajbakhsh S, Rastian Z, Fouladvand M, et al. Antiviral activity of Avicennia marina against herpes simplex virus type 1 and vaccine strain of poliovirus (An in vitro study). JMPR 2009; 3(10): 771-775.
24. Namazi R, Zabihollahi R, Behbahani M, Rezaei A. Inhibitory Activity of Avicennia marina, a Medicinal Plant in Persian Folk Medicine, against HIV and HSV. Iran J Pharm Res 2013; 12(2): 435-443.
25. Chiang LC, Ng LT, Chiang W, Chang MY, Lin CC. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpinoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species. Planta med 2003; 69(7): 600-604.
26. Tan BK and Vanitha J. Immunomodulatory and antimicrobial effects of some traditional Chinese medicinal herbs: a review. Current Med Chem 2004; 11(11): 1423-1430.
27. Fang X, Chen X. Structure elucidation and

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]

immunological activity of a novel pectic polysaccharide from the stems of Avicennia marina. Eur Food Res Tec 2013; 236(2): 243-248.

28. Chiou WF, Chen CF, Lin JJ. Mechanisms of suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in RAW 264.7 cells by andrographolide. Br J Pharmacol 2000; 129(8): 1553-1560.
29. Phapale R, Mirsa-Thakur S. Antioxidant activity and antimutagenic effect of phenolic compounds in Feronia limonia (L) Swingle Fruit. Int J Pharm Sci 2010; 2(4): 68-73.
30. Resende FA, Munari CC, de Azevedo Bentes Monteiro Neto M, Tavares DC, Bastos JK, da Silva Filho AA, et al. Comparative studies of the (Anti) mutagenicity of Baccharis dracunculifolia and artepillin C by the bacterial reverse mutation test. Molecules 2012; 17(3): 2335-2350.
31. Eren Y, Özata A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of Limonium globuliferum aqueous extracts by Allium, Ames, and MTT tests. Rev Bras Farmacogn 2014; 24(1): 51-59.

[ Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-26 ]