مقاله پژوهشی
(Original Article)

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره ششم ـ شماره دوم ـ تابستان ۹۱
صفحات ۳۷ الی ٤٤

فعالیت ضد موتاسیونی سویه‌های پروبیوتیکی جداشده از محصولات پروبیوتیکی

رضا کاظمی درسنکی[۱]، ناصر قائمی[۲]، میرساسان میرپور[۳]، فاطمه میرداوودی[٤]

[۱]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.
[۲]استادیار بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
[۳]مربی میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.
[٤]کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های پروبیوتیک، مکمل‌های غذایی میکروبی هستند که از طریق حفظ تعادل میکروبی روده تأثیرات سودمندی بر سلامت انسانها دارند. براساس تحقیقات انجام‌شده، استفاده از محصولات پروبیوتیک در کاهش خطر سرطان مؤثر است. هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت ضد موتاسیونی باکتری‌های پروبیوتیک جداشده از ماست و قرص پروبیوتیکی بر عوامل جهش‌زا و سرطان‌زا می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی، باکتری‌های پروبیوتیک از ماست و قرص پروبیوتیکی در محیط MRS در شرایط بی‌هوازی (۵٪ دی‌اکسید کربن و گاز پک) و در دمای ۳۷ $^{\circ}C$ جداسازی شدند. سپس با تست‌های بیوشیمیایی شناسایی و مورد تأیید قرار گرفتند. در ادامه، اثر ضد موتاسیونی سوپرناتانت کشت آنها در مقابل عوامل موتاسیون‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم توسط تست ایمز (سویه *سالمونلا تیفی موریوم TA100*) در حضور و عدم حضور S_9 ارزیابی شد.

یافته‌ها: در این مطالعه از ماست و قرص پروبیوتیکی، ۶ باکتری پروبیوتیک جدا شد. نتایج فعالیت ضد موتاسیونی باکتری‌ها توسط تست ایمز نشان داد آنها می‌توانند عوامل موتاسیون‌زا را در برخی گونه‌ها تا بیش از ۴۰٪ مهار کنند که فعالیت ضد موتاسیونی خوبی محسوب می‌شود.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از محصولات حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، دارای اثرات ضد موتاسیونی و ضد سرطانی بسیار خوبی می‌باشد. آنها با تغییر فلور روده سبب کاهش جذب مواد سرطان‌زا و جهش‌زا شده و به سلامت انسان کمک می‌کنند.

کلید واژه‌ها: پروبیوتیک‌ها؛ عوامل آنتی‌موتاسیونیک؛ تست ایمز؛ ضد موتاسیونی.

نویسنده مسئول مکاتبات: باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد لاهیجان، لاهیجان، ایران؛
آدرس پست الکترونیکی: reza_kazemi_d@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۸۹/۹/۸ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۰/۱۵

مقدمه

سرطان یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در جوامع به شمار می‌رود و عوامل متعدد شیمیایی، پرتوی، ویروسی و توارث در آن نقش دارد (۱). آلودگی مواد غذایی و محیط، از مهم‌ترین مشکلات بشر و عامل بیماری‌های عمده‌ای از جمله سرطان است (۲). هر عملی که سبب حذف، مهار و غیرفعال‌سازی مواد موتاسیون‌زای ایجادکننده سرطان شود، ارزشمند است (۳). لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها فلور طبیعی دستگاه گوارش هستند که در تماس مستقیم با مواد موتاسیون‌زا قرار دارند. این باکتری‌ها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های گوارشی نقش مهمی ایفا می‌کنند (۴). لاکتوباسیلوس‌های گرم مثبت فاقد اسپور، کاتالاز منفی و متعلق به خانواده *Lactobacillaceae* می‌باشند و تقریباً ۵۶ گونه از این جنس تاکنون شناسایی شده است (۵). جنس *بیفیدوباکتریوم* از فراوان‌ترین گونه‌هایی است که فلور طبیعی روده بزرگ انسان را تشکیل می‌دهد. این جنس دارای ۳۰ گونه بوده که ۱۴ گونه آن منبع انسانی دارند (۶). آزمایشهای

www.SID.ir

ضدجهشی و ضد سرطانی روی حیوانات حساس آزمایشگاهی پرهزینه و وقت‌گیر است، به‌همین دلیل می‌توان از روش‌هایی مانند تست ایمز برای تعیین پتانسیل ضد جهشی و ضد سرطانی مواد استفاده کرد (۷). خاصیت منحصر به فرد این آزمون استفاده از میکروزوم کبد (S_9) برای فعال‌سازی برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زا است. این عصاره میکروزومی از کبد پستاندارانی مثل رت تهیه می‌شود (۸). نتایج تحقیقات انجام‌شده نشان می‌دهد استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک در کاهش خطر سرطان مؤثر است. عصاره شیر تخمیرشده با *لاکتوباسیلوس بولگاریس* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* دارای خاصیت ضد جهش‌زایی روی اتیل متیل سولفانات و متیل متان سولفانات می‌باشد (۹). همچنین بیفیدوباکتریوم‌های موجود در دستگاه گوارش، اثرات خوبی در مهار ماده قوی جهش‌زای بنزوپیرن از خود نشان می‌دهند (۴). مطالعات روی مدل‌های آزمایشگاهی نشان داده است، باکتری‌های اسید لاکتیک دارای اثرات مهارکنندگی روی گسترش زخم‌های پیش‌سرطانی و تومور در مدل حیوانی هستند (۱۰). این مطالعه با هدف تعیین اثر ضد جهشی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌های جداشده از ماست و قرص پروبیوتیکی در مقابل مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم با استفاده از تست ایمز و سویه *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در حضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9) صورت گرفت.

روش بررسی

این مطالعه به‌صورت تجربی در سال ۱۳۸۹ انجام شد. طی این بررسی از نمونه‌های ماست پروبیوتیکی رایج در سوپرمارکت‌ها و کپسول تجاری پروبیوتیک ساخت شرکت نچرال فاکتورز کانادا برای جداسازی گونه‌های پروبیوتیکی موجود در آنها استفاده گردید که تنها گونه‌های متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* و جنس *بیفیدوباکتریوم* مدنظر قرار گرفت.

برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک، از نمونه ماست پروبیوتیکی و کپسول تجاری پروبیوتیک ساخت شرکت نچرال فاکتورز کانادا رقت تهیه گردید و به روش پورپلیت در محیط MRS Agar کشت داده شد، سپس در شرایط بی‌هوازی (۵٪ دی‌اکسید کربن و گاز پک) در دمای $37^{\circ}C$ برای ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و کلنی‌های خالص‌سازی‌شده؛ با تست‌های بیوشیمیایی، تخمیر قندها، مطالعات میکروسکوپی، رشد در دمای $45^{\circ}C$، ۳۷، ۱۵ و تولید آمونیاک از آرژنین، تا سطح گونه شناسایی و طبق کتاب The Prokaryotes و برجی مورد تأیید قرار گرفتند (۱۱). در این مطالعه از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم TA100* استفاده شد. این باکتری در اپرون هیستدین خود دارای جهش بوده و درکنار جهش‌های ثانویه دیگر، توانایی بالایی در تشخیص عوامل جهش‌زا دارد.

جهش‌های ثانویه و چگونگی تأیید آنها به قرار زیر است:

وابستگی به هیستدین: سویه *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط نوترینت براث کشت شبانه داده شد (به میزان ۰/۵ مک‌فارلند) و به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرماگذاری گردید. برای انجام تست، ۰/۱ml از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم TA100* کشت داده‌شده در نوترینت براث به محیط حداقل گلوکز (Minimal Glucose Agar) حاوی ۰/۱ml محلول هیستدین و بیوتین اضافه شد. برای کنترل نیز ۰/۱ml از باکتری *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط حداقل گلوکز حاوی ۰/۱ml بیوتین شده (محیط حداقل دارای بیوتین و فاقد هیستدین) و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرماگذاری شدند.

جهش Rfa: در این آزمون ۰/۱ml از کشت شبانه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط نوترینت براث به ۲ml تاپ آگار اضافه شد، و در ادامه پس از یک دقیقه تکان دادن روی محیط نوترینت آگار، پخش گردید. بعد از بسته شدن، دیسک آغشته به کریستال ویوله ۰/۱٪ روی محیط نوترینت آگار حاوی باکتری قرار گرفت و به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرماگذاری شد.

جهش Uvr B: از این آزمون برای تأیید حساسیت UV در سوش *سالمونلا تیفی موریوم TA100* استفاده می‌شود. ۰/۱ml از کشت شبانه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط نوترینت براث، در محیط نوترینت آگار کشت داده شد و تنها نیمی از پلیت توسط کاغذ آلومینیومی پوشانده گردید. سپس در فاصله ۳۳cm از لامپ UV، به مدت ۸ ثانیه پرتودهی شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرماگذاری گردید.

Archive of SID
www.SID.ir

آزمون R-Factor: این آزمون برای بررسی وجود فاکتور مقاومت به آمپی‌سیلین به کار می‌رود. در این آزمون از دیسک آمپی‌سیلین استفاده می‌شود. برای انجام این تست، ۰/۱ml از کشت شبانه باکتری *سالمونلا تیفی موریوم TA100* موجود در محیط نوترینت براث، در محیط نوتریت آگار کشت داده شد و دیسک آمپی‌سیلین روی محیط نوترینت آگار حاوی باکتری قرار گرفت، سپس به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد. طیف وسیعی از عوامل سرطان‌زا و جهش‌زا نیاز به فعال‌سازی متابولیکی برای شناسایی دارند. برای تهیه عصاره میکروزوم (S_9)، موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت دور از آب و غذا نگهداری شدند تا ترشح آنزیم‌های کبدی به‌واسطه گرسنگی تحریک شوند و افزایش یابند. در ادامه، پس از کشتن حیوان، با وسایل کاملاً استریل کبدها با دقت خارج و با کلرید پتاسیم سرد و تازه ۰/۱۵M شستشو داده شدند تا گلبول‌های قرمز که مانع از فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم P450 می‌شوند خارج گردند. به ازای وزن هر گرم کبد، ۱cc کلرید پتاسیم ۰/۱۵M به کبدها اضافه شده و با قیچی استریل روی یخ له و خرد شدند. سپس کبدها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴° با دور ۹۰۰۰g سانتریفوژ شدند. برای آماده‌سازی مواد موتاسیون‌زا، ۰/۰۱۵g از هر ماده موتاسیون‌زا در ۱۰cc دی متیل سولفاکساید (DMSO) حل شد، سپس ۱cc از این محلول در ۹cc DMSO دیگر حل شده و بدین ترتیب ۱/۵ml/µg از هر ماده موتاسیون‌زا به دست آمد. باکتری‌های پروبیوتیکی خالص‌شده (لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها) در محیط MRS Broth تلقیح شدند تا کدورتی معادل ۰/۵مک فارلند (۱/۵×۱۰۸cfu/ml) به دست آید. سپس محیط‌ها در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. برای تهیه سوپرناتانت کشت، باکتری‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴° با دور ۳۵۰۰ سانتریفوژ شدند، و از مایع رویی کشت برای انجام ادامه کار استفاده گردید.

برای آزمون ضد جهشی و ضد سرطان‌زایی، بررسی توسط سه پلیت (پلیت اصلی شامل باکتری پروبیوتیکی در کنار دو شاهد مثبت و منفی) به‌طور همزمان انجام می‌شود و شمارش کلنی‌های برگشتی پلیت‌ها و مقایسه آنها نشان‌دهنده جواب آزمون است. این مطالعه براساس آزمون شرح داده‌شده توسط ایمز (۱۲) و آزمون تغییریافته آن در سال ۲۰۰۵ (۱۳)، در حضور و عدم حضور عصاره کبد (S_9) انجام شد.

۱- حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9)

نمونه اصلی: ۰/۱ml از مایع رویی کشت (سوپرناتانت) باکتری پروبیوتیکی جداشده از قرص و ماست پروبیوتیکی، ۰/۱ml کشت تازه و شبانه *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط نوترینت براث، ۰/۱ml از مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم به میزان ۱/۵µg در هر پلیت ماده جهش‌زا، به‌طور جداگانه به لوله محتوی ۳ml تاپ آگار افزوده شد. برای انجام چرخه سلولی، ۰/۱ml از محلول ۰/۵mM هیستدین و بیوتین نیز به لوله اضافه گردید، در پایان با افزودن ۰/۵ml از عصاره میکروزوم کبد (S_9) به تاپ آگار، و بعد از ۳ دقیقه تکان دادن، به‌صورت یکنواخت بر روی محیط حداقل گلوگز (Minimal Glucose Agar) پخش گردید، سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

شاهد مثبت: ۰/۱ml کشت تازه و شبانه *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط نوترینت براث، ۰/۱ml از مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم به میزان ۱/۵µg در هر پلیت ماده جهش‌زا به‌طور جداگانه، ۰/۱ml از محلول ۰/۵mM هیستدین، بیوتین و ۰/۵ml از عصاره میکروزوم کبد (S_9) به ۳ml تاپ آگار اضافه شد، در ادامه بعد از ۳ دقیقه تکان دادن، به‌صورت یکنواخت بر روی محیط حداقل گلوگز پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

شاهد منفی: ۰/۱ml کشت تازه و شبانه *سالمونلا تیفی موریوم TA100* در محیط نوترینت براث، DMSO۰/۱ml، ۰/۱ml از محلول ۰/۵mM هیستدین، بیوتین و ۰/۵ml از عصاره میکروزوم کبد (S_9) به ۳ml تاپ آگار اضافه شد. در ادامه، بعد از ۳ دقیقه تکان دادن، به‌صورت یکنواخت روی محیط حداقل گلوگز پخش گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرماگذاری شد.

۲- عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9)

این قسمت نیز مانند مراحل شرح داده‌شده قبلی است، با این تفاوت که در این مرحله به محیط‌ها عصاره میکروزوم کبد (S_9) اضافه نمی‌شود.

Archive of SID
www.SID.ir

برای محاسبه درصد بازدارندگی از فرمول ong و همکارانش:

(۱۰۰×[A-B)/A])= درصد بازدارندگی

که در سال ۱۹۸۶ ارائه شد استفاده گردید. در این فرمول، B تعداد کلنی برگشتی در هر پلیت در حضور ماده جهش‌زا و باکتری مورد بررسی و A تعداد کلنی برگشتی در پلیت کنترل مثبت است (۱۴). اگر میزان مهارکنندگی باکتری‌ها کمتر از ۲۵٪ باشد اثرات ضد جهشی و بازدارندگی منفی است، اما اگر میزان مهارکنندگی بین ۴۰-۲۵٪ باشد اثرات ضد جهش‌زایی متوسط خواهد بود و درصورتی‌که اثرات مهارکنندگی مواد جهش‌زا بالای ۴۰٪ باشد اثرات مهارکنندگی و ضد جهشی نیز بالا خواهد بود. نتایج با توجه به تعداد کلنی‌های برگشتی در نمونه اصلی و شاهد مثبت و منفی، توسط نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها

در این بررسی طبق تست‌های شناسایی و تأییدی کتاب The Prokaryotes و برجی، ۶ نمونه باکتری شامل: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس بولگاریس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از ماست و قرص پروبیوتیکی شناسایی و جداسازی شدند (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: شناسایی سویه‌های پروبیوتیکی براساس تست‌های بیوشیمیایی و مرفولوژیکی

شماره	گونه‌های پروبیوتیکی	رشد در دمای (درجه سانتیگراد)			کاتالاز	حرکت	NH_3 از آرژنین	تخمیر کربوئیدرات											گروه لاکتو باسیل
		۱۵	۴۵	۱۵ و ۴۵				سلوبیوز	لاکتوز	مانیتول	رافینوز	گالاکتوز	ملی بیوز	سوکروز	مالتوز	مانوز	ترهالوز	سوربیتول	آسکولین
۱	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (قرص و ماست)	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	+	−	+	+	+	−	−	+
۲	لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ماست)	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
۳	لاکتوباسیلوس بولگاریس (ماست)	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
٤	لاکتوباسیلوس کازئی (ماست)	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+

ادامه جدول شماره ۱

شماره	گونه پروبیوتیکی	تخمیر کربوئیدرات																		رشد در دمای (درجه سانتیگراد)			کاتالاز	حرکت	اوره آز
		زایلوز	مانوز	فروکتوز	گالاکتوز	سوکروز	مالتوز	ترهالوز	مانیتول	سالیسین	سوربیتول	آرابینوز	رافینوز	دیبوز	لاکتوز	اینولین	سلوبیوز	۱۵	۳۷	٤۵			
۱	بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (قرص)	−	−	+	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−

Archive of SID

www.SID.ir

سوش *سالمونلا تیفی موریوم TA100* از نظر جهش Rfa، جهش Uvr B و پلازمید R-Factor مثبت بود. همچنین رشد کلنی در محیط بیوتین، هیستدین و عدم رشد آن در محیط بیوتین کنترل، نشانگر وابستگی سوش به هیستدین بوده است. همچنین وجود هاله شفاف اطراف دیسک نشانگر عدم رشد سلول‌ها و وجود جهش Rfa بود. این جهش سبب کاهش نسبی سد لیپو پلی‌ساکاریدی شده و سطح باکتری را می‌پوشاند و قابلیت نفوذ مولکول‌های بزرگ را افزایش می‌دهد. همچنین عدم تشکیل هاله در اطراف دیسک، وجود پلاسمید R-Factor را در این باکتری ثابت می‌کند. از طرفی، عدم رشد در ناحیه پرتودیده، نشان‌دهنده جهش Uvr B می‌باشد. اثر ضد جهش‌زایی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) باکتری‌های پروبیوتیکی جداشده از ماست و قرص پروبیوتیکی روی مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم در حضور باکتری سالمونلا تیفی موریوم *TA100* و حضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9) در جدول شماره ۲ و ۳ آورده شده است. این جداول نشان‌دهنده درصد مهار این باکتری‌ها از ۱۰۰-۰٪ می‌باشند.

جدول شماره۲: اثر ضد جهش‌زایی سوپرناتانت شش گونه پروبیوتیکی در مقابل سدیم آزید

کلنی‌های برگشتی	S_9^+ و سالمونلا تیفی موریوم *TA100*		S_9^- و سالمونلا تیفی موریوم *TA100*	
نمونه‌های آزمایشی	کلنی برگشتی	درصد بازدارندگی	کلنی برگشتی	درصد بازدارندگی
کنترل مثبت سدیم آزید	۶۱۵	–	۴۸۵	–
کنترل منفی DMSO	۶۰	–	۴۵	–
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ماست)	۲۹۵	٪۵۲	۲۶۵	٪۴۵
لاکتوباسیلوس بولگاریس (ماست)	۳۶۲	٪۴۰	۳۳۱	٪۳۱
لاکتوباسیلوس کازئی (ماست)	۳۳۵	٪۴۵	۳۱۰	٪۳۶
لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ماست)	۳۵۲	٪۴۲	۳۲۸	٪۳۲
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (قرص)	۲۰۵	٪۶۶	۱۸۵	٪۶۱
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (قرص)	۲۴۸	٪۶۰	۲۰۵	٪۵۸

سویه پروبیوتیکی جداشده از ماست و قرص پروبیوتیکی توانست در حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9)، ماده جهش‌زای سدیم آزید را بیش از ۴۰٪ مهار کند، که مهارکنندگی بسیار خوبی محسوب می‌شود. اما گونه *لاکتوباسیلوس بولگاریس* ماست با مهار ۴۰٪ نتوانست جهش‌زایی قوی از خود نشان دهد (جدول شماره ۲، ۴). در این بررسی *لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس* قرص با مهار ۶۶٪، بیشترین توانایی را از خود نشان داد. همچنین توانایی مهارکنندگی این باکتری‌ها در مقابل سدیم آزید، زمانی‌که عصاره میکروزوم کبد (S_9) در محیط وجود نداشت، کاهش چشمگیری پیدا کرد. از طرفی، در محیط فاقد عصاره میکروزوم (S_9)، *لاکتوباسیلوس بولگاریس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ماست با مهار به ترتیب ۳۱٪ و ۳۲٪، کمترین توانایی ضد جهشی را از خود نشان دادند که توانایی ضد جهشی متوسطی محسوب می‌شود.

جدول شماره ۳: اثر ضد جهش‌زایی سوپرناتانت شش گونه پروبیوتیکی در مقابل پتاسیم پرمنگنات

کلنی‌های برگشتی	S_9^+ و سالمونلا تیفی موریوم *TA100*		S_9^- و سالمونلا تیفی موریوم *TA100*	
نمونه‌های آزمایشی	کلنی برگشتی	درصد بازدارندگی	کلنی برگشتی	درصد بازدارندگی
کنترل مثبت پتاسیم پرمنگنات	۵۹۸	–	۴۶۱	–
کنترل منفی DMSO	۶۰	–	۴۵	–
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ماست)	۳۲۲	٪۴۶	۲۷۵	٪۴۰
لاکتوباسیلوس بولگاریس (ماست)	۳۹۲	٪۳۴	۳۲۵	٪۲۹
لاکتوباسیلوس کازئی (ماست)	۳۶۰	٪۴۰	۳۰۶	٪۳۴
لاکتوباسیلوس پلانتاروم (ماست)	۳۶۸	٪۳۸	۳۱۴	٪۳۲
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (قرص)	۲۵۲	٪۵۸	۲۲۲	٪۵۲
بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (قرص)	۲۶۸	٪۵۵	۲۳۲	٪۵۰

Archive of SID

www.SID.ir

تنها ۳ سویه پروبیوتیکی جداشده از ماست و قرص پروبیوتیکی توانستند در حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9)، ماده جهش‌زای پرمنگنات پتاسیم را بیش از ۴۰٪ مهار کنند، ولی گونه‌های *لاکتوباسیلوس بولگاریس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ماست با مهار به ترتیب ۳۴٪، ۴۰٪ و ۳۸٪ نتوانستند جهش‌زایی قوی از خود نشان دهند (جدول شماره ۳). در این بررسی *لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس* قرص با مهار ۵۸٪، بیشترین توانایی را از خود نشان داد. توانایی مهارکنندگی این باکتری‌ها در مقابل پرمنگنات پتاسیم، زمانی‌که عصاره میکروزوم کبد (S_9) در محیط وجود نداشت کاهش چشمگیری یافت، و هنگامی‌که عصاره میکروزوم (S_9) در محیط نبود، *لاکتوباسیلوس بولگاریس* ماست با مهار ۲۹٪ کمترین توانایی ضد جهشی را از خود نشان داد. نتایج حاصل از بررسی اثر ضد جهشی و ضد سرطانی در حضور و عدم حضور S_9 در تست ایمز، نشان داد تعداد کلنی‌های برگشتی القاشده با مواد جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم در تمامی آزمایشها انجام‌شده در بالاترین سطح به ترتیب برابر ۶۱۵، ۵۹۸ و تعداد کلنی‌های برگشتی در شاهد منفی در پایین‌ترین سطح خود برابر با ۴۵ بوده است. در جداول ۳ و ۴، بالاترین اثر مهارکنندگی را *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قرص از خود نشان داده است که این اثر مهارکنندگی در حضور عصاره میکروزوم کبد S_9بیشتر از زمانی است که این عصاره در محیط وجود ندارد. همچنین کمترین اثر ضد جهشی در *لاکتوباسیلوس بولگاریس* مشاهده شد. به‌طورکلی در این مطالعه، باکتری‌های مورد بررسی اثرات خوب جهش‌زایی از خود نشان دادند که این اثرات در حضور عصاره میکروزوم کبد به مراتب بیشتر بود. با توجه به حدود اطمینان و معنی‌داری در ارتباط با فعالیت ضد جهشی سویه‌های پروبیوتیکی مورد آزمون با $p\leq ۰/۰۵$، می‌توان از درستی آزمون در حضور دو ماده جهش‌زای به‌کار برده‌شده اطمینان حاصل کرد.

بحث

در طی چند دهه گذشته، وجود میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در انواع مختلف غذاها به‌خصوص فرآورده‌های لبنی در حال افزایش بوده است. لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها جزء باکتری‌های پروبیوتیک محسوب شده و هر دو فلور طبیعی روده هستند که اثرات مفید بسیاری روی سلامت انسانها دارند (۱۵).

۸۵٪ سرطان‌ها در اثر جهش‌های ژنتیکی به‌وجود می‌آیند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت بیشتر ترکیبات جهش‌زا به احتمال زیاد سبب سرطان می‌شوند. امروزه استفاده از روش ایمز جهت شناسایی مواد جهش‌زا رایج است که روشی به مراتب ارزان‌تر از سایر روش‌ها می‌باشد. اکثر سویه‌های مورد استفاده در تست ایمز گالاکتوز منفی بوده و به‌علت اختلال در اپران گالاکتوز دخیل در سنتز لیپو پلی‌ساکارید سطح باکتری، در بیماری‌زایی دچار نقص هستند. به‌طورکلی مکانیسم‌هایی که باکتری‌های پروبیوتیک برای کاهش مواد موتاسیون‌زا و سرطان‌زا به کار می‌گیرند کاملاً شناخته‌شده نیست (۱۶). اما برخی از آنها عبارتند از:

۱- اتصال به ماده موتاسیون‌زا و جلوگیری از جذب آنها توسط بدن و تجزیه برخی ترکیبات موتاسیون‌زا

El-Nezami در بررسی خود به این نتیجه رسید که *لاکتوباسیلوس رامنسوس* در شرایط In Vitro توانایی اتصال به آفلاتوکسین را دارد (۱۷). همچنین لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها توانایی تجزیه ترکیبات N- نیتروز آمین موجود در مواد غذایی که از عوامل مهم ایجاد سرطان محسوب می‌شوند، را نیز دارند (۱۸).

۲- کاهش فعالیت برخی آنزیم‌های مضر و مهار باکتری‌های مضر روده

آنزیم‌های مدفوعی مانند نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز، β- گلوکورونیداز، گلیکولیک اسید هیدرولاز قادرند ترکیبات پیش‌جهش‌زا و پیش‌سرطان‌زا را به ترکیبات جهش‌زا و سرطان‌زا تبدیل کنند. این آنزیم‌ها توسط باکتری‌های مضر روده تولید می‌شوند و ثابت شده است که کاهش این آنزیم‌های مضر که رابطه مستقیمی با کاهش باکتری‌های مضر دارد، ریسک ابتلا به سرطان را کاهش می‌دهد. در بررسی Goldin و همکارانش، گزارشهایی حاکی از توانایی *لاکتوباسیلوس کازئی* در کاهش فعالیت سه آنزیم مضر β- گلوکورونیداز، نیتروردوکتاز، آزوردوکتاز به دست آمد (۱۹،۲۰).

۳- تولید متابولیت‌های ویژه و کاهش اسیدهای صفراوی

باکتری‌های پروبیوتیک برخی از متابولیت‌ها مانند بوتیرات، فولات و ... تولید می‌کنند که با اثر بر روی سلول‌های اپی‌تلیال روده، تکثیر سلول‌های سرطانی را کاهش می‌دهند. Biffi و همکارانش در مطالعه خود نشان دادند تولید متابولیت‌ها توسط باکتری‌های پروبیوتیک با جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی ارتباط دارد (۲۱).

Archive of SID
www.SID.ir

٤- تحریک سیستم ایمنی

سلول‌های باکتری‌های پروبیوتیک قادرند سبب تحریک و تقویت سیستم ایمنی و افزایش میزان سیتوکین شوند، همچنین عاملی برای ممانعت از رشد تومور و کاهش سرطان باشند (۲۲). Sekine و همکارانش در بررسی خود، اثرات مثبت *بیفیدوباکتریوم اینفتیس* را در تحریک سیستم ایمنی موش در مهار مواد موتاسیون‌زا نشان دادند (۲۳). همچنین تحقیقات انجام‌شده، نقش مثبت باکتری‌های پروبیوتیکی را در کاهش عوامل جهش‌زا تأیید می‌کنند.

در مطالعه Chalova و همکارانش، توانایی سوپرناتانت (مایع رویی کشت) برخی باکتری‌های پروبیوتیک اعم از لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم‌های استاندارد در فازهای مختلف رشد در کاهش دو ماده موتاسیون‌زای بنزوپیرن و سدیم آزید بررسی شد که اثرات مناسبی در کاهش این مواد توسط سوپرناتانت باکتری‌ها مشاهده گردید. طی این بررسی *بیفیدوباکتریوم آدولسنتی ATCC 15703* در فاز رشد با مهار ۴۸/۷۰٪ و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014* در فاز سکون با مهار ۵۹/۳۷٪ ماده جهش‌زای بنزوپیرن، بیشترین توان را از خود نشان دادند و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم ATCC 8014* با مهار ۵۴/۶۴٪ در فاز سکون، بیشترین فعالیت را در مهار ماده جهش‌زای سدیم آزید از خود نشان داد (۲۴). در مطالعه حاضر نیز سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی، توانایی‌های خوب ضدجهشی از خود نشان دادند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداشده از قرص پروبیوتیکی با مهار ۶۶٪ سدیم آزید در حضور عصاره میکروزوم کبد و ۶۱٪ در عدم حضور عصاره میکروزوم کبد، بیشترین توانایی را در کاهش ماده جهش‌زای سدیم آزید از خود نشان داد و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از ماست پروبیوتیکی توانست ۴۲٪ سدیم آزید را در حضور عصاره میکروزوم کبد کاهش دهد. در بررسی Heui-Dong و همکارانش، فعالیت *Lactobacillus plantarum KLAB21* ایزوله شده از کیمچی (kimchi) در مهار ۴ ماده سرطان‌زای آفلاتوکسین B_1، NQO، MNNG و NPD با استفاده از تست ایمز با کمک ۲ سویه *TA100* و *TA98* مورد بررسی قرار گرفت که سوپرناتانت کشت باکتری با مهار ۹۸/۴٪ ماده جهش‌زای MNNG در حضور سویه *TA100* و مهار ۵۷/۳٪ ماده جهش‌زای NQO در حضور سویه *TA98*، بیشترین توانایی را از خود نشان داد (۲۵). در طی این مطالعه، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از ماست پروبیوتیکی در مهار جهش‌زایی دو عامل جهش‌زای سدیم آزید و پرمنگنات پتاسیم در حضور سویه *TA100*، حضور و عدم حضور عصاره میکروزوم کبد (S_9) بررسی شد که بیشترین اثر مهارکنندگی را در حضور عصاره میکروزوم کبد با مهار ۳۸٪ پرمنگنات پتاسیم و ۴۲٪ سدیم آزید از خود نشان داد. در بررسی Zobel و همکارانش، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و عصاره کشت این باکتری مانع از آسیب *DNA* توسط *MNNG* که یک ماده سرطان‌زا می‌باشد گردید (۲۶). در مطالعه حاضر نیز سوپرناتانت کشت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* جداشده از ماست و قرص پروبیوتیکی، بیشترین فعالیت ضد جهشی را در مقابل دیگر سویه‌های پروبیوتیکی تست‌شده از خود نشان داد. Reddy و همکارانش طی بررسی به این نتیجه دست یافتند که با استفاده از کشت‌های باکتری *بیفیدوباکتریوم لانگوم* می‌توان از گسترش تومورهای سرطانی جلوگیری کرد (۲۷)، در شرایط In Vitro توانایی ضدجهشی سویه‌های پروبیوتیکی با مطالعه حاضر مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد استفاده از محصولات حاوی باکتری‌های پروبیوتیک، دارای اثرات ضد موتاسیونی و ضد سرطانی بسیار خوبی می‌باشد. آنها با تغییر فلور روده سبب کاهش جذب مواد سرطان‌زا و جهش‌زا شده و به سلامت انسان کمک می‌کنند.

پیشنهادات

۱. بررسی توانایی ضد جهشی باکتری‌های پروبیوتیکی در حیوانات آزمایشگاهی یا رده کشت سلولی.

۲. شناسایی سویه‌های بومی پروبیوتیکی در ماست و پنیرهای محلی به کمک روش‌های مولکولی و تعیین فعالیت ضد جهشی آنها.

۳. بررسی فعالیت ضد جهشی باکتری‌های پروبیوتیکی در شرایط استرسی مختلف.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری صمیمانه مسئولین شرکت پگاه گیلان، خانم دکتر میترا هاتفی در تهیه سویه *سالمونلا تیفی موریوم TA100* و سرکار خانم محمدیان کمال تشکر را داریم.

Archive of SID
www.SID.ir

References:

1. Namiki M. Antioxidants/antimutagenes in Foods. Crit Rev Food Sci Nutr 1990;29(4):273-300.

2. Wollowoski I, Balkalinsky AT, Neudecker C, Pool Zoobel BL. Bacteria Used for Production of Yogurt Inactivate Carcinogens and Prevent DNA. Damage in the Colon of Rats. J Nutr 1999;129(1):77-82.

3. Hirayama K, Raftar J. The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention. Microbe Infect 2000;2(6):681-68.

4. Lo PR, Yu RC, Chou CC, Huang EC. Determinations of the Antimutagenic Activities of Several Probiotic Bifidobacteria Under Acidic and Bile Conditions Against Benzo[a] Pyrene by a Modified Ames Test. Int J Food Microbiol 2004;93(2):249-257.

5. De Roos NM, Katan M. Effects of Probiotic Bacteria on Human. Am J Clin Nutr 2000;71:405-411.

6. Picard C, Floramonti J. Bifidobacteria as Probiotic Agents-Physiological Effects and Clinical Benefits. Aliment Pharmacol Ther 2005;22(6):495-512.

7. Ames BN, Mccann J, Yamasaki E. Method for Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalin Mutagenicity Test. Mutat Res 1976;31(6):347-349.

8. Horn RC, Vargas VM. Antimutagenic Activity of Extracts of Natural Substances in the Salmonella/Microsome Assay. Mutagenesis 2003;18(2):113-18.

9. Groce CD, Morichetti E, Bronzetti G, Salvadori C. Antimutagenic Investigations of Commercial Yogurt. Antimuagenesis and Anticarcinogenesis Mchanisms. Plenum: New York Press; 1993. p. 119-124.

10. Brady LJ, Callader DD, Busta FF. The Role of Probiotic Cultures in the Prevention of Colon Cancer. J Nutr 2000;130(2S Suppl):410-14.

11. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K, Stackebrandt E, Editors. The Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3rd ed. NewYork: Springer; 2006. p. 320-404.

12. Maron DM, Ames BN. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. Mutat Res 1983;113(3-4):173-215.

13. Gomes-cameiro MR, Daniela MMD. Evaluation of Mutagenic and Antimutagenic Activities of Alpha Bisabolol in the Salmonella/microsome Assay. Mutat Res 2005;585(1-2):105-12.

14. Ong TM, Wong WZ, Stwart J, Brockman HE. Chlorophyllin a Potent Antimutagen Against Environmental and Dietary Complex Mixture. Mutat Res 1986;173(2):111-15.

15. Shah NP. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. Journal of Dairy Science 2000;83(4):894-907.

16. Hirayama K, Rafter J. The Role of Probiotic Bacteria in Cancer Prevention. Microbes Infect 2000;2(6):681-686.

17. el-Nezami H, Kankaanpaa P, Salminen S, Ahokas J. Physicochemical Alterations Enhance the Ability of Dairy Strains of Lactic Acid Bacteria to Remove Aflatoxin from Contaminated Media. J Food Prot 1998;61(4):466-468.

18. Rowland IR, Grasso P. Degradation of N-nitrosamines by Intestinal Bacteria. Appl Microbiol 1975;29(1):7-12.

19. Goldin BR, Gorbach SL. The Effect of Milk and Lactobacillus Feeding on Human Intestinal Bacterial Enzyme Activity. Am J Clin Nutr 1984;39(5):756-761.

20. Saarela M, Mogensen G, Fonden R, Matt OJ, Mattila-Sandholm T. Probiotic Bacteria: Safety, Functional and Technological Properties. J Biotechnol 2000;84(3):197-215.

21. Biffi A, Coradini D, Larsen R, Riva L, Di Fronzo G. Antiproliferative Effect of Fermented Milk on the Growth of a Human Breast Cancer Cell Line. Nutr Cancer 1997;28(1):93-99.

22. Matsuzaki T. Immunomodulation by Treatment with Lactobacillus Casei Strain Shirota. Int J Food Microbiol 1998;41(2):133-140.

23. Sekine K, Toida T, Saito M, Kuboyama M, Kawashima T, HashimotoY. A New Morphologically Characterized Cell Wall Preparation (Whole Peptidoglycan) from Bifidobacterium Infantis with a Higher Efficacy on the Regression of an Established Tumor in Mice. Cancer Res 1985;45(3);1300-1307.

24. halvo VI, Lingbeck JM, Kwon YM, Ricke SC. Extracellular Antimutagenic Activities of Selected Probiotic Bifidobacterium and Lactobacillus spp. As a Function of Growth Phase. J Environ Sci Health B 2008;43(2):193-198.

25. Heui-Dong P, Chang-Ho R. Antimutagenic Activity of Lactobacillus plantarum KLAB21 Isolated from Kimchi Korean Fermented Vegetables. Biotechnology Letters 2001;23(19):1583-1589.

26. Pool Zoble BL, Neudeker C, Domizlaff I, JI S, Schillinger U, Rummney C, Morreti M. Lactobacillus and Bifidobactrium Mediated Antigenotoxicity in Colon of Rats. Nutr Cancer 1996;26(3):365-80.

27. Reddy BS, Rivenson A. Inhibitory Effect of Bifidobacterium Longom on Colon, Mammary and Liver Carcinogenesis Induced by 2-Amino-Methylimidazo (4,5-floroquinoline), A Food Mutagen. Cancer Research 1993;53(17):3914-3918.

Archive of SID

www.SID.ir