بررسی خواص ضد جهش‌زایی عصاره الکلی بره‌موم به وسیله سالمونلا تیفی‌موریوم و میکروزوم

میترا هاتفی[1*]، صدیقه مهرابیان[2]، اشرف السادات نوحی[3]، رباب رفیعی طباطبایی[4]

۱- دانشجوی دکترای تخصصی میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

۲- استاد،گروه زیست شناسی، دانشگاه تربیت معلم تهران

۳- استاد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه تهران

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد تهران - شمال دانشگاه آزاد اسلامی

تاریخ دریافت ۸۶/۱۱/۷، تاریخ پذیرش ۸۷/۱/۲۸

چکیده

مقدمه: در این تحقیق، اثر ضدجهش‌زایی عصاره الکلی بره‌موم (پروپولیس) به وسیله آزمون ایمز در برابر دو ماده جهش‌زای آزید سدیم و پتاسیم پرمنگنات، در غیاب و حضور میکروزوم‌های کبدی موش (S_9) مورد بررسی قرار گرفته است.

روش‌کار: در این مطالعه تجربی ابتدا از غلظت‌های متفاوتی از عصاره الکلی بره‌موم (۵-۰/۱) درصد، جهت تعیین محدوده‌ی اثر باکتریوسایدی (MIC) بر روی سویه‌های آزماینده استفاده شد. سپس با استفاده از روش آزمون ایمز، اثر ضدجهش‌زایی در محدوده‌ی غیرسمی بررسی شد. در این آزمون از سویه‌های مختلف سالمونلا تیفی موریوم به نام‌های TA100 و TA97 استفاده شد که هر یک حامل یک جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود می‌باشند. سویه‌های جهش یافته His^- بر روی پلیت حاوی حداقل مواد معدنی و گلوکز در حضور مواد شیمیایی جهش‌زا مورد آزمایش کشت داده شدند و 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 الکلی بره‌موم) در کنار ماده‌ی جهش‌زا، میزان کلنی‌های برگشتی را کاهش داده که با شمارش تعداد آن‌ها می‌توان با استفاده از فرمول، میزان ممانعت از جهش را محاسبه کرد. اختلاف بین متوسط تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در ارتباط با ماده‌ی جهش‌زا، توسط نرم‌افزار آماری SPSS و با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل گردید.

نتایج: مقادیر MIC به دست آمده به روشنی نشان داد که عصاره‌ی الکلی بره‌موم در غلظت ۵ درصد دارای خاصیت ضدباکتریایی علیه سالمونلا تیفی‌موریوم می‌باشند. از سوی دیگر در مورد غلظت‌های۴-۰/۱ درصد این خاصیت مشاهده نشده و معلوم گشت که عصاره‌ی الکلی می تواند در این غلظت‌ها، اثرات جهش‌زایی مواد شیمیایی فوق را در یک وضعیت دوز- پاسخ خنثی نماید.

نتیجه‌گیری: در پایان ما به این نتیجه رسیدیم که عصاره الکلی بره‌موم به واسطه‌ی دارا بودن انواع ترکیبات مهم مانند فلاونوئیدها دارای خواص ضدجهشی بوده و بالاترین میزان ممانعت از جهش، در غلظت ۴ درصد مشاهده شد که با نتایج حاصل از به کار بردن مخلوط میکروزومی نیز هماهنگی داشت. مکانیزم عمل ضدباکتریایی بره‌موم پیچیده بوده و هیچ شباهتی با سایر آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک ندارد، اما باید به این نکته اشاره کرد که بره‌موم، مانع از تقسیم سلول باکتریایی می‌شود. بعضی از محققین معتقدند که بره‌موم می‌تواند مانع از فعالیت RNA پلیمراز وابسته به DNA شود.

واژگان کلیدی: بره‌موم، ضدجهش‌زایی، میکروزوم، سالمونلا تیفی موریوم

* **نویسنده مسئول:** تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی

E-mail: mit_hatefi@yahoo.com

مقدمه

بره‌موم از لغت پرو[1] (به معنای پیش) و پلیس[2] (به معنای شهر) تشکیل شده است. طبق مشاهداتی که توسط زنبورداران در زمان‌های گذشته انجام گرفته است، زنبورها دیوار و یا سدی از بره‌موم در جلوی منفذ کندو می‌سازند (به عنوان: پیش شهر). بره موم، می‌تواند باعث استحکام ساختمانی، بهبود وضع تهویه وکاهش لرزش شده و از طریق مسدود نمودن راه‌های عبور فرعی، قدرت دفاعی کندو را در مقابل مهاجمین بالا می‌برد. هم‌چنین نشان داده شده است که این ماده می‌تواند باسیلوس لاروا[3] (عامل مهم‌ترین بیماری باکتریایی زنبورها) را از بین ببرد (۱).

تحقیقات دانشمندان مختلف، طیف وسیعی از اثرات این ترکیب شامل خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی، تغییردهنده سیستم ایمنی و ضد توموری (۲) را نشان داده است. مهم‌ترین اجزای فعال فارماکولوژیکی موجود در بره‌موم عبارتند از فلاونز، فلاونولز، فلاوانونز (که جمعاً فلاونوئیدها نامیده می‌شوند) و سایر ترکیبات فنولیک و آروماتیک. تاکنون حدود ۳۸ نوع فلاونوئید مختلف از بره‌موم جدا شده‌اند. مهم‌ترین این مواد عبارتند از: گالانگین[4]، کائمپفرول[5]، کوئرستین[6]، پینوسمبرین[7]، پینواستروبین[8] و تعدادی از اسیدهای فنولیک مانند سینامیل‌الکل، سینامیک‌اسید، وانیلین، بنزیل‌الکل‌ها، اسیدبنزوئیک، اسیدکافئیک و اسیدفرولیک(۳). به طور کلی، خواص و رنگ بره‌موم بستگی به منبع گیاهی خاصی دارد که توسط هر کندو مورد استفاده قرار می‌گیرد(۴).

در این آزمون از سویه‌های مختلف سالمونلاتیفی موریوم[9] به نام‌های TA100 و TA97 استفاده شد که هر یک حامل یک جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود می‌باشند. این جهش مانع از سنتز اسید آمینه‌ی هیستیدین می‌شود. در صورتی که سویه‌ی وحشی یا پروتوتروف (His^+) قادر است با استفاده از نیتروژن غیر آلی (فسفات آمونیوم) و در حضور منبع کربن مناسب (گلوکز)، این اسید آمینه‌ی ضروری را بسازد.

سویه‌های جهش یافته (His^-) سالمونلاتیفی موریوم، بر روی پلیت حاوی محیط معدنی و حداقل گلوکز، در حضور ماده‌ی شیمیایی جهش‌زا مورد آزمایش و کشت داده شدند. به این ترتیب فقط آن دسته از باکتری‌هایی که با جهش برگشتی His^+ شده‌اند، قادر به رشد و تشکیل کلنی خواهند بود. وجود ماده ضد جهش در کنار ماده 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.

آزید سدیم، ماده جهش‌زای خطرناکی است که ایجاد جهش‌های ناشی از شکستگی کروموزومی 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 یک ماده اکسید کننده قوی ایجاد جهش‌های زیادی در سالمونلا تیفی‌موریوم می‌کند (۵).

خاصیت دیگر این آزمون استفاده از میکروزوم کبدی (S_9) برای فعال کردن برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زا است. بسیاری از این ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی یا سرطان‌زایی، باید از نظر متابولیکی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال گردند و از آن جایی که باکتری سالمونلاتیفی موریوم قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا یک عصاره‌ی استریل میکروزومی از بافت پستانداران (مانند rat) به آزمون بررسی اثر ضد جهش‌زایی، اضافه شد. هدف از این مطالعه، تعیین اثرات ضد جهش‌زایی

1 - Pro.
2 - Polis.
3 - Bacillus larvae.
4- Galangin.
5- Kaempferol.
6- Quercetin.
7- Pinocemberin.
8- Pinostrobin.
9 - Salmonella typhimurium.

عصاره اتانولی بره‌موم (EEP[1]) در برابر دو ماده جهش‌زای شناخته شده آزید سدیم (NaN_3) و پرمنگنات پتاسیم ($KMnO_4$) با استفاده از آزمون ایمز و عصاره میکروزومی می‌باشد.

روش کار

– مواد شیمیایی: کلیه مواد شیمیایی مورد استفاده در این آزمون از شرکت مرک[2] تهیه شد. در این مطالعه آزید سدیم و پرمنگنات پتاسیم به عنوان مواد جهش‌زا به کار گرفته شدند.

– میکروارگانیسم‌های مورد آزمون: سویه‌های باکتریایی سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 و TA97 در این بررسی مورد استفاده قرار گرفتند.

– تأیید ژنوتیپ سویه‌های آزماینده: این کار قبل از شروع هر آزمون باید انجام شود. برای این منظور از کشت‌های نوترینت برات شبانه استفاده شد. سویه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم دارای یک نقص و یا موتاسیون در ژن ترمیم در برابر تاریکی (uvrB) بوده و قادر به سنتز پروتئین دیواره سلولی نیز نیستند (rfa). همچنین سویه‌ها برای حضور فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین بررسی شدند. این یک شناساگر[3] متداول است که می‌تواند حضور پلاسمید R– فاکتور را نشان دهد (۶).

– مخلوط میکروزومی: تهیه مخلوط S_9 مطابق با روش شرح داده شده توسط مارون و ایمز(۱۰) انجام گرفت. عدم آلودگی فرآورده، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از مخلوط S_9 به محیط کشت تاپ آگار[4] و ریختن آن روی محیط MGA[5] انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت گرم خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه‌سانتیگراد، ازاستریل بودن مخلوط تهیه شده اطمینان به عمل آمد و سپس برای آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (۷).

– تهیه نمونه: بره‌موم در اواخر زمستان از شهری نزدیک استان خراسان تهیه شد. سپس عصاره الکلی به این ترتیب تهیه گشت: مقدار ۹۰ گرم بره‌موم به ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵ درجه‌سانتیگراد مخلوط گردید. سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه‌سانتیگراد در ۷۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. محلول رویی[6] در لوله جمع‌آوری و رسوبات مجدداً با ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول عصاره‌گیری شد و مراحل قبل تکرار گردید. به این ترتیب عصاره غلیظ ۲–۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تهیه و جهت حذف اثر ضد میکروبی اتانول، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه تبخیر چرخشی[7] تکان داده شد(۸). درصدهای متفاوتی از عصاره الکلی ۰/۱ تا ۵ درصد در این آزمایش استفاده شد.

– تعیین فعالیت ضدمیکروبی (MIC[8]): روش رقت در آگار مطابق با دستورالعمل کمیته ملی راهنمای استاندارد آزمایشگاهی بالینی (NCCLS[9]) انجام گرفت. مقادیر متفاوت بره‌موم به محلول‌های آگار استریل در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد برای رسیدن به غلظت نهایی ۰/۱ تا ۵ درصد اضافه شده و پس از اختلاط کامل در پلیت‌های استریل ریخته شد تا سرد شود. تلقیح با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از اینوکولوم باکتریایی $۱–۲\times۱۰^{۹}$ CGU/ml سویه وحشی سالمونلا تیفی‌موریوم و توزیع یکنواخت آن روی سطح آگار دارای بره‌موم انجام گرفت. با استفاده از میله شیشه‌ای Z شکل استریل تمامی سطح پلیت به طور کامل پوشش داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت

1 -Ethanolic Extracts of Propolis.
2 - Merk.
3- Marker.
4 - Top agar.
5- Minimal Glucose Agar.
6- Supernatant.
7 - Rotary evaporator.
8 - Minimum Inhibitory Concentration.
9 -National Committee for Clinical Laboratory Standard Guideline.

ممانعت کننده از رشد (MIC) پایین‌ترین غلظتی از EEP بود که از هرگونه رشد باکتریایی جلوگیری می کرد(۹).

آزمون ضد جهش‌زایی: آزمون ضد جهش‌زایی بر اساس آزمون سالمونلا/میکروزوم شرح داده شده توسط مارون(۱۰) و نیز آزمون تغییر داده شده توسط مورتلمانز و زایگر انجام گرفت (۱۱). روش کار با استفاده از طی کردن ۱۰ دقیقه دوره پیش انکوباسیون در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از سویه‌های باکتریایی رشد داده شده (کشت شبانه ۱۶ ساعته) با غلظت $۱-۲\times۱۰^{۹}$ CFU/ml، ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف EEP استریل و ۱۰۰ میکرولیتر عوامل جهش‌زا در لوله‌های تاپ آگار انجام گرفت. در همه آزمایش‌ها برای کنترل‌های منفی، ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر و برای کنترل‌های مثبت ۱۰۰ میکرولیتر از آزید سدیم و پرمنگنات سدیم اضافه گردید. به منظور انجام چند چرخه تقسیم سلولی و ایجاد یک زمینه رشد باکتریایی که با چشم مسلح قابل رؤیت و قابل شمارش باشد، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۵ میلی مولار هیستیدین/ بیوتین به هر لوله اضافه شد. بعد از ریختن محتویات لوله‌های تاپ آگار روی پلیت‌های مینیمال گلوکز آگار و گرم خانه گذاری به مدت ۴۸ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت شمارش شد. جهت اطمینان از درستی نتایج برای هر ماده، پلیت‌های دوگانه در نظر گرفته شد. آزمون ضد تومورزایی، مطابق با روش ضد جهش‌زایی در حضور مخلوط S_9 انجام شد (۱۲).

نتایج

مقادیر MIC به دست آمده از آزمون ضد باکتریایی انجام گرفته، به روشنی نشان داد که بره‌موم (EEP) ۵ درصد دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه سالمونلا تیفی‌موریوم می‌باشند اما در مورد غلظت‌های ۴-۰/۱ درصد عصاره الکلی بره‌موم خاصیت ضد باکتریایی مشاهده نشد.

اثر ضد جهش‌زایی NaN_3 و $KMnO_4$ در غیاب نمونه‌های مورد آزمایش به صورت ممانعت ۱۰۰ درصد یا ۰ درصد تعیین شد. محاسبه درصد بازدارندگی مطابق فرمول زیر انجام گرفت:

درصد بازدارندگی = [(A-B)/A]* ۱۰۰٪

در این فرمول B ، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در حضور ماده موتاژن و نمونه مورد آزمایش و A تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت در حضور کنترل مثبت می‌باشد. تعداد فرکانس جهش خودبه‌خودی از تفریق صورت و مخرج کسر به دست می‌آید. اثرات ضد جهش‌زایی، زمانی که اثر بازدارندگی بین ۲۵ درصد تا ۴۰ درصد باشد، متوسط و زمانی که بیشتر از ۴۰ درصد باشد، قوی قلمداد می‌شود. مقادیر کمتر از ۲۵ درصد، ضعیف بوده و جزء نتایج مثبت منظور نمی‌شود. در تحقیق انجام گرفته، اثر ضد جهش‌زایی به صورت منحنی دوز- پاسخ با دو ماده پروموتاژن افزایش می‌یابد(۱۳).

جداول ۲ و۳، به ترتیب نتایج گرفته شده در مورد ماده جهش‌زای آزید سدیم و پتاسیم پرمنگنات را نشان می دهد.

جدول ۱. فعالیت ضد باکتریایی بره‌موم در غلظت‌های مختلف

درصد غلظت پروپولیس	۱	۰/۲۵	۰/۵	۰/۷۵	۱	۱/۲۵	۱/۵	۱/۷۵	۲	۲/۲۵	۲/۵
غلظت باکتری $۱۰^{۹}$ x CFU	۱/۴۲	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۴۲	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۴۳	۱/۴۱	۱/۴۲	۱/۳۷	۱/۳۶

ادامه جدول ۱.

درصد غلظت پروپولیس	۲/۷۵	۳	۳/۲۵	۳/۵	۳/۷۵	۴	۴/۲۵	۴/۵	۴/۷۵	۵
غلظت باکتری $۱۰^{۹}$ x CFU	۱/۳۳	۱/۳۱	۱/۳۲	۱/۳۲	۱/۳۱	۱/۳	۱/۵۷	۰/۳	۰/۲۲	۰/۰۹

جدول ۲. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی بره‌موم در شرایط آزمایشگاه در برابر آزید سدیم با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S_9

		سالمونلا تیفی موریوم TA100				سالمونلا تیفی موریوم TA97			
		در غیاب S_9		در حضور S_9		در غیاب S_9		در حضور S_9	
		تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی
کنترل منفی		۵۱	-	۷۴	-	۳۵	-	۴۶	-
کنترل مثبت		۴۶۴	-	۱۱۰۸	-	۶۲۵	-	۹۲۸	-
درصد غلظت پروپولیس	۰/۱	۶۳۱	۲	۱۰۶۰	۴	۶۱۸	۱	۹۰۵	۲
	۰/۵	۵۷۳	۱۱	۹۳۴	۱۶	۵۵۷	۱۱	۸۱۵	۱۲
	۱	۵۵۲	۱۵	۸۵۵	۲۳	۴۸۶	۲۲	۷۳۳	۲۱
	۱/۵	۴۶۷	۲۸	۷۷۸	۳۰	۴۰۹	۳۵	۶۴۳	۳۱
	۲	۴۴۵	۳۱	۷۳۵	۳۴	۳۹۵	۳۷	۵۹۹	۳۵
	۲/۵	۴۲۸	۳۴	۷۰۴	۳۶	۳۷۶	۴۰	۵۶۰	۴۰
	۳	۳۸۷	۴۰	۶۶۳	۴۰	۳۵۹	۴۳	۵۲۴	۴۴
	۳/۵	۳۴۰	۴۷	۵۶۸	۴۹	۳۴۳	۴۵	۴۷۸	۴۸
	۴	۲۹۰	۵۵	۴۹۷	۵۵	۳۰۰	۵۲	۴۱۸	۵۵

جدول ۳. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی بره‌موم در شرایط آزمایشگاه در برابر پتاسیم پرمنگنات با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S_9

		سالمونلا تیفی موریوم TA100				سالمونلا تیفی موریوم TA97			
		در غیاب S_9		در حضور S_9		در غیاب S_9		در حضور S_9	
		تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی های برگشتی	درصد بازدارندگی
کنترل منفی		۴۲	-	۴۸	-	۳۳	-	۳۸	-
کنترل مثبت		۴۶۳	-	۶۶۹	-	۳۹۸	-	۵۸۹	-
درصد غلظت پروپولیس	۰/۱	۴۵۹	۱	۶۶۰	۱	۳۹۲	۲	۵۸۶	۱
	۰/۵	۴۴۲	۵	۶۰۹	۹	۳۵۹	۱۰	۵۶۵	۴
	۱	۴۲۵	۸	۵۶۱	۱۶	۳۲۳	۱۹	۵۴۳	۸
	۱/۵	۴۱۲	۱۱	۵۰۹	۲۴	۲۸۵	۲۸	۵۲۳	۱۱
	۲	۳۷۷	۱۹	۴۸۷	۲۷	۲۵۱	۳۷	۵۰۴	۱۴
	۲/۵	۳۴۰	۲۷	۴۵۵	۳۲	۲۰۵	۴۸	۴۲۹	۱۹
	۳	۳۰۴	۳۴	۴۱۷	۳۸	۱۶۴	۵۹	۴۶۱	۲۲
	۳/۵	۲۶۱	۴۴	۳۸۵	۴۲	۱۲۵	۶۹	۴۳۹	۲۵
	۴	۲۲۸	۵۱	۳۴۹	۴۸	۸۸	۷۸	۴۱۷	۲۹

نتایج حاصل از تعداد کلنی‌های برگشتی در هر سویه آزمایشی با در نظر گرفتن شاهد منفی (آب مقطر استریل + باکتری) و شاهد مثبت (آزید سدیم و یا پتاسیم پرمنگنات + باکتری) وارد برنامه نرم‌افزاری SPSS گردید. نتایج با توجه به آزمون HSD[1] مورد بررسی وتجزیه و تحلیل قرار گرفتند(۱۴). با توجه به تعیین حدود اطمینان و

1- Tuckey test, Honest Significant Difference (HSD).

معنی‌داری در ارتباط با سویه‌های گفته شده و غلظت‌های مختلف ماده مورد آزمون، با $p \leq ۰/۰۵$ می‌توان از درستی نتایج آزمون‌ها درحضورهر دو نوع ماده جهش‌زای به کار برده شده، اطمینان حاصل کرد.

بحث

بره‌موم ماده چسبنده صمغ‌مانندی است که توسط زنبورها از جوانه برگ‌ها و پوست درختان به خصوص درختان تبریزی، توس و کاج جمع‌آوری می‌شود. بره‌موم حاوی مقادیر بالایی از ویتامین‌ها به خصوص ویتامین ب کمپلکس، ویتامین C، ویتامین E، و پروویتامین A است. این ماده دارای مواد معدنی و عناصر کمیابی مانند کلسیم، منیزیم، آهن، روی، سیلیکا، پتاسیم، فسفر، منگنز، کبالت و مس می‌باشد. علاوه بر این، بره‌موم حاوی مقادیر بسیار بالایی از بی‌فلاونوییدها می‌باشد. فلاونوییدها ترکیبات گیاهی شناخته شده‌ای هستند که دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد ویروسی و نیز خواص ضد التهابی می‌باشند.

نتایج به دست آمده از آزمون ضد باکتریایی نشان داد که بره‌موم در مقادیر ۴ درصد به بالا برای سالمونلا تیفی‌موریوم سویه وحشی، سمی می‌باشد ولی در غلظت‌های بین ۰/۱درصد تا ۴ درصد هیچ گونه اثر سمی مشاهده نمی‌شود. لذا مقادیر بالاتر از ۴ درصد، برای بررسی خواص ضد جهش‌زایی مورد نظر قرار نگرفتند.

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

رائو و همکاران در سال ۱۹۹۲ اثرات ضد جهش‌زایی سه استر اسید کافئیک موجود دربره‌موم را نشان داده و آن را به طور مصنوعی ساختند. آن‌ها توانایی ضد جهش‌زایی این مواد را در مقابل سویه‌های TA100 & TA8 و ماده جهش‌زای ۳، ۲- دی میتل -۴- آمینوبیفنیل [1] نشان دادند(۱۵). چزماریک و همکاران در سال ۱۹۹۸ اثر ضد جهش‌زایی نیتروین[2] و نیتروگوانتیدین[3] را در مقابل TA100 & TA97 بررسی نمودند(۱۶). جنگ و همکاران در سال ۲۰۰۰، مدارکی دال بر ماهیت ضد جهش‌زایی دو دسته از جهش‌زاهای مستقیم و غیرمستقیم را ارائه نمودند. در بررسی آن‌ها برای ماده جهش‌زای مستقیم از 1-NP و 1-NOو ماده جهش‌زای غیرمستقیم از IQ و بنزو { آفا} پیرین[4] در حضور مخلوط میکروزومی S_9 استفاده شده بود(۱۷). فو و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثرات ضد جهش‌زایی بره‌موم را در شرایط in vitro و in vivo بررسی نمودند. در مطالعه آن‌ها از سالمونلا تیفی‌موریوم TA100 & TA97 به عنوان مدل آزمایشی در شرایط آزمایشگاهی در برابر ماده جهش‌زای مستقیم DMC و ماده جهش‌زای غیرمستقیم 2AF با یا بدون استفاده از مخلوط میکروزومی S_9 استفاده شده بود. آن‌ها نشان دادند که بره‌موم می‌تواند از جهش‌زایی هر دو ماده جهش‌زای DMC و 2AF در یک وضعیت دوز- پاسخ جلوگیری کند(۱۸). اوهل و همکاران در سال ۲۰۰۳، اثرات ضد جهش‌زایی کریسین[5] (CR) را روی سویه‌های باکتریایی TA100 & TA98 در مقابل مواد جهش‌زای مستقیم۲-آمینو۱-متیل-۶-فنیلیمیدازو {۴/۵-ب} پیریدین (PhIP)وبنزو {آلفا} پیرن[6] نشان دادند. آن‌ها محدوده مناسب برای بروز اثرات ضد جهش‌زایی را ۱۰۰-۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تعیین کردند(۱۹).

در مطالعات ما با سالمونلا تیفی موریوم TA100 & TA97، در همه دوزهای عصاره الکلی بره‌موم مورد آزمایش (علی رغم حضور S_9 یا در غیاب آن) توانایی ممانعت از جهش‌زایی در مورد دو موتاژن $KMnO_4$ و

1 - Dimethyl-4-aminobiphenyl.
2 - Nitrovin.
3 - Nitroguanidine.
4 - Benzo[α]pyrene.
5 - Chrysin.
6 - 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4.5-b]pyridine (PhIP) & benzo[α]pyrene.

AZS در یک رابطه دوز- پاسخ مشاهده شد. از سوی دیگر نتایج به دست آمده از فعالیت‌های ضد میکروبی بره‌موم نشان داد که بره‌موم در غلظت ۴ درصد به بالا برای سویه‌های آزماینده TA100 & TA97 سمی بوده و متعاقباً در این غلظت‌ها اثرات ضد میکروبی به اثرات ضد جهش‌زایی ارجحیت دارد. آزمون ضد تومورزایی بر پایه نتایج آزمون میکروزوم با مخلوط S_9، نتایج آزمون ضد جهش‌زایی را تأیید می‌کند.

نتیجه گیری

در پایان، این نتیجه حاصل شد که بهترین محدوده مناسب غلظت برای ظهور اثرات ضد جهش، ۰/۱ درصد تا ۴ درصد می‌باشد. مکانیزم عمل ضد باکتریایی بره موم پیچیده بوده و هیچ شباهتی با سایر آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک ندارد. اما باید به این نکته اشاره کرد که از تقسیم سلول باکتریایی به وسیله بره موم ممانعت می‌شود (مانند نالیدیکسیک اسید که معلوم شده است از همانندسازی DNA و در نتیجه تقسیم سلولی ممانعت می‌کند). بعضی از محققین معتقدند که بره موم می‌تواند مانع از فعالیت RNA پلیمراز وابسته به DNA شود(۲۰).

صدمه ژنتیکی از راه‌ها و مکانیزم‌های مختلفی ایجاد می‌شود و هیچ یک از این آزمون‌ها به تنهایی نمی‌تواند همه مکانیزم‌های احتمالی را بررسی کند، لذا باید از مجموعه‌ای از این ابزارها بهره جست. جزئیات مکانیزم ضد جهش‌زایی بره‌موم و ترکیبات آن هنوز ناشناخته است. به منظور شناسایی این نکته که کدام یک از ترکیبات بره‌موم باعث ایجاد اثرات ضد جهش می‌شوند و نیز مکانیزم احتمالی آن ترکیبات، باید مطالعات دیگری انجام گیرد.

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 ea. Pakistan Journal of Biological Sciences 2007; 10(6): 989-991.

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.

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; 77(8): 477-84.

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

.

Survey of antimutagenic effects of ethanolic extract of propolis by Salmonella typhymurium/microsome

Hatefi M[1*], Mehrabian S[2], Nouhi A[3], Rafiee Tabatabaee R[4]

Abstract

Introduction: In this study, antimutagenesis effect of ethanolic extract of propolis by Ames test against two mutagenic substances named azide sodium and potassium permanganate in the presence and the absence of microsomal homogenate of mouse liver (S_9) has been investigated.

Materials and Methods: In this experimental study at first, different concentrations of ethanolic extract of propolis (0.1-5%) for determining minimum inhibitory concentration (MIC) against tester strains were used. Then by Ames test, antimutagenesis effect was assessed in nontoxic extent. In this test, various strains of Salmonella typhymurium (TA100 and TA97) that contained selective mutation in their operon histidine, were used. Mutant strains (His^-) were grown on culture media containing minimum salt and glucose in the presence of mutagen substances above. So only those bacteria that were reversed by mutation (His^+) could grow and form colonies on culture media. If antimutagen (EEP) and mutagen substances were gathered, reversed mutation would be reduced and the rate of mutation inhibition could be calculated by means of formula. The differences between the averages of revertants per plate of the sample in relation to the mutagens were analyzed using SPSS software and one-way ANOVA.

Results: The resulted MIC values clearly showed that ethanolic extract of propolis at 5% concentration has antibacterial activity against Salmonella typhymurium, but in 0.1-4% concentrations, such effects were not seen. Findings also showed that propolis in such concentrations could neutralize mutagenic effects of those substances in a dose dependent manner.

Conclusion: Finally we found that ethanolic extract of propolis that contains different kinds of major and important substances like flavonoids, has good antimutagenic effects and the best concentration for obtaining such effect is in 4% which also was confirmed with microsomal results. The mechanism of antibacterial effect of propolis is complex and it has no analogy to any classic antibiotics, but it should be emphasized that bacterial cell division is inhibited by propolis. Some researchers also argue that propolis could inhibit DNA-dependent RNA polymerase.

Key words: Propolis, antimutagenic, microsome, Salmonella typhimurium

*Corresponding author;
E-mail: mit_hatefi@yahoo.com
Address: Department of microbiology, Science & Researches Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.

1 - Student of PhD of microbiology, Science & Researches Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2 - Proffessor, department of microbiology, Tarbiat Moalem University, Tehran, Iran
3 - Professor, department of microbiology, Science faculty of Tehran University, Tehran, Iran
4 - Assisstant Professor, department of microbiology, Tehran North Branch of Islamic Azad University, Tehran, Iran