بررسی اثر ضد جهش‌زایی کرم‌های آرایشی- بهداشتی دارای عصاره اتانولی پروپولیس به وسیله آزمون Ames

میترا هاتفی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات،
صدیقه مهرابیان: دانشگاه تربیت معلم،
اشرف السادات نوحی: دانشگاه تهران
رباب رفیعی طباطبایی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

زنبورهای عسل کارگر[1] پروپولیس (بره موم) را از بخش‌های در حال رشد درختان و جوانه‌ها جمع‌آوری می‌کنند. زنبورها، شیره‌های گیاهی را روی پاهای عقبی خود متراکم و تا کندو حمل می‌کنند. سپس آن را با موم و سایر ترشحات غدد شکمی زنبور مخلوط کرده و به صورت ماده چسبنده‌ای درمی‌آورند. یك نمونه معمولی پروپولیس دارای ۵۰ نوع ماده مختلف است که در این میان رزین‌ها و صمغ‌های گیاهی (۵۰%)، موم‌ها (۳۰%)، اسانس‌های روغنی (۱۰%) و بقیه گرده گل‌ها هستند. تاکنون حدود ۱۸۰ ترکیب مختلف در پروپولیس یافت شده است. هدف از این تحقیق، تعیین اثرات ضد جهش‌زایی کرم‌های آرایشی دارای عصاره اتانولی پروپولیس (EEP) در برابر دو ماده جهش‌زای شناخته شده آزید سدیم (NaN_3) و پرمنگنات پتاسیم ($KMnO_4$) با استفاده از آزمون ایمز و میکروزوم است. در این آزمون از سویه‌های مختلف[2] به نام‌های TA100 و TA97 استفاده شد که هر یك حامل یك جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود هستند. سویه‌های جهش یافته His^- بر روی محیط کشت حاوی حداقل مواد معدنی و گلوکز در حضور مواد شیمیایی جهش‌زا مورد آزمایش کشت داده شدند. به این ترتیب فقط آن دسته از باکتری‌هایی که با جهش برگشتی، His^+ شده بودند، قادر به رشد و تشکیل کلنی بودند. وجود ماده‌ی ضدجهش (عصاره اتانولی پروپولیس) در کنار ماده‌ی جهش‌زا، میزان جهش برگشتی را کاهش داده که با استفاده از فرمول می‌توان درصد ممانعت از جهش را محاسبه کرد. علاوه بر این وجود اختلاف معنی‌دار بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با ماده‌ی جهش‌زا، با نرم‌افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شد. به طور کلی، یافته‌های حاصل از آزمون‌های ضد جهش‌زایی در *in vitro* نشان داد که عصاره اتانولی پروپولیس در غلظت‌های ۰/۱ تا ۴ درصد می‌تواند اثرات جهش‌زایی این مواد شیمیایی را در یك وضعیت دوز- پاسخ خنثی کند. نتایج به دست آمده از آزمون میکروزوم (S_9)، همچنین توانایی بالقوه پروپولیس را در بازدارندگی از جهش و در نتیجه سرطان نشان می‌دهد. بنابراین این ماده می‌تواند در فرمولاسیون کرم‌های آرایشی به دلایل فوق به کار گرفته شود.

[1]. *apis mellifera L., apidae*
[2]. *salmonella typhimurium*

واژه‌های کلیدی: آزمون ایمز، بره‌موم، ضد جهش‌زایی، میکروزوم، $KMnO_4$، NaN_3.
دریافت ۸۶/۹/۲۴ پذیرش ۸۷/۹/۱۸

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

پروپولیس از لغت pro (به معنای پیش) و polis (به معنای شهر) تشکیل شده است و از آن‌چه زنبورداران در زمان‌های گذشته مشاهده کرده‌اند برگرفته شده است. آن‌ها مشاهده کردند که زنبورها دیوار و یا سدی از بره‌موم در جلو منفذ کندو می‌سازند (برای مثال: پیش شهر). بره موم، می‌تواند باعث استحکام ساختمانی، بهبود وضع تهویه وکاهش لرزش شود و از طریق مسدود کردن راه‌های عبور فرعی، قدرت دفاعی کندو را در مقابل مهاجمان بیفزاید. همچنین نشان داده شده است که این ماده می‌تواند لارو باسیلوس[۱](عامل مهم‌ترین بیماری باکتریایی زنبورها) را از بین ببرد [۱].

تحقیقات دانشمندان مختلف، طیف وسیعی از اثرات آن، شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، تغییردهنده سیستم ایمنی و ضد توموری [۲] را نشان داده است. مهم‌ترین اجزای فعال فارماکولوژیك موجود در بره‌موم عبارتند از: فلاونز، فلاونولز، فلاوانونز (که جمعاً فلاونوئیدها نامیده می‌شوند) و سایر ترکیبات فنولیك و آروماتیك. تا کنون حدود ۳۸ نوع فلاونوئید مختلف از بره‌موم جدا شده‌اند. مهم‌ترین این مواد عبارتند از: گالانگین[۲]، کائمپفرول[۳]، کوئرستین[۴]، پینوسمبرین[۵]، پینواستروبین[۶] و تعدادی از اسیدهای فنولیك مانند سینامیل‌الکل، سینامیك‌اسید، وانیلین، بنزیل‌الکل‌ها، اسیدبنزوئیك، اسیدکافئیك و اسیدفرولیك[۳]. به طور کلی، خواص و رنگ بره‌موم بستگی به منبع گیاهی خاصی دارد که هر کندو از آن استفاده می‌کند[۴].

هدف این پژوهش، تعیین اثرات ضد جهش‌زایی عصاره اتانولی بره‌موم (EEP) در برابر دو مادهٔ جهش‌زای شناخته شده آزید سدیم (NaN_3) و پرمنگنات پتاسیم ($KMnO_4$) با استفاده از آزمون ایمز و عصارهٔ میکروزومی است.

در این آزمون از سویه‌های مختلف *سالمونلا تیفی‌موریوم*[۷] به نام‌های TA ۱۰۰ و TA ۹۷ استفاده شد که هر یك حامل یك جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود هستند. این جهش مانع از سنتز اسید آمینهٔ هیستیدین می‌شود، در صورتی که سویهٔ وحشی یا پروتوتروف (His^+) قادر است با استفاده از نیتروژن غیرآلی (فسفات آمونیوم) و در حضور منبع کربن مناسب (گلوکز)، این اسید آمینهٔ ضروری را بسازد.

سویه‌های جهش یافته (His^-) *سالمونلا تیفی‌موریوم* بر روی پلیت حاوی محیط معدنی و حداقل گلوکز با وجود مادهٔ شیمیایی جهش‌زا مورد آزمایش کشت داده شدند و به این ترتیب فقط آن دسته از باکتری‌هایی که با جهش برگشتی His^+ شده‌اند، قادر به رشد و تشکیل کلنی خواهند بود. وجود مادهٔ ضد جهش در کنار مادهٔ جهش‌زا، میزان کلنی‌های برگشتی را کاهش داده و با شمارش تعداد آن‌ها می‌توان با استفاده از فرمولی که در قسمت نتایج آورده شده است، میزان ممانعت از جهش را محاسبه کرد.

---

۱. *Bacillus larvae* ۲. galangin ۳. kaempferol ۴. quercetin
۵. pinocemberin ۶. Pinostrobin ۷. *Salmonella typhimurium*

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

آزید سدیم، مادهٔ جهش‌زای خطرناکی است که جهش‌های ناشی از شکستگی کروموزومی ایجاد می‌کند. در سویه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم جهش یافته، این ماده سبب می‌شود که جهش‌یافته‌های جای‌گزینی بازی به حالت اولیه خود بازگشت پیدا کنند. فرآیند جهش در سویه‌های دارای نقص در سیستم ترمیم در تاریکی تسهیل می‌گردد. پرمنگنات پتاسیم، به عنوان مادهٔ اکسید کننده قوی جهش‌های زیادی در سالمونلا تیفی‌موریوم ایجاد می‌کند [۵].

خاصیت دیگر این آزمون استفاده از میکروزوم کبدی (S_9) برای فعال کردن برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زا ست. بسیاری از این ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی یا سرطان‌زایی باید از نظر متابولیك (اکسیداتیو یا احیایی) فعال گردند و از آن جا که باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا عصارهٔ استریل میکروزومی از بافت پستانداران (مانند rat) به آزمون بررسی اثر ضد جهش‌زایی اضافه شد.

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی: همهٔ مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمون از شرکت مرک[۱] تهیه شد. در این پژوهش آزید سدیم و پرمنگنات پتاسیم به عنوان مواد جهش‌زا به کار گرفته شدند.
- میکروارگانیسم‌های آزمون: سویه‌های باکتریایی سالمونلا تیفی‌موریوم TA۱۰۰ و TA۹۷ در این بررسی استفاده شد.
- تأیید ژنوتیپ سویه‌های آزماینده: این کار قبل از شروع هر آزمون باید انجام شود. برای این منظور از کشت‌های نوترینت‌برات شبانه استفاده شد. سویه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم دارای یك نقص و یا موتاسیون در ژن ترمیم در برابر تاریکی (uvrB) هستند و قادر به سنتز پروتئین دیواره سلولی نیز نیستند (rfa). همچنین سویه‌ها برای حضور فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین بررسی شدند. این یك شناساگر[۲]متداول است که می‌تواند حضور پلاسمید R- فاکتور را نشان دهد [۶].
- مخلوط میکروزومی: تهیهٔ مخلوط S_9 مطابق با روش شرح داده شده به وسیلهٔ مارن و ایمز[۳](۱۹۸۲) انجام گرفت. عدم آلودگی فرآورده، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از مخلوط S_9 به محیط کشت top agar و ریختن آن روی محیط MGA[۴] انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، ازاستریل بودن مخلوط تهیه شده اطمینان به عمل آمد و سپس برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد [۷].
- تهیهٔ نمونه: برمموم در اواخر زمستان از شهری نزدیك استان خراسان تهیه شد. سپس عصاره الکلی به این ترتیب تهیه گشت: مقدار ۹۰ گرم برمموم به ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵ درجهٔسانتی‌گراد مخلوط شد. سپس مخلوط به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۲۰ درجهٔسانتی‌گراد در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی[۵] در لوله جمع‌آوری و رسوبات مجدداً با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول عصاره‌گیری شد و مراحل قبل تکرار گردید. به این ترتیب عصارهٔ غلیظ mg/ml (۲-۱) تهیه و برای حذف اثر ضدمیکروبی اتانول، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه روتاری ایواپریتور[۶] تکان داده شد[۸]. درصدهای متفاوتی از عصارهٔ الکلی(۵-۰/۱)% در این آزمایش استفاده شد.

۱. merk co. Ltd ۲. marker ۳.maron and ames ۴.minimal glucose agar
۵.supernatant ۶. rotary evaporator

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

- تعيين فعاليت ضدميكروبی (MIC): روش رقت در آگار مطابق با دستورالعمل NCCLS[1] انجام گرفت. مقادير متفاوت برمموم به محلول‌های آگار استريل در دمای ۴۸ درجهٔسانتی‌گراد برای رسيدن به غلظت نهايی (۵-۰/۱)% اضافه شد و پس از اختلاط كامل در پليت‌های استريل ريخته شد تا سرد شود. تلقيح با اضافه كردن۰/۱ ميلی‌ليتر از اينوكولوم باكتريايی (۱-۲×۱۰^{۹} cfu/ml) سويهٔ وحشی سالمونلا تيفی‌موريوم و توزيع يكنواخت آن روی سطح آگار دارای برمموم انجام گرفت. با استفاده از ميلهٔ شيشه‌ای Z شكل استريل تمامی سطح پليت به طور كامل پوشش داده شد. پليت‌ها در دمای ۳۷ درجهٔسانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت ممانعت كننده از رشد (MIC) پايين‌ترين غلظتی از EEP[2] بود كه از هرگونه رشد باكتريايی جلوگيری می كرد[۹].

آزمون ضد جهش‌زايی: آزمون ضد جهش‌زايی بر اساس آزمون سالمونلا/ميكروزوم شرح داده شده [۱۰] به وسيلهٔ مارن و ايمز(۱۹۸۲) و نيز آزمون تغيير داده شده به وسيلهٔ مورتلمن و زيگر[3] (۲۰۰۰) انجام گرفت[۱۱]. روش كار با استفاده از طی كردن ۱۰ دقيقه دورهٔ پيش انكوباسيون در دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد با اضافه كردن ۱۰۰ ميكروليتر از سويه‌های باكتريايی رشد داده شده (كشت شبانه ۱۶ ساعته) با غلظت (۱-۲×۱۰^{۹} cfu/ml)، ۱۰۰ ميكروليتر از غلظت‌های مختلف EEP استريل و ۱۰۰ ميكروليتر عوامل جهش‌زا در لوله‌های تاپ آگار انجام گرفت. در همهٔ آزمايش‌ها برای كنترل‌های منفی، ۱۰۰ ميكروليتر آب مقطر و برای كنترل‌های مثبت ۱۰۰ ميكروليتر از NaN_3 و $KMnO_4$ اضافه شد. به منظور انجام چند چرخه تقسيم سلولی و ايجاد زمينه رشد باكتريايی كه با چشم مسلح قابل رؤيت و شمارش باشد، ۱۰۰ ميكروليتر از محلول ۰/۵ ميلی مولار هيستيدين/ بيوتين به هر لوله اضافه شد. بعد از ريختن محتويات لوله‌های تاپ آگار روی پليت‌های مينيمال گلوكز آگار و گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔسانتی‌گراد، تعداد كلنی‌های برگشتی در هر پليت شمارش شد. برای اطمينان از درستی نتايج برای هر ماده، پليت‌های دوگانه[4] در نظر گرفته شد. آزمون ضد تومورزايی، مطابق با روش ضد جهش‌زايی در حضور مخلوط S_9 انجام شد [۱۲].

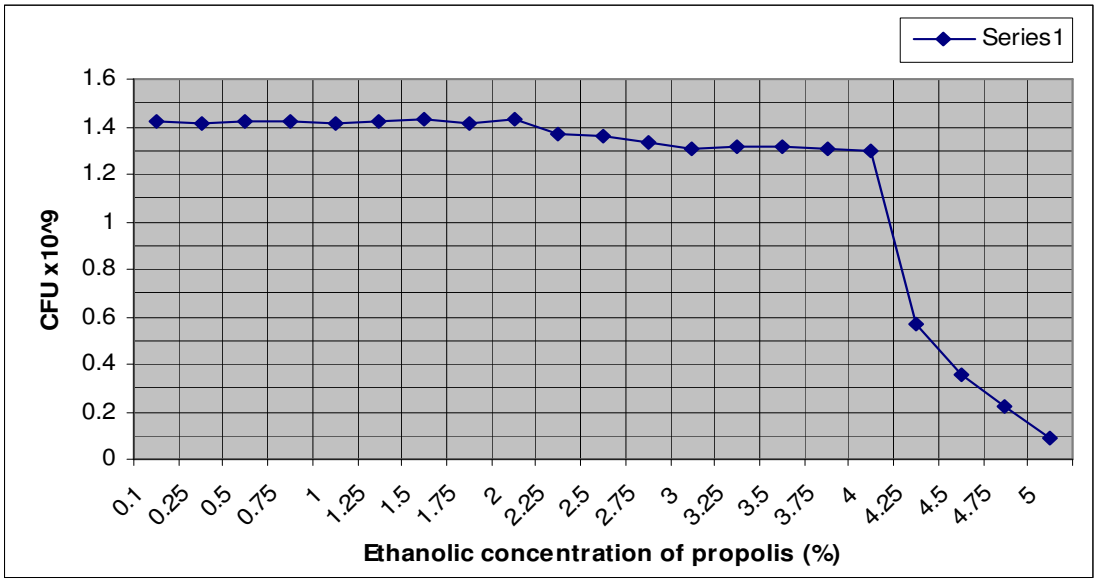
نتايج

مقادير MIC به دست آمده از آزمون ضد باكتريايی انجام گرفته به روشنی نشان داد كه برمموم (EEP) ۵% دارای خاصيت ضد باكتريايی عليه سالمونلا تيفی‌موريوم هستند؛ اما در مورد غلظت‌های (۴-۰/۱)% عصارهٔ الكلی برمموم خاصيت ضد باكتريايی مشاهده نشد.

۱.national committee for clinical laboratory standard guideline

۲.ethanolic extract of propolis ۳.Mortelmans & Zeiger ۴.duplicate

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]



۱	۰.۲۵	۰.۵	۰.۷۵	۱	۱.۲۵	۱.۵	۱.۷۵	۲	۲.۲۵	۲.۵	۲.۷۵	۳	۳.۲۵	۳.۵	۳.۷۵	۴	۴.۲۵	۴.۵
۱.۴۲	۱.۴۱	۱.۴۲	۱.۴۲	۱.۴۱	۱.۴۲	۱.۴۳	۱.۴۱	۱.۴۲	۱.۳۷	۱.۳۶	۱.۳۳	۱.۳۱	۱.۳۲	۱.۳۲	۱.۳۱	۱.۳	۰.۵۷	۰.۳۶

نمودار و جدول ۱. فعاليت ضد باكتريايي بره‌موم در غلظت‌های مختلف

اثر ضد جهش‌زايی NaN_3 و $KMnO_4$ در غياب نمونه‌های مورد آزمايش به صورت ممانعت ۱۰۰% يا ۰% تعيين شد. محاسبهٔ درصد بازدارندگی مطابق فرمول زير انجام گرفت:

$$\text{درصد بازدارنگی} = [(A-B)/A]\times ۱۰۰(٪)$$

در اين فرمول B تعداد كلنی‌های برگشتی در هر پليت در حضور مادهٔ موتاژن و نمونهٔ مورد آزمايش و A تعداد كلنی‌های برگشتی در هر پليت در حضور كنترل مثبت است. تعداد فركانس جهش خودبه‌خودی از تفريق صورت و مخرج كسر به دست می‌آيد. اثرات ضد جهش‌زايی، زمانی كه اثر بازدارندگی بين ۲۵% تا ۴۰% باشد، متوسط و زمانی كه بيش‌تر از ۴۰% باشد، قوی قلمداد می‌شود. مقادير كم‌تر از ۲۵%، ضعيف بوده و جزء نتايج مثبت منظور نمی‌شود. در تحقيق انجام گرفته، اثر ضد جهش‌زايی به صورت منحنی دوز- پاسخ با دو مادهٔ پروموتاژن افزايش می‌يابد[۱۳].

جدول‌های ۲ و۳، به ترتيب نتايج گرفته شده در مورد مادهٔ جهش‌زای آزيد سديم و پتاسيم پرمنگنات را نشان می‌دهد.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۲. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی برەموم در *in vitro* در برابر آزید سدیم با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S_9

		سالمونلا تیفی موریوم TA97				سالمونلا تیفی موریوم TA100			
		در حضور S_9		در غیاب S_9		در حضور S_9		در غیاب S_9	
		درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی
کنترل منفی		-	۴۶	-	۳۵	-	۷۴	-	۵۱
کنترل مثبت		-	۹۲۸	-	۶۲۵	-	۱۱۰۸	-	۴۶۴
درصد غلظت پروپولیس	۰.۱	۲	۹۰۵	۱	۶۱۸	۴	۱۰۶۰	۲	۶۳۱
	۰.۵	۱۲	۸۱۵	۱۱	۵۵۷	۱۶	۹۳۴	۱۱	۵۷۳
	۱	۲۱	۷۳۳	۲۲	۴۸۶	۲۳	۸۵۵	۱۵	۵۵۲
	۱.۵	۳۱	۶۴۳	۳۵	۴۰۹	۳۰	۷۷۸	۲۸	۴۶۷
	۲	۳۵	۵۹۹	۳۷	۳۹۵	۳۴	۷۳۵	۳۱	۴۴۵
	۲.۵	۴۰	۵۶۰	۴۰	۳۷۶	۳۶	۷۰۴	۳۴	۴۲۸
	۳	۴۴	۵۲۴	۴۳	۳۵۹	۴۰	۶۶۳	۴۰	۳۸۷
	۳.۵	۴۸	۴۷۸	۴۵	۳۴۳	۴۹	۵۶۸	۴۷	۳۴۰
	۴	۵۵	۴۱۸	۵۲	۳۰۰	۵۵	۴۹۷	۵۵	۲۹۰

جدول ۳. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی برەموم در *in vitro* در برابر پتاسیم پرمنگنات با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S_9

		سالمونلا تیفی موریوم TA97				سالمونلا تیفی موریوم TA100			
		در حضور S_9		در غیاب S_9		در حضور S_9		در غیاب S_9	
		درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی
کنترل منفی		-	۳۸	-	۳۳	-	۴۸	-	۴۲
کنترل مثبت		-	۵۸۹	-	۳۹۸	-	۶۶۹	-	۴۶۳
درصد غلظت پروپولیس	۰.۱	۱	۵۸۶	۲	۳۹۲	۱	۶۶۰	۱	۴۵۹
	۰.۵	۴	۵۶۵	۱۰	۳۵۹	۹	۶۰۹	۵	۴۴۲
	۱	۸	۵۴۳	۱۹	۳۲۳	۱۶	۵۶۱	۸	۴۲۵
	۱.۵	۱۱	۵۲۳	۲۸	۲۸۵	۲۴	۵۰۹	۱۱	۴۱۲
	۲	۱۴	۵۰۴	۳۷	۲۵۱	۲۷	۴۸۷	۱۹	۳۷۷
	۲.۵	۱۹	۴۲۹	۴۸	۲۰۵	۳۲	۴۵۵	۲۷	۳۴۰
	۳	۲۲	۴۶۱	۵۹	۱۶۴	۳۸	۴۱۷	۳۴	۳۰۴
	۳.۵	۲۵	۴۳۹	۶۹	۱۲۵	۴۲	۳۸۵	۴۴	۲۶۱
	۴	۲۹	۴۱۷	۷۸	۸۸	۴۸	۳۴۹	۵۱	۲۲۸

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

نتایج حاصل از تعداد کلنی‌های برگشتی در هر سویهٔ آزمایشی با در نظر گرفتن شاهد منفی (آب مقطر استریل + باکتری) و شاهد مثبت (آزید سدیم و یا پتاسیم پرمنگنات + باکتری) وارد برنامهٔ نرم‌افزاری SPSS شد. نتایج با توجه به آزمون HSD[۱] بررسی و تجزیه و تحلیل شدند[۱۴]. با توجه به تعیین حدود اطمینان و معنی‌داری در ارتباط با سویه‌های گفته شده و غلظت‌های مختلف مادهٔ آزمودهٔ $P\leq ۰/۰۵$ می‌توان از درستی نتایج آزمون‌ها در حضورهر دو نوع مادهٔ جهش‌زای به کار برده شده، اطمینان حاصل کرد.

بحث

برهموم مادهٔ چسبنده صمغ‌مانندی است که زنبورها از جوانه برگ‌ها و پوست درختان به‌خصوص درختان تبریزی، توس و کاج جمع‌آوری می‌کنند. برهموم حاوی مقادیر فراوانی از ویتامین‌ها به خصوص ویتامین ب کمپلکس، ویتامین C، ویتامین E، و پرووویتامین A است. این ماده دارای مواد معدنی و عناصر کمیابی مانند کلسیم، منیزیم، آهن، روی، سیلیکا، پتاسیم، فسفر، منگنز، کبالت و مس است. علاوه بر این، برهموم حاوی مقادیر بسیار زیادی از بی‌فلاونوییدهاست. فلاونوییدها ترکیبات گیاهی شناخته‌شده‌ای هستند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و نیز خواص ضد التهابی هستند.

نتایج به دست آمده از آزمون ضد باکتریایی نشان داد که برهموم در مقادیر بیش از ۴% برای سالمونلا تیفی‌موریوم سویهٔ وحشی سمی است؛ ولی در غلظت‌های بین ۰/۱% تا ۴% هیچ گونه اثر سمی مشاهده نمی‌شود. از همین روی، مقادیر بیش از ۴ %، برای بررسی خواص ضد جهش‌زایی مورد نظر قرار نگرفتند.

وجود اختلاف معنی‌دار ($P\leq ۰/۰۵$) بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با موتاژن‌ها و نیز غلظت‌های مختلف ۰/۱% تا ۴% عصاره الکلی با استفاده از آزمون‌های آماری (HSD) تفسیر شد. بررسی آزمون‌های آماری صحت نتایج به دست آمده را تأیید می‌کند.

رائو[۲] و همکاران در سال ۱۹۹۲ اثرات ضد جهش‌زایی سه استر اسید کافئیك موجود دربرهموم را نشان دادند و آن را به طور مصنوعی ساختند. آن‌ها توانایی ضد جهش‌زایی این مواد را در مقابل سویه‌های TA100 & TA8 و مادهٔ جهش‌زای ۳ و۲- دی‌متیل-۴- آمینوبی‌فنیل[۳] نشان دادند [۱۵]. سیزمارک[۴] و همکاران در سال ۱۹۹۸ اثر ضد جهش‌زایی نیتروین[۵] و نیتروگواندین[۶] را در مقابل TA100 & TA97 بررسی کردند[۱۶]. جینگ[۷] و همکاران در سال ۲۰۰۰، مدارکی دال بر ماهیت ضد جهش‌زایی دو دسته از جهش‌زاهای مستقیم و غیرمستقیم را ارائه کردند. در بررسی آن‌ها برای مادهٔ جهش‌زای مستقیم از 1-NP و 1-NO و مادهٔ جهش‌زای غیرمستقیم از IQ و بنزوα پیرین[۸] در حضور مخلوط میکروزومی S_9 استفاده شده بود[۱۷].

۱. tuckey test, honest significant difference ۲. Rao ۳. 3,2-dimethyl-4-aminobiphenyl
۴. Cizmarik ۵. nitrovin ۶. nitroguanidine ۷. Jeng ۸.benzo[α]pyrene

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

فو[۱] و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثرات ضد جهش‌زایی برەموم را در شرایط *in vitro* و *in vivo* بررسی کردند. در پژوهش آن‌ها از سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 & TA97 به عنوان مدل آزمایشی در *in vitro* در برابر مادهٔ جهش‌زای مستقیم DMC و مادهٔ جهش‌زای غیرمستقیم 2AF با یا بدون استفاده از مخلوط میکروزومی S_9 استفاده شده بود. آن‌ها نشان دادند که برەموم می‌تواند از جهش‌زایی هر دو مادهٔ جهش‌زای DMC و 2AF در يك وضعيت دوز- پاسخ جلوگيری كند[۱۸]. ماریا اهل[۲] و همکاران در سال ۲۰۰۳، اثرات ضد جهش‌زایی کریسین[۳] (CR) را روی سویه‌های باکتریایی TA100 & TA98 در مقابل مواد جهش‌زای مستقیم (PhIP)[۴] و بنزوα پیرن نشان دادند. آن‌ها محدوده مناسب برای بروز اثرات ضد جهش‌زایی را 10-100 μg/ml تعیین کردند[۱۹].

در بررسی‌های ما با سالمونلا تیفی موریوم TA100 & TA97، در همهٔ دوزهای عصارهٔ الکلی برەموم مورد آزمایش (علی رغم حضور S_9 یا در غیاب آن) توانایی ممانعت از جهش‌زایی در مورد دو موتاژن $KMnO_4$ و AZS در يك رابطهٔ دوز- پاسخ وجود دارد. از سوی دیگر، نتایج به دست آمده از فعالیت‌های ضد میکروبی برەموم نشان داد که برەموم در غلظت بیش از ۴% برای سویه‌های آزماینده TA100 & TA97 سمی است و متعاقباً در این غلظت‌ها اثرات ضد میکروبی به اثرات ضد جهش‌زایی ارجحیت دارد. آزمون ضد تومورزایی بر پایهٔ نتایج آزمون میکروزوم با مخلوط S_9، نتایج آزمون ضد جهش‌زایی را تأیید می‌کند.

نتیجه گیری

در پایان ما به این نتیجه رسیدیم که بهترین محدوده مناسب غلظت برای ظهور اثرات ضد جهش ۰/۱% تا ۴% است. مکانیسم عمل ضد باکتریایی برەموم پیچیده است و هیچ شباهتی با سایر آنتی‌بیوتیك‌های کلاسیك ندارد؛ اما باید به این نکته اشاره کرد که از تقسیم سلول باکتریایی به وسیلهٔ برەموم ممانعت می‌شود (مانند نالیدیکسیك اسید که معلوم شده است از همانندسازی DNA و در نتیجه تقسیم سلولی ممانعت می‌کند). بعضی از پژوهندگان معتقدند که برەموم می‌تواند مانع از فعالیت RNA پلیمراز وابسته به DNA شود [۲۰].

صدمه ژنتیکی از راه‌ها و مکانیسم‌های مختلفی ایجاد می‌شود و هیچ يك از این آزمون‌ها به تنهایی نمی‌تواند همه مکانیسم‌های احتمالی را بررسی کند؛ از همین روی، باید از مجموعه‌ای از این ابزارها بهره جست. جزئیات مکانیسم ضد جهش‌زایی برەموم و ترکیبات آن هنوز ناشناخته است. به منظور شناسایی این نکته که کدام يك از ترکیبات برەموم باعث ایجاد اثرات ضد جهش می‌شوند و نیز مکانیزم احتمالی آن ترکیبات، باید منتظر پژوهش‌های دیگر شد.

۱. Fu ۲. maria Uhl ۳. chrysin ۴. 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4.5-b]pyridine ۵. benzo[α]pyrene

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

منابع

1. Lubbe J, Politta SS. Propolis, beeswax and the sensitization potential of topical calcineurin inhibitors. Clinical and experimental Dermatology (2006) 31(1)147.
2. Kawabe M, lin C, kimoto N, Sano M, Hirose M. Modifying Effects of propolis on Mel Qx promotion of Rat hepatocarcinogenesis and in a female Rat two- stage carcinogenesis model after multiple carcinogen initiation. Nutrition and Cancer (2000) 37(2)179-86.
3. Harborne JB. The Flavonoids Advances in research since 1986. 1st ed. Boca Raton, Florida: Chapman & Hall/CRC (1994).
4. Isla MI. Study on propolis quality from Argentina. Biocell (2005) 29(1) 60.
5. Olsen O, Wang X, Wettstein DV. Sodium Azide mutagenesis: preferential generation of A.T to G.C transition in the barley *Ant18* gene Proc Natl Acad Sci USA (1993) 90, 8043-7.
6. FDA. Introduction to the Template for in vitro Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test Center for food safety and applied nutrition (2004).
7. Mehrabian S. The Study of Antioxidant and anticarcinogenic Green Tea and Black Tea . Pakistan Journal of Biological Sciences (2007).
8. Najafi MF, Vahedi F, Seyyedin M, Jomehzadeh HR, Bozary K. Effect of the water extracts of propolis on stimulation and inhibition of different cells. Cytotechnology. (2007) 54:49-56.
9. Wikler MA. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 7th ed.: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); (2006).
10. Maron DM, Ames BN. Revised Method for the Salmonella mutagenicity test. Mutation Research (1982) 113:173-215.
11. Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay. Mutation research (2000) 455:29-60.
12. Horn RC, Vargas VMF. Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *Salmonella*/microsome assay Mutagenesis (2003)18(2):113-8.
13. Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC. An emprical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella tests. Mutation Research (1992) 97:267-81.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]

14. Spjotovoll E, Stoline MR. An extension of the T-method of multiple comparison to include the cases with unequal sample sizes. Am Statist Assoc (1973) 68:976-8.
15. Rao CV, Desai D, Kaul B, Amin S, Reddy BS. Effect of caffeic acid esters on carcinogen - induced mutagenicity and human colon adenocarcinoma cell growth. Chem and Biol Interact (1992) 84(3):277-90.
16. Cizmarik J, Lahitova N. Antimutagenicity of propolis. Pharmazie. (1998) 53:883-4.
17. Jeng SN, Shih MK, Kao CM, Liu TZ, Chen SC. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. Food and Chemical Toxicology (2000) 38(10):893-7.
18. Fu JY, Xia Y, Zheng YY. Antimutagenicity of propolis against some mutagens in vitro and in vivo. Biomed Environ Sci. (2004) 17(4):469-75.
19. Uhl M, Ecker S, kassie F, Lhoste E, Chakraborty A, Mohn G, et al. Effect of Chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo [4,5-*b*] pyridine (PhlP) and benzo(a)pyrene (B(a)p) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells. Archives of toxicology (2003) 84-477:(8)77.
20. Garedew A, Schmolz E, Lamprecht I. Microbiological and calorimetric investigations on the antimicrobial actions of different propolis extracts: an in vitro approach. Thermochimica Acta (2004) 422 (1-2) 115-24.

[Downloaded from c4i2016.khu.ac.ir on 2024-10-12]