بررسي اثرات ضد جهش زايي عضله ، غضروف، کبد يک گونه کوسه خليج فارس *Sphyrna lewini* توسط باکتری *Salmonella typhimpium*

مژگان امتیازجو، لیدا سلیمی، ستاره صمدی* و فریده حیاتی
دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

غضروف ، کیسه صفرا و عضله ی کوسه ماهیان دارای ترکیبات زیستی فعالی می باشند هر یک از ترکیبات به نوبه خود دارای اثرات ویژه ای نیز هستند. یکی از اثرات مطرح شده اثرات ضد جهش زایی و ضد سرطانی است که ارتباط و همبستگی نزدیک بین این نوع اثرات وجود دارد. کاهش ضد جهش زاها و مواد ضد سرطانی در زندگی امروزی موثر ترین راه برای جلوگیری از سرطان در انسان و بروز بیماری های ژنتیکی است . در این کار تحقیقاتی اثرات ضد جهش زایی سه بافت عضله ، غضروف و کبد کوسه ماهي گونه *Sphyrna lewini* از خلیج فارس ، از طریق تست Ames با استفاده از سوش باکتری سالمونلا تیفی موریوم جهش یافته مورد بررسی قرار گرفته است . در این پژوهش سوش TA_{1535} سالمونلاتیفی موریوم به روش Plate incorporation در آزمون Ames، جهت بررسی اثرات ضد جهش زایی مواد مورد آزمایش، به کار گرفته شد. هر آزمون شامل کنترل مثبت (آزایدسدیم یا پرمنگنات پتاسیم) و کنترل منفی (آب مقطر) به منظور مقایسه نتایج بدست آمده بود . در فاز دوم میکروزم های کبد موش(S۹)که در شرایط کاملا" استریل از قبل تهیه شده بود ، جهت بررسی و تایید اثرات ضد جهش زایی غضروف افزوده گردید. نتایج به دست آمده از شمارش تعداد کلنی های برگشتی و مقایسه آن ها با کنترل های مثبت و منفی نشان داد که اثر ضد جهش زایی بافت غضروف بطور متوسط حدود ۹۸ درصد، بافت کبد حدود ۷۰درصد و عضله بطور متوسط٦٤ درصد بود ، بافت غضروف اثرات ضد جهش زایی قوی تری نسبت به دیگر بافت ها نشان داد. با توجه به آزمون انجام گرفته بین دو مرحله(مرحله اول بدون حضورS۹ ،مرحله دوم حضورS۹) از نظر درصد بازدارندگی از موتاسیون عصاره غضروف با حضور ماده جهش زا ی پرمنگنات پتاسیم و سویهTA_{1535} نتیجه گرفته شد که بین این دو مرحله اختلاف معنی دار آماری وجود داشته است ($P < ۰/۰۵$).

واژگان کلیدی: ضد جهش زایی، عضله، غضروف، سالمونلا تیفی موریوم، تست Ames، کوسه ماهی

*مسئول مکاتبه:setareh_samadi86@yahoo.com

مقدمه

سرطان یک معضل سلامتی در سراسر جهان و یکی از مهمترین عوامل مرگ و میر در میان کودکان و بزرگسالان است. سرطان بعد از بیماری های قلبی و عروقی دومین عامل مرگ و میر انسان است. این بیماری ژنتیکی است ، یک یاخته ی طبیعی ممکن است بدون هیچ دلیل واضحی به یک سلول سرطانی تبدیل شود ولی در اغلب موارد ، تبدیل در اثر مواجهه مکرر با مواد سرطان زا مانند الکل و دخانیات صورت می گیرد. هنگامی که ژنوم یک سلول تغییر می یابد، شکل ظاهری و عملکرد آن سلول با سلول های سالم مجاور خود تفاوت می یابد و دیگر کار سلول های طبیعی بدن را انجام نمی دهد . بسیاری از عوامل جهش زا از طریق تولید رادیکال های آزاد سلامتی انسان را به مخاطره می اندازد ، رادیکال های آزاد یکی از عوامل بروز سرطان هستند که نقش مهمی را به عنوان یک عامل آغازگر درونی در روند تخریبی نظیر آسیب های DNA و جهش برعهده دارند که منجر به عوارضی نظیر بیماری های قلبی ، پیری زودرس و سرطان می گردند . بنابراین عادات و رژیم غذایی در از بین بردن رادیکال های آزاد و مبارزه با مواد جهش زا و بهبود سلامتی انسان بسیار حائز اهمیت می باشد (Ames *et al.,*1993)

شناسایی موتاسیون برگشتی در سالمونلاتیفی موریوم تحت عنوان Ames test ، بهترین و متداول ترین روش جهت تعیین پتانسیل جهش زایی مواد شیمیایی و داروهای جدید محسوب می شود . در تست "Ames" جهشی که در سالمونلا ایجاد می شود مربوط به آسیب در DNA می باشد و ارتباط منطقي به سایر پروسه های سلولی و ارتباط بین سلول ها ندارد . این تست در سال ۱۹۸۲ به عنوان آزمونی استاندارد و دقیق معرفی گردید و یک روش باکتریایی کم هزینه ، کوتاه مدت و آسان است که توسط Bruce Ames و همکارانش در دهه ۱۹۷۰ پایه گذاری گردیده است(Ames, 1998). این سوش ها دارای موتاسیون مشخصی در اپرن هیستیدین خود بوده و وابسته به یک منبع هیستیدین خارجی هستند. این جهش ها در تماس با موتاژن ها، می توانند موتاسیون برگشتی پیدا کنند اما عصاره های مورد آزمایش از اثرات این موتاژن ها جلوگیری می کند. خاصیت منحصر به فرد این آزمون استفاده از میکروزوم کبد(S_9) برای فعال کردن برخی مواد جهش زا و سرطان زا می باشد زیرا بسیاری از این ترکیبات برای بروز خصوصیات جهش زایی یا سرطان زایی باید از نظر متابولیکی (اکسیداتیو یا احیایی) فعال گردند و از آنجاییکه باکتری سالمونلا قادر به انجام این فعالیت نیست ، لذا یک عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران (مانند موش) را می توان به تست جهش زایی اضافه نمود (Green & Muriel, 1974). در این تحقیق از کوسه ماهي خانواده Sphyrnidae ، گونه ي *Sphyma lewini* استفاده شده است. تحقیق حاضر با هدف بررسی خواص ضد جهش زایی سه بافت عضله و غضروف و کبد این گونه با استفاده از سالمونلاتیفی موریوم انجام گردید.

مواد و روش ها

در این آزمون پرمنگنات پتاسیم و سدیم آزاید به عنوان شاهد مثبت، آب مقطر به عنوان شاهد منفي و عصاره هاي غضروف، کبد و عضله کوسه ماهی سر چکشی گونه *Sphyrna lewini* به عنوان مواد مورد آزمایش براي سنجش ضد جهش زايي مورد بررسي قرار گرفت.

باکتری مورد استفاده در این تحقیق سالمونلا تیفی موریوم TA۱۵۳۵ بود. سویه مذکور مستقیما توسط پروفسور ایمز به صورت دیسک کاغذی ارسال شد که در آزمایشگاه دانشگاه تربیت معلم نگهداری می گردد. دیسک ها وارد محیط کشت نوترینت براث شده و جهت احیا سازي، به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور ٣٧ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به مدت ٢٤ ساعت بر روي محیط کشت نوترینت آگار در دمای ٣٧ درجه گرما گذاري شد(Dorothy & Ames, 1983). گونه *Sphyrna lewini* پس از صید توسط قلاب دستی مخصوص در خرداد ماه ١٣٨٦از خلیج فارس، سواحل بندرعباس، به تهران منتقل شد و پس از آن تکه تکه شد و کبد و غضروف و عضله ي آن جدا شده و در ظروف استریل براي عصاره گیري قرار داده شدند.

آزمون هاي تأئید ژنوتیپ سوش TA ۱۵۳۵

در سوشTA۱۵۳۵ ، حساسیت به کریستال ویوله جهت سنجش تایید جهش rfa ، حساسیت به پرتو UV تایید جهش uvrB ، مقاومت نسبت به آنتي بیوتیک پني سیلین تایید وجود پلاسمید (R-factor) و عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه هیستیدین تایید برای نیازمندي به هیستیدین و عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه بیوتین تاییدي بر نیازمندي سوش TA۱۵۳۵ به بیوتین بود (Dorothy & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000)

عصاره گیري ازعضله، غضروف وکبد

١٠ گرم از عضله ، غضروف و کبد کوسه ماهی به طور جداگانه وزن شده و در ارلن استریل قرار داده شد. سپس حلال هاي آلي شامل پترولیوم اتر، استن، آب به نسبت هاي ١/٥ : ٧/٥ : ١ (به میزان ١٥ :٧٥: ١٠ میلی لیتر)به آنها اضافه شد. سپس ارلن ها با فویل آلومینیومي کاملاً پوشانده شده و در زیر هود قرار گرفتند. پس از ٢٤ ساعت عصاره هاي ایجاد شده را صاف کرده و در انجام آزمایش ها بکار گرفته شدند. در آزمایشی حدود ٠/٥ میلی لیتر استون و ٠/٥ میلی لیتر پترولئوم اتر به محیط آگاردار با حداقل غلظت گلوکز ٠/١ میلی لیتر کشت تازه شبانهTA۱۵۳۵ که تایید ژنوتیپ شدند و ٠/٥ میلی لیتر محلول هیستیدین و بیوتین (histidine / biotin) و ٠/١ میلی لیتر ماده سرطان زاي بکاررفته در کنترل مثبت(سدیم آزاید، پرمنگنات پتاسیم) پس از ٤٨ ساعت در دماي حدود ^{oc} ٣٧ از آنجائیکه این دو حلال به سرعت تبخیر می شوند هیچگونه اثر سمی ناشی از این دو حلال آلی در پلیت ها مشاهده نگردید (تعداد کلونی های برگشتی تقریبا" معادل مقدار کلونی های برگشتی در کنترل مثبت بود.) (Meyers & Blight, 1981).

تعیین قدرت ضد جهش زایي با استفاده از سالمونلا تیفي موریوم سویه TA ۱۵۳۵

این آزمون شامل آمیختن ٠/٥ میلی لیتر ماده مورد آزمایش با ٠/١ میلی لیتر کشت تازه شبانهTA۱۵۳۵ که تایید ژنوتیپ شدند و ٠/٥ میلی لیتر محلول هیستیدین و بیوتین (histidine / biotin) و ٠/١ میلی لیتر ماده

سرطان زاي بكاررفته در كنترل مثبت در لوله محتوي ۳ میلی لیتر تاپ آگار (Top agar) (دماي حدود ٤٥درجه سانتی گراد) بود. محتويات اين لوله پس از ۳ ثانيه تكان دهي در شيكر به طور يكنواخت در سطح محيط آگاردار با حداقل غلظت گلوكز گسترده شدند. پس از سفت شدن آگار پليت ها، وارونه شده و به مدت ٢٤ ساعت در انكوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. براي هر ماده مورد آزمايش دو پليت در نظر گرفته شد. در اين آزمون شاهد هاي مثبت و منفي نيز در نظر گرفته شد. كنترل منفي شامل ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر استريل و ۰/۱ میلی لیتر كشت تازه شبانه سالمونلا تيفي موريوم ۱۵۳۵ TA بود و طبق روش ذكر شده با محلول هيستيدين – بيوتين و تاپ آگار ذوب و سرد شده داخل لوله آميخته شدند و پس از تكان دهي با شيكر بر روي سطح محيط آگاردار با حداقل غلظت گلوكز گسترده گرديده و به مدت ٢٤ ساعت انكوبه شدند. شاهد منفي تعداد موتاسيون هاي خود بخودي در باكتري ها را نشان مي دهد. ۰/۱ میلی لیتر از كشت تازه شبانه باكتري به طور تخميني حاوي $۱۰^{۸}\times$۵-۲ سلول در هر ميلي بود.

در شاهد مثبت از محلول مواد سرطان زاي آزيد سديم و پرمنگنات پتاسيم استفاده شد و ۰/۱ میلی لیتر از هر كدام از اين دو محلول را همراه با ۰/۱ میلی لیتر كشت تازه شبانه سالمونلا تيفي موريوم ۱۵۳۵ TA و ۰/۵ میلی لیتر محلول هيستيدين – بيوتين به ۳ میلی لیتر تاپ آگار ذوب و سرد شده اضافه كرده و پس از تكان دهي با شيكر بر روي سطح محيط آگاردار با حداقل غلظت گلوكز گسترده گرديدند. سپس به مدت ٢٤ ساعت در انكوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به همراه ساير پليت ها قرار گرفتند. در اين آزمون بعد از گذشت ٢٤ ساعت انكوباسيون، كلوني هاي برگشت يافته در پليت هاي آزمايشي و شاهدهاي مثبت و منفي شمارش گرديدند. در مرحله دوم آزمايش، علاوه بر افزودن ۰/۵ میلی لیتر عصاره غضروف، ۰/۱ میلی لیتر كشت تازه شبانه TA۱۵۳۵ و ۰/۵ میلی لیتر محلول هيستيدين و بيوتين (histidine / biotin) و ۰/۱ میلی لیتر ماده سرطان زاي بكاررفته در كنترل مثبت در لوله محتوي ۳ میلی لیتر تاپ آگار (Top agar) (دماي حدود ٤٥درجه سانتی گراد) است و ۰/۵ میلی لیتر از مخلوط ميكروزوم كيسه صفرا موش(S۹) تازه تهيه شده نيز به لوله ها اضافه گرديد و محتويات اين لوله پس از ۳ ثانيه تكان دهي در شيكر به طور يكنواخت در سطح محيط گلوكز آگار حداقل گسترده شدند(Dorothy & Ames, 1983). درصد باز دارندگی نمونه های آزمایشی طبق فرمول(۱) بدست آمد :

فرمول(۱):

درصد بازدارندگی = $[T / M]\times$

۱: درصد بازدارندگی

T: كلنی های برگشتی در هر پليت در حضور ماده ی جهش زا

M: تعداد كلنی های برگشتی در هر پليت كنترل مثبت

(Brockman *et al.*, 1986).

تعداد كلنی های برگشتی در كنترل منفی (موتاسيون خود به خودی) از صورت و مخرج كسر كم گرديد .

هنگامیکه درصد بازدارندگی بین ٤٠ – ٢٥ درصد بدست آید ، اثر ضد جهش زایی نمونه ی آزمایشی متوسط تلقی می شود و مادامی که درصد بازدارندگی از بیش از ٤٠ درصد باشد ، اثر ضد جهش زایی نمونه ی آزمایش قوی بوده و در صورتی که کمتر از ٢٥ درصد ارزیابی گردد ، اثر ضد جهش زایی منفی است و در واقع نتیجه ، مثبت تشخیص داده نمی شود (Ikken *et al.*, 1999). در این تحقیق آنالیز آماري داده ها توسط نرم افزار SPSS آنالیز واریانس یک طرفه و با توجه به آزمون ANOVA تفسیر گردید.

نتایج

در این تحقیق سوش TA١٥٣٥، از نظر وجود جهش های rfa ، uvrB ، وجود پلاسمید (R-factor)، نیازمندی به هیستیدین و نیازمندی به بیوتین، مورد تایید قرار گرفت(جدول١).

جدول ١- نتایج حاصل از تایید ژنوتیپی سوش های سالمونلاتیفی موریوم TA ١٥٣٥

جهش raf	جهش uvrB	R-factor	نیازمندی به هیستیدین
+	+	-	+

نتایج اثر بازدارندگی وتعدیل جهش زایی پرمنگنات پتاسیم و سدیم آزاید توسط عصاره غضروف،عضله،کبد کوسه ماهی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA١٥٣٥در جدول(٢و٣) ارائه شده است.

جدول ٢- تعداد کلنی های برگشتیCFUو نتایج اثر بازدارندگی پرمنگنات پتاسیم توسط عصاره غضروف،عضله،کبد کوسه چکشی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA١٥٣٥

تعداد کلنی های برگشتی			
١٦٤١	١٤٣٧	٨٨٨	کنترل مثبت
٢٤٥	١٥٣	٥٥٢	**کنترل** منفی
١٢٩٥	١١٠٤	٤٩٣	عصاره کبد
١١٦	١١٠١	٨٧٨	عصاره عضله
١٣١٤	٧٨٩	٦٨١	عصاره غضروف
انحراف معیار	درصد بازدارندگي از جهش زايي		
±٥٣/٢	٢٤/٨	٢٥/٩	١١٧/٦ عصاره کبد
±٥٥/٩	١٠٩/٩	٢٦/٢	٣/٠ عصاره عضله
±١٩/٦	٢٤/٤	٥٠/٥	٦١/٦ عصاره غضروف

جدول ۳- تعداد کلنی های برگشتی cfuو نتایج اثر بازدارندگی وتعدیل جهش زایی آزاید سدیم توسط عصاره غضروف،عضله،کبد کوسه چکشی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA۱۵۳۵

تعداد کلنی های برگشتی				
۲۱۰۱	۱۹٦۷	۱٤٥۸	کنترل مثبت	
٤۹۲	٤٤۸	۳۹۱	**کنترل** منفی	
۱۱٥۹	٤٦۷	٤۰٥	عصاره کبد	
۱٦۸۸	۲۰۰	۳۲٤	عصاره عضله	
٥۰۹	٥۰٦	٤۱٦	عصاره غضروف	
انحراف معیار	درصد بازدارندگي از جهش زايي			
±۲۳/۲	۵۸/۵	۹۸/۷	۹۸/۸	عصاره کبد
±٤۹/۷	۲٥/۷	۱۱٦/۳	۱۰٦/۳	عصاره عضله
±۱/٤	۹۸/۹	۹٦/۲	۹۷/۷	عصاره غضروف

نتایج حاصل از مقایسه میانگین و انحراف معیار درصد بازدارندگی از موتاسیون نمونه مورد آزمایش از کوسه (غضروف)با در نظر گرفتن سویه باکتریایی TA ۱٥۳٥و نوع ماده جهش زا (آزاید سدیم و پرمنگنات پتاسیم) (در حضور S۹)در جداول (٤ تا ۷)نشان داده شده است.

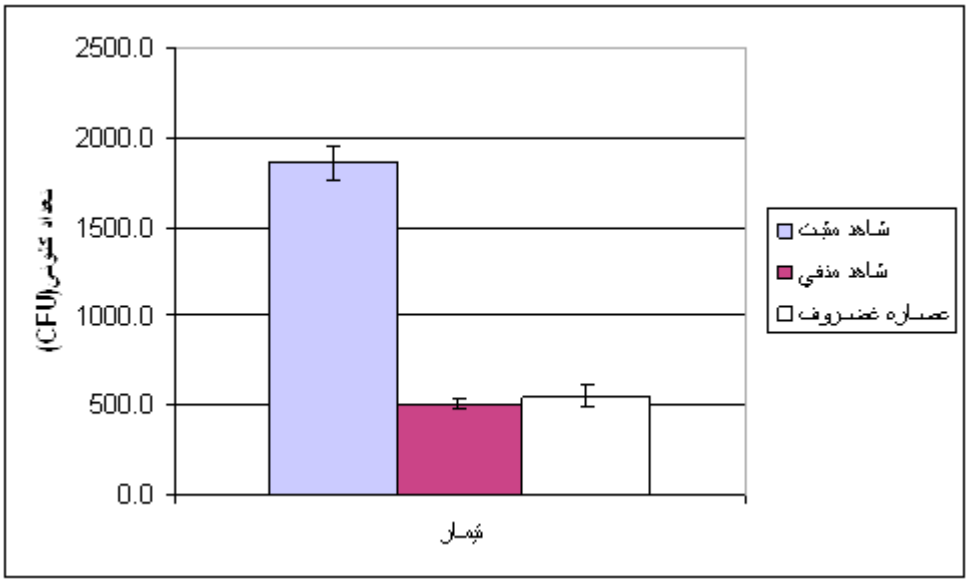
جدول۴- مقایسه میانگین تعداد کلنی ها بین شاهدهای مثبت و منفی و نمونه مورد آزمایش از کوسه چکشی(،غضروف) با در نظر گرفتن و نوع ماده جهش زا (آزاید سدیم و پرمنگنات پتاسیم) سویه باکتریایی۱۵۳۵ TA (در حضور S۹)

سدیم آزاید		پرمنگنات پتاسیم		۱۵۳۵TA
انحراف معیار	CFUمیانگین	انحراف معیار	CFUمیانگین	
۹۵	۱۸۶۲/۳	۱۳۹/۶	۱۷۵۴/۷	کنترل مثبت
۲۶/۸	۵۰۴/۷	۳۲/۶	۳۸۹/۷	کنترل منفی
۶۵/۱	۵۵۱/۳	۳۹/۷	۴۱۷	عصاره غضروف

جدول ۵- نتایج انحراف معیار اثر بازدارندگی وتعدیل جهش زایی آزاید سدیم توسط عصاره غضروف کوسه چکشی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم ۱۵۳۵ TA(در حضور۹ S)

سدیم آزاید		۱۵۳۵TA	
عصاره غضروف	شاهد منفي	شاهد مثبت	تیمار
۵۵۱	۵۰۴/۷	۱۸۶۲/۳	میانگین کلنی های برگشتی
۶۵	۲۶/۸	۰/۹۵	انحراف معیار

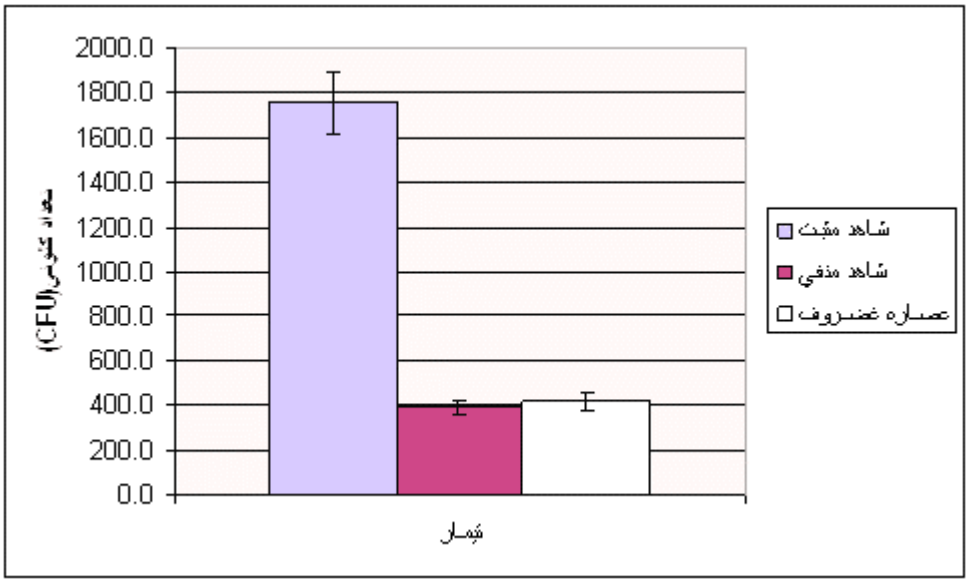
مقایسه تعداد کلنی های برگشتی در سویه TA۱۵۳۵ در حضور سدیم آزاید و پرمگنات پتاسیم در شکل های(۱ و ۲) نشان داده شده است.



شکل۱- مقایسه تعداد کلنی های برگشتی در سویه $TA_{۱۵۳۵}$ وتعدیل جهش زایی آزاید سدیم توسط عصاره غضروف کوسه چکشی

جدول۶- نتایج انحراف معیار اثر بازدارندگی وتعدیل جهش زایی پرمنگنات پتاسیم توسط عصاره غضروف کوسه چکشی با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم ۱۵۳۵ TA(در حضور۹ S)

پرمنگنات پتاسیم		۱۵۳۵TA	
عصاره غضروف	شاهد منفي	شاهد مثبت	تیمار
٤١٧	٣٨٩/٧	١٧٥٤/٧	میانگین کلنی های برگشتی
٤٠	٣٢/٦	١٣٩/٦	انحراف معیار



شکل۲- مقایسه تعداد کلنی های برگشتی در سویه ۱۵۳۵ *TA* وتعدیل جهش زایی پرمنگنات پتاسیم توسط عصاره غضروف کوسه چکشی

جدول۷- درصد بازدارندگی از موتاسیون نمونه های مورد آزمایش از کوسه چکشی عصاره(غضروف)با در نظر گرفتن سویه باکتریایی۱۵۳۵ TA و نوع ماده جهش زا (آزاید سدیم و پرمنگنات پتاسیم) (در حضورS۹)

TA ۱۵۳۵			
سدیم آزاید		پرمنگنات پتاسیم	
انحراف معیار درصد بازدارندگی	میانگین درصد بازدارندگی	انحراف معیار درصد بازدارندگی	میانگین درصد بازدارندگی
۳/۱۹	۹۶/۴۵	۰/۹۶	۹۸/۰۰۲

نتایج نشان داد که تعداد کلنی های برگشتی در شاهد منفی در تمامی آزمایش ها ی انجام شده در پایین ترین سطح و تعداد کلنی های برگشتی القاء شده با موتاژن های مثبت تشخیصی در شاهد مثبت (آزاید سدیم و پرمنگنات سدیم) در تمامی آزمایش های انجام شده در بالاترین سطح قرار داشت.

تعداد متوسط كلني هاي برگشتي در شاهد مثبت (پرمنگنات پتاسیم) ، ۱۳۹/٦± ۱۷٥٤/۷ و تعداد متوسط كلني هاي برگشتي در شاهد مثبت در تکرارهایی که کنترل مثبت آزاید سدیم بود۹٥/۰ ± ۱۸٦۲/۳ بدست آمد.

تعداد متوسط كلني هاي برگشتي در شاهد منفی (در تکرار هایی که کنترل مثبت پرمنگنات پتاسیم است) ، ۳۲/٦ ± ۳۸۹/۷و تعداد متوسط كلني هاي برگشتي در شاهد منفی (در تکرارهایی که کنترل مثبت آزاید سدیم است) ۲٦/۸± ٥۰٤/۷ بود.

همانطور که مشاهده می شود، آزاید سدیم اثر موتاژنی قویتری را در این سویه TA ۱٥۳٥ نسبت به پرمنگنات پتاسیم نشان می دهد. بطوریکه در حضور آن تعداد جهش های ایجاد شده و کلنی های برگشتی در سویه مذکور بیشتر می باشد.

در حضور پر منگنات پتاسیم بعنوان ماده جهش زا ، تعداد متوسط كلني هاي برگشتي در عصاره غضروف ، (در حضورS۹) ۳۹/۷ ± ٤۱۷/۰ بود. متوسط درصد بازدارندگي عصاره غضروف از میزان جهش زایي پر منگنات پتاسیم، ۰/۹٦ ± ۹۸/۰۰۲ درصد ارزیابی گردید. در حضور آزاید سدیم بعنوان ماده جهش زا ، تعداد متوسط كلني هاي برگشتي در عصاره غضروف ، ٦٥/۱ ± ٥٥۱/۳ بود. متوسط درصد بازدارندگي عصاره غضروف از میزان جهش زایي آزاید سدیم در سویه TA۱٥۳٥ ، ۳/۱۹ ± ۹٦/٤٥ درصد بدست آمد.

بحث و نتیجه گیری

آسيب DNA توسط موتاژن هاي محيطي سبب ناتواني هايي در ارگانيسم هاي مختلفي از جمله انسان مي شود. انباشتگي موتاسيون هاي مختلف وابستگي زيادي با پيشرفت سرطان دارد. اين نواقص و ناهماهنگي هايی که ايجاد بيماري مي نمايند، همراه با افزايش سن افزايش پيدا کرده و باعث بروز عيب و نقص در فرزندان مي شود (Migliore & Coppede, 2002; Cuzzocrea *et al*, 2001).

تحقيقات و بررسي هاي اوليه نشان داده است که غضروف کوسه داراي اثرات ضد جهش زايي، آنتي اکسيداني و ضد درد است (Fontenel *et al*., 1997).همانگونه که در اين تحقيق مشاهده شد، بافت غضروف دارای خواص ضد جهش زایی بالایی می باشد. شواهدي وجود دارد که نشان مي دهد راديکال هاي آزاد سبب آسيب اکسيداتيو چربي ها و پروتئين ها و اسيد هاي نوکلئيك مي شود. بنابراين آنتي اکسيدان هايي که راديکال هاي آزاد را خنثي مي کنند ممکن است با اهميت ترين روش در جلوگيري از اينگونه بيماري ها باشد و نقش قابل قبول غضروف کوسه در محافظت سلول ها در مقابل اکسيژن واکنش گر و نيز کاهش آسيب DNA و جهش نشان داده شده است (Felzenszwalb *et al*., 1998)

بين اثرات ضد سرطاني و اثرات ضد جهش زايي، ارتباط و همبستگي نزديك وجود دارد (Maron & Ames,1983) بکارگیری عوامل ضد جهش و مواد ضد سرطاني در زندگي امروزي مؤثرترين روند براي جلوگيري از سرطان در انسان و بيماري هاي ژنتيكي است (Kim *et al*., 2000).

مواد ضد جهش ، چه در داخل سلول و چه در خارج سلول توانايي نابود كردن موتاژن ها را دارند بهمين دليل مي توانند از سرطان جلوگيري بعمل آورند و موتاژن هايي را كه باعث آسيب DNA و نيز سبب جهش در سلول مي شوند را بلوكه نمايند (Ruan *et al*.,1989).

در قرن حاضر يكي از علل مرگ و مير در جوامع صنعتي و پيشرفته سرطان مي باشد. در دو دهه ي گذشته انواع متفاوتي از مواد جهش زا و سرطان زاي شيميايي در غذاها شناخته شده اند. امروزه دانشمندان بر اين عقيده اند كه آسيب ها و تغييرات ژنتيكي اعم از تغييرات ايجاد شده در توالي و انسجام DNA ، بروز جهش يا موتاسيون در ژن ها و ديگر تغييرات ژنتيكي در ساختار كروموزومي در سرطانزايي نقش بسزائي دارند. در بررسي خواص ۱۰/۰۰۰ ماده ي شيميايي توسط RosenKranz در سال ۲۰۰۲ مشخص گرديد كه عوامل شيميايي با پتانسيل توليد آسيب ژني (ژنوتوكسي سيته) ، سرطانزا نيز مي باشند (Rosenkranz, 2003).

طبق تئوري Ames ، ۸۳درصد از مواد جهش زا ، سرطانزا نيز هستند. بسياري از اين جهش زاها و سرطانزاها از طريق توليد راديكال هاي آزاد از جمله انواع اكسيژن راديكالی (ROS) اثر تخريبي خود را نشان مي دهند. لذا علاوه بر دفاع و ايمني بدن، مصرف روزانه آنتي اكسيدان ها، نقش حياتي و مهمي را در حفاظت در برابر راديكال هاي آزاد بر عهده دارد. حتي بسياري از آنتي اكسيدان ها به عنوان عوامل ضد سرطان شناخته شده اند. آنتي اكسيدان ها نيز به همراه انواع متعددي از تركيبات مفيد نظير آنتي ويرال ها (تركيبات ضد ويروسي) و مواد ضد كلسترولي در غذاها وجود دارند (Hernandez *et al*., 2002).

ماکرومولکول های غضروف بواسطه ارزش های درمانی ، غذایی و تشخیصی که دارند از نظر اقتصادی قابل توجه می باشند.استخراج این ماکرومولکول ها در زمینه درمان بیماری هایی مثل التهاب مفاصل و سرطان کاربرد دارد .پروتئین ۱۰۰ کیلو دالتونی غضروف کوسه ماهی نوعی فرآورده بیولوژیکی است که می تواند بدون آسیب رساندن به سلول های نرمال ،باعث مهار رشد سلول های سرطانی شود. غضروف کوسه ماهی در حفاظت از جهش زایی DNA در برابر رادیکال های آزاد نقش مهمی دارد(ریاض الحسینی،۱۳۸٦) و نتایج این تحقیق نشان داد بافت غضروف نسبت به بافت های دیگرکوسه دارای خواص ضد جهش زایی بالاتری می باشد.

در هر آزمايش كنترل مثبت شامل مواد جهش زاي تشخيصي براي تأييد خواص برگشتي و مشخصات هر سويه در نظر گرفته مي شود. دوز واحدي از يك موتاژن مناسب بعنوان كنترل مثبت براي هر سويه استفاده مي گردد. تعيين غلظت مناسبي از يك ماده ي موتاژن در انجام آزمايشات بسيار مهم است، زيرا اكثر آنها در برخي غلظت ها براي باكتري سمي مي باشند و در غلظت هاي سمي، تعداد كلوني هاي برگشتي در پليت كاهش مي يابد، زيرا مرگ باكتريايي روي مي دهد. آزيد سديم بعنوان يك ماده ي موتاژن مثبت تشخيصي در تست Ames تأييد شده است و از آنجائيكه در آب پايدار است نيازي به تهيه ي روزانه آن نيست. از آنجائيكه

پرمنگنات پتاسیم باعث تخریب و آسیب در انسجام زنجیره ي DNA مي گردد (Gerber *et al.*, 2000) ، به عنوان ماده ي موتاژن تشخيصي ثانويه در اين تحقيق استفاده شد و پس از بكارگيري، اثرات جهش زايي آن بر روي سويه TA ۱۵۳۵ مشخص گرديد، با اين تفاوت كه براي انجام هر سري از آزمايشات، بطور روزانه تهيه شد و با بكارگيري دوز مناسبي از اين مواد موتاژن، مشاهده شد كه آزيد سديم اثر موتاژني قوي تري را در سويهTA ۱۵۳۵ نسبت به پرمنگنات دارد. بطوريكه در حضور آن تعداد جهش هاي ايجاد شده و كلني هاي برگشتي در سويه مذكور بيشتر مي باشد و نيز با بكارگيری دوز مناسبی از اين دو ماده موتاژن ، تعداد كلنی های برگشتی در كنترل مثبت در بالاترين سطح قرار داشت كه با ساير پژوهش ها همسويی نشان داد. در هر آزمايش بكارگيري كنترل منفي نيز براي ارزيابي موتاسيون خودبخود در سويه هاي باكتريايي لازم است. پتانسيل جهش برگشتي در هر سويه مرتبط با ويژگي آن سويه مي باشد. تعداد كلني هاي برگشتي در اثر موتاسيون خودبخودي در مدت ۲٤ ساعت گرماگذاري بستگي به تعداد نهايي باكتري هاي اگزوتروف موجود در پليت دارد و اين تعداد نمايي از عملكرد هيستيدين اضافه شده به پليت ها است. اگر چه تعداد سلول هاي اگزوتروف محاسبه نمي شود اما از آنجائيكه غلظت هيستيدين در تيمارهاي موجود ثابت است، به نظر مي رسد كه تعداد آنها نيز ثابت باشد البته بايد توجه نمود كه چون موتاسيون خود به خودي به ندرت صورت مي پذيرد ،در تست هاي انجام شده ضروري است كه جمعيت بزرگي از باكتري ها به كار گرفته شوند . بيشترين حساسيت زمانی ايجاد مي شود كه ۲×۱۰^{۸} سلول در پليت حاصل شود (Green & Muriel, 1976).

در اين آزمايشات تعداد كلنی های برگشتی در كنترل منفی در پايين ترين سطح قرار داشت كه با ساير پژوهش ها، از جمله آزمايشات انجام شده توسط دهوكی در سال ۱۳۸٤ همسويی دارد. لازم به ذكر است كه تعدادي از برگشت هاي خود به خودي در پليت به تعداد سلول هاي باكتري در پليت كه محتوي $۱۰^{۵}$ و $۱۰^{۸}$ سلول هستند، وابسته مي باشند . هر پليت حاوي جهش خود به خودي به عنوان شاهد و كنترل، جهت سنجش جهش زايي پليت هاي ديگر مورد استفاده قرار مي گيرد (دهوكي ، ۱۳۸٤).

نتايج حاصل نشان دادند كه درصد بازدارندگی جهش زايی مواد موتاژن مثبت تشخيصی به كار رفته در عصاره غضروف ۹۸ درصد، عصاره ی كيسه صفرا حدود ۷۰ درصد و عصاره ی عضله حدود ٦٤ درصد می باشد. همانگونه كه در اين مطالعه مشاهده شد بافت غضروف نسبت به بافت های ديگری دارای خواص ضد جهش زايی بالاتری می باشد . مطالعات نشان مي دهند كه مداخله سيتوكروم P450 كبد انسان و rat در فعال كردن تعدادي از مواد شيميايي سرطانزا متفاوت است (Pelroy & Peterson, 1974). . لذا پيشنهاد می گردد اين بافت ها برای سنتز داروهای بيولوژيک برای پيشگيری از سرطان مورد استفاده قرار گيرد.

منابع

دهوكي ، ف. ۱۳۸٤ . بررسي اثر موتاژنيك و كارسينوژنيك شكوفايي پلانكتوني با استفاده از باكتري سالمونلانيفي موريوم در خليج فارس (بندر عباس) . پايان نامه كارشناسي ارشد دانشگاه آزاد اسلامي ، واحد تهران شمال، دانشكده علوم و فنون دريايي.

ریاض الحسینی،ب. ۱۳۸٦.جداسازی ۱۰۰ کیلو دالتونی(KDa ۱۰۰) موجود در عصاره غضروف کوسه ماهی وبررسی میتوژنیک آن بر سلولهای لنفوسیت انسانی و سایتوتوکسیته رده سلولی سرطانی . k_{562}پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بیوشیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات.

Ames ,B.N., Shigenaga, M.K. & Hagen, T.M. 1993. Oxidant antioxidant and degenerative disease of aging. Proceedings of the National Academy of Science of the United States of AME. Vol.. 90:7915_7922.

Ames, B. N. 1998. Ames test for mutagenicity. Bio. Toxicol.,4: 67-80.

Cuzzocrea, S, Riley, P.D, Caputi, P.A. & Salvemini, D. 2001. Antioxidant therapy: A new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia / reperfusion injury, pharmacology Review, 53: 135- 159.

Dorothy,M. & Ames,B.N. 1983.Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutat. Res.113:173-216.

Felzenszwalb, I., Pelielo de Mattos, J.C., Bernardo – Filho, M. & Caldeirude – Araujo,B. 1998. Shark cartilage – containing preparation: protection against reactive oxygen species, Food and Chemical Toxicology, 36(12): 1079-1084.

Fontenele, J.B., Araujo, G.B., Alencar, J.W. & Viana, G.S. 1997. The analgesic and anti – inflammatory effects of shark cartilage are due to a peptide molecule and are nitric oxide (No) system dependent. Biological and pharmaceutical Bulletin, 20: 1151-115.

Gerber, G.B., Leonard, A. & Hantson, P.H. 2002. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of manganese compounds. Critical Reviews in Oncology , Hematology, 42: 25-34.

Green, M.H.L. & Muriel, W.J. 1974. Mutagen testing using Trp reversion in Escherichia coli. Mutation Res., 38: 3-32.

Hernandez, A., Sarmiento, M. & Ochoa, M. 2002. Mutagenicity and antimutagenicity studies of lipid extracts from yellow tail fish, Lisa fish and cozen fish. Food and Chemical Toxicology, 40: 1469-1474.

Ikken, Y., Cambero, I., Marin, M.L., Martines, A. & Merales, P. 1998. Antimutagenic effect of fruit and vegetable aqueous extracts against N – nitrosamines evaluated by the Ames test, Journal of Agricultural and food Chemistry, 46: 5194-5200.

Kim, S.Y., Shon, Y.H., Lee, J.S., Kim, C.H. & Nam, K.S. 2000. Antimutagenic activity of soybeans fermented with basidiomycetes in Ames / Salmonella test. Biotechnology letters, 22: 1197-1202.

Maron, D.M. & Ames, BN. 1983. Revised methods for the salmonella mutagenicity test. Mutat. Res., 113: 173-215.

Meyers, S.P.& Bligh, D. 1981. Characterization of Astaxanthin pigments from Heat-Processed Crawfish Waste. J. Agric. Food Chem., 29, 505-508.

Miglior, L. & Copped, F. 2002. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. Mutation Research, 512: 135-153.

Miglior, L. & Copped, F. 2002. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. Mutation Research, 512: 135-153.

Mortelmans, K. & Zeiger, E. 2000. The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay, mutation Research, 455:29-60.

Pelroy, R.A. & Peterson, M.R. 1974. Use of Ames test in evaluation of shale oil fraction, PubMed Abstract, 30:191-203.

Rosenkranz, H.S. 2003. Synergy between systemic toxicity and genotoxicity relevance to human cancer risk, Mut. Res., 529: 117-127.

Ruan, C., Liang, Y. & Liu, Z. 1989. Initiation of twelve Chinese traditional medicinal herbs on mutagenic effect induced by aflatoxin B_1. Chin. J. Cancer, 1: 29-31.