

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 مهراییان: دانشگاه تربیت معلم،
اشرف السادات نوحی: دانشگاه تهران
رباب رفیعی طباطبایی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

چکیده

زنبورهای عسل کارگر^۱ پروپولیس (بره موم) را از بخش‌های در حال رشد درختان و جوانه‌ها جمع‌آوری می‌کنند. زنبورها، شیرهای 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. یک 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 (NaN₃) و پرمنگنات پتاسیم (KMnO₄) با استفاده از آزمون ایمز و میکروزوم است. در این آزمون از سویه‌های مختلف^۲ به نام‌های TA97 و TA100 استفاده شد که هر یک حامل یک جهش انتخابی در اپرون هیستیدین خود هستند. سویه‌های جهش یافته His⁻ بر روی محیط کشت حاوی حداقل مواد معدنی و گلوزک 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 ضد جهش (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 یک وضعیت دوز-پاسخ خنثی کند. نتایج به دست آمده از آزمون میکروزوم (S₀)، 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.

^۱. *apis mellifera L., apidae*

^۲. *salmonella typhimurium*

واژه‌های کلیدی: آزمون ایمز، برهموم، ضد جهش‌زایی، میکروزوم، KMnO₄، NaN₃.

پذیرش ۸۷/۹/۱۸

دریافت ۸۶/۹/۲۴

مقدمه

بروپولیس 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). بره‌موم، می‌تواند باعث استحکام ساختمانی، بهبود وضع تهویه و کاهش 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 فارماکولوژیک موجود در بره‌موم عبارتند از: فلاونز، فلاونولز، فلاوانونز (که جمعاً فلاونوئیدها نامیده می‌شوند) و سایر ترکیبات فنولیک و آروماتیک. 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 فنولیک مانند سینامیل‌الکل، سینامیک‌اسید، وانیلین، بنزیل‌الکل‌ها، اسیدبنزوئیک، اسیدکافنیک و اسیدفرولیک [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 ماده جهش‌زای شناخته شده آزید سدیم (NaN_3) و پرمنگنات پتاسیم (KMnO_4) با استفاده از آزمون ایمز و عصاره میکروزومی است.

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

سویه‌های جهش یافته (His^-) سالمونلا تی‌فیف‌موریوم بر روی پلیت حاوی محیط معدنی و حداقل گلوکز با وجود ماده 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 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.

۱. *Bacillus larvae*

۲. galangin

۳. kaempferol

۴. quercetin

۵. pinocembrin

۶. Pinostrobin

۷. *Salmonella typhimurium*

آزید سدیم، ماده 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 ماده اکسید کننده قوی جهش‌های زیادی در سالمونلا تیفی‌موریوم ایجاد می‌کند [۵]. خاصیت دیگر این آزمون استفاده از میکروزوم کبدی (S₀) برای فعال کردن برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زا است. بسیاری از این ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش‌زایی یا سرطان‌زایی باید از نظر متابولیک (اکسیداتیو یا احیایی) فعال گردند و از آن جا که باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم قادر به انجام این فعالیت نیست، لذا عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران (مانند rat) به آزمون بررسی اثر ضد جهش‌زایی اضافه شد.

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی: همه 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.
- میکروارگانیزم‌های آزمون: سویه‌های باکتریایی سالمونلا تیفی‌موریوم TA۱۰۰ و TA۹۷ در این بررسی استفاده شد.
- تأیید ژنوتیپ سویه‌های آزمایشی: این کار قبل از شروع هر آزمون باید انجام شود. برای این منظور از کشت‌های نوترینت‌برات شبانه استفاده شد. سویه‌های سالمونلا تیفی‌موریوم دارای يك 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 يك شناساگر^۲ متداول است که می‌تواند حضور پلاسمید R- فاکتور را نشان دهد [۶].
- مخلوط میکروزومی: تهیه مخلوط S₀ مطابق با روش شرح داده شده به وسیله مارن و ایمز^۳ (۱۹۸۲) انجام گرفت. عدم آلودگی فرآورده، با اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از مخلوط S₀ به محیط کشت top agar و ریختن آن روی محیط MGA^۴ انجام شد. بعد از ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، از استریل بودن مخلوط تهیه شده اطمینان به عمل آمد و سپس برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد [۷].
- تهیه نمونه: بر موم در اواخر زمستان از شهری نزدیک استان خراسان تهیه شد. سپس عصاره الکلی به این ترتیب تهیه گشت: مقدار ۹۰ گرم بر موم به ۴۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد اضافه و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد 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 عصاره غلیظ (۱-۲) mg/ml تهیه و برای حذف اثر ضد میکروبی اتانول، سوسپانسیون به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه روتاری ایواپراتور^۶ تکان داده شد [۸].

درصدهای متفاوتی از عصاره الکلی (۵-۱۰٪) در این آزمایش استفاده شد.

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

- تعیین فعالیت ضد میکروبی (MIC): روش رقت در آگار مطابق با دستورالعمل^۱ NCCLS^۱ انجام گرفت. مقادیر متفاوت بر موم به محلول‌های آگار استریل در دمای ۴۸ درجه‌سانتی‌گراد برای رسیدن به غلظت نهایی (۵-۰/۱)٪ اضافه شد و پس از اختلاط کامل در پلیت‌های استریل ریخته شد تا سرد شود. تلقیح با اضافه کردن ۰/۱ میلی‌لیتر از اینوکولوم باکتریایی ($10^9 \times 1-2$ cfu/ml) سویه وحشی سالمونلا تیفی‌موریوم و توزیع یکنواخت آن روی سطح آگار دارای بر موم انجام گرفت. با استفاده از میله شیشه‌ای Z شکل استریل تمامی سطح پلیت به طور کامل پوشش داده شد. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) پایین‌ترین غلظتی از EEP^۲ بود که از هرگونه رشد باکتریایی جلوگیری می‌کرد [۹].

آزمون ضد جهش‌زایی: آزمون ضد جهش‌زایی بر اساس آزمون سالمونلا/میکروزوم شرح داده شده [۱۰] به وسیله مارن و ایمز (۱۹۸۲) و نیز آزمون تغییر داده شده به وسیله مورتلمن و زیگر^۳ (۲۰۰۰) انجام گرفت [۱۱]. روش کار با استفاده از طی کردن ۱۰ دقیقه دوره پیش انکوباسیون در دمای ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از سویه‌های باکتریایی رشد داده شده (کشت شبانه ۱۶ ساعته) با غلظت ($10^9 \times 1-2$ 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 NaN_3 و KMnO_4 اضافه شد. به منظور انجام چند چرخه تقسیم سلولی و ایجاد زمینه رشد باکتریایی که با چشم مسلح قابل رؤیت و 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 گرم‌خانه‌گذاری به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، تعداد کلنی‌های برگشتی در هر پلیت شمارش شد. برای اطمینان از درستی نتایج برای هر ماده، پلیت‌های دوگانه^۴ در نظر گرفته شد. آزمون ضد تومورزایی، مطابق با روش ضد جهش‌زایی در حضور مخلوط S₀ انجام شد [۱۲].

نتایج

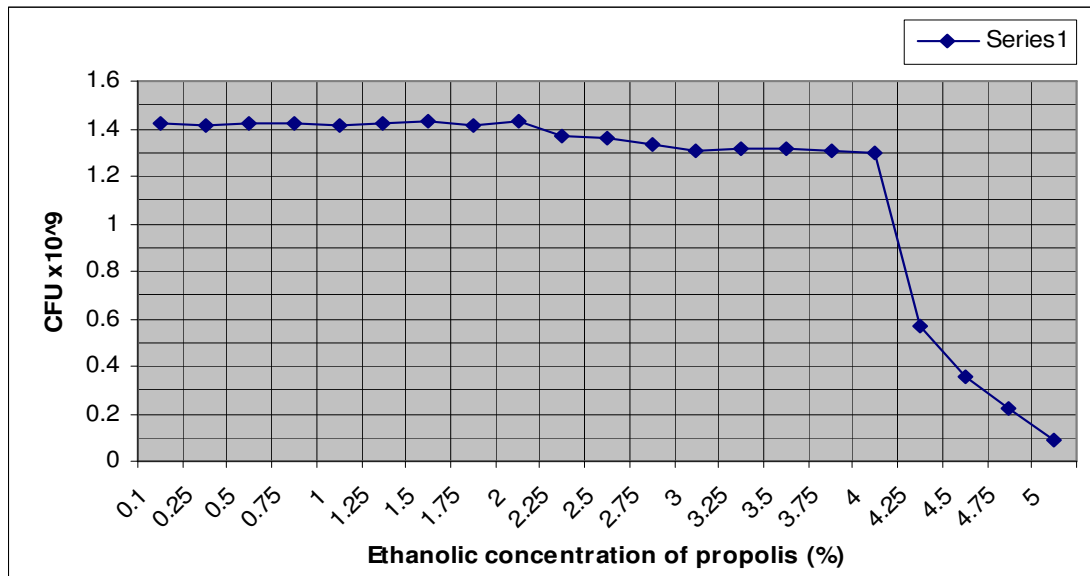
مقادیر MIC به دست آمده از آزمون ضد باکتریایی انجام گرفته به روشنی نشان داد که بر موم (EEP) ۵٪ دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه سالمونلا تیفی‌موریوم هستند؛ اما در مورد غلظت‌های (۴-۰/۱)٪ عصاره الکلی بر موم خاصیت ضد باکتریایی مشاهده نشد.

۱. national committee for clinical laboratory standard guideline

۲. ethanolic extract of propolis

۳. Mortelmans & Zeiger

۴. duplicate



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. فعالیت ضد باکتریایی بره‌موم در غلظت‌های مختلف

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

$$\text{درصد بازدارندگی} (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

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

جدول‌های ۲ و ۳، به ترتیب نتایج گرفته شده در مورد ماده جهش‌زای آزید سدیم و پتاسیم پرمنگنات را نشان می‌دهد.

جدول ۲. ارزیابی اثر ضد جهش‌زایی بره‌موم در *in vitro* در برابر آزید سدیم با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S_0

		سالمونلا تیفی موریوم TA100				سالمونلا تیفی موریوم TA97			
		در غیاب S_0		در حضور S_0		در غیاب S_0		در حضور S_0	
		تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های 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 *in vitro* در برابر پتاسیم پرمنگنات با استفاده از سویه‌های باکتریایی در غیاب یا حضور S_0

		سالمونلا تیفی موریوم TA100				سالمونلا تیفی موریوم TA97			
		در غیاب S_0		در حضور S_0		در غیاب S_0		در حضور S_0	
		تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های برگشتی	درصد بازدارندگی	تعداد کلنی‌های 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 سوپه 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 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 سوپه‌های گفته شده و غلظت‌های مختلف ماده آزوده $P \leq 0/05$ می‌توان از درستی نتایج آزمون‌ها در حضور هر دو نوع ماده جهش‌زای به کار برده شده، اطمینان حاصل کرد.

بحث

بره‌موم ماده 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 B 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 است. علاوه بر این، بره‌موم حاوی مقادیر بسیار زیادی از بی‌فلانوئیدهاست. فلانوئیدها 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 تی‌فیف‌موریوم سوپه 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 ($P \leq 0/05$) 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 کافئیک موجود در بره‌موم را نشان دادند و آن را به طور مصنوعی ساختند. آن‌ها توانایی ضد جهش‌زایی این مواد را در مقابل سوپه‌های TA100 & TA8 و ماده جهش‌زای ۳ و ۲-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 ماده جهش‌زای مستقیم از 1-NP و 1-NO و ماده جهش‌زای غیرمستقیم از IQ و بنزو α پیرین^۸ در حضور مخلوط میکرورومی و S₀ 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

فوا^۱ و همکاران در سال ۲۰۰۴، اثرات ضد جهش‌زایی برهموم 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 ماده جهش‌زای مستقیم DMC و ماده جهش‌زای غیرمستقیم 2AF با یا بدون استفاده از مخلوط میکروزومی S₀ استفاده شده بود. آن‌ها نشان دادند که برهموم می‌تواند از جهش‌زایی هر دو ماده جهش‌زای DMC و 2AF در يك^۱ وضعیت دوز- پاسخ جلوگیری کند [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 بنزو α پیرن نشان دادند. آن‌ها محدوده مناسب برای بروز اثرات ضد جهش‌زایی را 10-100 $\mu\text{g/ml}$ تعیین کردند [۱۹].

در بررسی‌های ما با سالمونلا تیفی موریوم TA100 & TA97، در همه دوزهای عصاره الکلی برهموم مورد آزمایش (علی‌رغم حضور S₀ یا در غیاب آن) توانایی ممانعت از جهش‌زایی در مورد دو موتاژن KMnO₄ و AZS در يك^۱ رابطه دوز- پاسخ وجود دارد. از سوی دیگر، نتایج به دست آمده از فعالیت‌های ضد میکروبی برهموم نشان داد که برهموم در غلظت بیش از ۴٪ برای سویه‌های آزمایشی TA100 & TA97 سمی است و متعاقباً در این غلظت‌ها اثرات ضد میکروبی به اثرات ضد جهش‌زایی ارجحیت دارد. آزمون ضد تومورزایی بر پایه نتایج آزمون میکروزوم با مخلوط S₀، 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 برهموم پیچیده است و هیچ شباهتی با سایر آنتی‌بیوتیک‌های کلاسیک ندارد؛ اما باید به این نکته اشاره کرد که از تقسیم سلول باکتریایی به وسیله برهموم ممانعت می‌شود (مانند نالیدیکسیک اسید که معلوم شده است از همانندسازی DNA و در نتیجه تقسیم سلولی ممانعت می‌کند). بعضی از پژوهندگان معتقدند که برهموم می‌تواند مانع از فعالیت RNA پلیمراز وابسته به DNA شود [۲۰].

صدمه ژنتیکی از راه‌ها و مکانیسم‌های مختلفی ایجاد می‌شود و هیچ يك^۱ 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 برهموم و ترکیبات آن هنوز ناشناخته است. به منظور شناسایی این نکته که کدام يك^۱ از ترکیبات برهموم باعث ایجاد اثرات ضد جهش می‌شوند و نیز مکانیسم 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

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, Seyyedini 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 empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella tests. *Mutation Research* (1992) 97:267-81.

14. Spjotvoll 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 (PhIP) 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.