مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۹، آذر ۱۳۹۶
صفحه: ۷۳۵-۷۲۸

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.9, Dec 2017
Pages: 728-735

بررسی جهش‌زایی و سرطان زایی تریاک با استفاده از تست Ames

مهنازمتقی[۱]، کیومرث صفی‌نژاد*[۲]، حسن محمداصغری[۳]

چکیده

مقدمه: سرطان یکی از شایع‌ترین بیماری‌ها در دنیا می‌باشد. با توجه به ترکیبات سرطانزای مواد مخدر، احتمال جهش‌زایی این مواد در مصرف کنندگان وجود دارد. هدف از این مطالعه بررسی جهش‌زایی تریاک توسط تست ایمز می‌باشد.

روش بررسی: ابتدا خلوص سویه سالمونلا تیفی موریوم TA100 بر اساس خلوص خاصیت جهش‌زایی آن، مورد تائید قرار گرفت. سپس از نمونه‌های تریاک به طور جداگانه در حجم ها و تکرارهای مختلف به محیط کشت حاوی کشت تازه شبانه TA100 اضافه و متعاقباً با نمونه‌های شاهد منفی (آب مقطر + TA100) مقایسه شدند. سپس در سه مرحله بدون بافر میکروزوم کبد موش (S_9) –بدون پری انکوباسیون، با بافر-S_9 با پریانکوباسیون، با بافر-S_9 بدون پری انکوباسیون، کلنی‌ها از نظر جهش‌زایی با شمارش تعداد کلنی‌های برگشتی TA100 مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصل با استفاده ازآزمون آماری ANOVA و آزمون تعقیبی Schefe جهت تعیین و اولیت بندی اختلاف میانگین گروه ها بر اساس رقت تریاک مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: بر اساس نتایج و مشاهده تعدادکلنی‌های برگشتی، تریاک در رقت‌های ۰/۰۴ به بالا جهش‌زا بود. در مورد نمونه تریاک جهش‌زایی در رقت و تکرارهای مختلف بدون -S_9 بدون پری انکوباسیون، با -S_9 با پری انکوباسیون و با -S_9بدون پری انکوباسیون در مقایسه با کنترل منفی تفاوت معنی‌داری در ($p=۰/۰۰۱$) نشان داد. نتایج آزمون شفه نشان دهنده این است که سطح معنی داری تغییرات در کلنی با بافر **S9** و پری انکوباسیون بیشتر از کلنی بابافر **S9** و بدون پری انکوباسیون و کلنی بدون بافر **S9** است (**p=۰/۰۰۱**).

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که تریاک به طور کامل و در تمام حجم‌ها جهش زا است. لذا پیشنهاد می‌شود از مصرف این ماده مخدر خودداری شود.

واژه‌های کلیدی: تست ایمز، جهش‌زایی، تریاک، سرطان، سالمونلا تیفی موریوم TA100

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد بروجرد
۲- استادیار، ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد بروجرد
۳- مربی، میکروبیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه آزاداسلامی واحد بروجرد
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۱۵۱۰۷۳۱، پست الکترونیکی: q_safinejad@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۷/۲۰

مقدمه

سرطان امروزه یکی از مهم ترین عوامل مرگ و میر بعد از بیماری‌های قلبی- عروقی بوده و عوامل متعددی در ایجاد آن نقش دارند، که از آن جمله می‌توان به عوامل شیمیایی، وراثتی، پرتوها و رادیکال‌های آزاد اشاره نمود. این عوامل قادرند با تغییر در توالی DNA، باعث القا موتاسیون و بروز سرطان شوند. شناسایی مواد یا عوامل القاکننده جهش نقش مهمی در تعیین سلامت ایفا می‌نماید، زیرا این عوامل جهش‌زا، گاهی سبب ایجاد آسیب به سلول‌های پایه جنینی و موتاسیون قابل توارث از نسلی به نسل دیگر می‌شوند. بدیهی است که دسترسی به روش ارزان، آسان و سریع، برای شناسایی مواد جهش‌زا از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (۱). تریاک و مشتقات آن که امروزه تحت عنوان اپیوئیدها مورد بحث قرار می‌گیرند از گذشته‌های دور از داروهای مؤثر و پرمصرف در پزشکی بوده است (۳ و ۲). تریاک از گیاه خشخاش به دست می‌آید که حاوی حداقل ۲۰ آلکالوئید است. مهم ترین آلکالوئیدهای آن مورفین، تارکوتین، پاپاورین، تبائین، کدئین و تارسئین می‌باشد. مورفین از اصلی ترین آلکالوئیدهای تریاک بوده و ۱۰ درصد آن را تشکیل می‌دهد (۴). پزشکان خواص ضد درد، ضد اسهال، ضد سرفه و خواب آور و مخدر را برای آن قائلند (۵). بسیاری از مردانی که معتاد به اوپیوئید هستند یا تحت نظارت محققین اوپیوئید دریافت کرده‌اند، اثرات جانبی زیادی مثل ناهنجاری‌های جنسی (ناهنجاری در نعوظ، کاهش میل جنسی و ...)، افسردگی و کاهش سطح انرژی رنج می‌برند. استفادهٔ طولانی مدت از اوپیوئیدها برای دردهای غیرسرطانی باعث کاهش زیاد درتستوسترون (آزادوتوتال) با یک الگوی وابسته به دوز می‌شود (۶). جهت بررسی توان سرطان‌زایی این ترکیبات راه‌های مختلفی وجود دارد که از جمله آن‌ها تزریق این مواد به داخل بدن حیوانات آزمایشگاهی و بررسی بروز تومور در آن‌ها می‌باشد. ولی این روش علاوه بر این که دارای هزینه بالایی می‌باشد و مقرون به صرفه نیست مدت زمان زیادی را نیز احتیاج دارد (۷). یکی از راه‌های مؤثر، معتبر و کم هزینه و سریع برای تشخیص توان موتاژنیک و بالطبع توان سرطان‌زایی مواد، استفاده از آزمون ایمز (Ames test) است. در این آزمون از باکتری سالمونلا تیفی موریوم استفاده می‌شود ویژگی منحصر به فرد این آزمون استفاده از میکروزوم کبدی S_9 برای فعال کردن برخی مواد جهش‌زا و سرطان‌زاست. زیرا بسیاری از این ترکیبات برای بروز ویژگی‌های جهش‌زایی یا سرطان‌زایی باید از نظر متابولیکی فعال شوند و از آن جا که باکتری سالمونلا قادر به انجام این فعالیت نیست لذا یک عصاره استریل میکروزومی از بافت پستانداران را می‌توان به تست جهش‌زایی اضافه نمود. میکروزومها حفره‌های غشایی کوچکی هستند که در یاخته‌های زنده و سالم دیده نشده و نتیجه تکه تکه شدن قسمت‌های باز سیستم غشایی درون یاخته ای و نیز شکسته شدن لوله‌ها و کیسه‌های شبکه آندوپلاسمی می‌باشند (۱۰-۸). با توجه به این مسئله این آزمون جهت بررسی اثر موتاژنیک تریاک مورد استفاده قرار گرفت. لازم به ذکر است که طبق بررسی‌های انجام شده در ایران هیچ گونه تحقیق مشابهی در این زمینه صورت نگرفته است ولی طی جستجوهایی که در مقالات خارجی انجام شد مشخص گردید که در بسیاری از کشورها از این آزمون جهت بررسی میزان جهش‌زایی اپیوئیدها استفاده شده است.

روش بررسی

این تحقیق بر اساس روش آزمایشگاهی مطالعات قبلی (۱۱،۱۲) انجام گرفت. سویه باکتری در این پژوهش سوش TA100 بود که از شرکت (Boone, NC, USA) Molecular Toxicology Inc خریداری شد و مورد تائید قرار گرفت و نتیجه کار با این سوش دنبال شد. سوش مذکور را وارد محیط کشت نوترینت براث کرده و جهت احیا سازی به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت بر روی محیط کشت نوترینت آگار در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد گرما گذاری شد. آزمون‌های تائید ژنوتیپ سوش TA100، حساسیت به کریستال ویوله جهت تائید جهش Rfa، حساسیت به پرتو uv جهت تائید جهش uvrB، حساسیت یا مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین جهت

تائید وجود یا عدم وجود پلاسمید PKM101، عدم قدرت رشد در محیط فاقد اسید آمینه هیستیدین جهت نیازمندی به هیستیدین و عدم قدرت رشد در محیط فاقد بیوتین تائیدی بر نیازمندی TA100 به بیوتین بود. همچنین برای تهیه بافر S_9، موش‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرسنگی داده شدند تا ترشح آنزیم‌های کبدی به واسطه گرسنگی تحریک شود و افزایش یابد، سپس بعد از بیهوشی با اتر و قطع نخاع، حیوان را کشته و کبد با یک پنس استریل خارج گردید. سپس کبدها را در کلرید پتاسیم سرد ۰/۱۵ مولار استریل و تازه تهیه شده چندین بار شستشو داده شدند تا گلبول‌های قرمز که مانع از فعالیت آنزیم‌های سیتوکروم P450 می‌گردند، خارج شوند. پس از شستشو کبدها، با استفاده از پشت پنس کاملاً له شدند. سپس به ازای هر گرم کبد موش 3cc از کلرید پتاسیم به کبدها اضافه کرده و وقتی مخلوط هموژنی به دست آمد در داخل لوله‌های سانترفیوژ استریل توزیع و به مدت ۱۰ دقیقه با دور 8700 rpm (9000 g) و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. بدین ترتیب گلبول‌های قرمز باقی‌مانده، جدا و مایع رویی شیری رنگ حاصل (که حاوی آنزیم‌های کبدی می‌باشد)، قابل استفاده شد. سپس طبق دستورالعمل ایمز با کوفاکتورهای لازم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد مخلوط گردید (۱۳).

جهت مطالعه جهش‌زایی تریاک، رقت‌های مختلفی از تریاک درست شد. ابتدا ۰/۱ گرم تریاک (تهیه شده از ستاد مبارزه با مواد مخدرتهران) را با ترازو وزن نموده و در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل کرده سپس با استوانه مدرج در ارلن مایر ریخته و آن را روی stir به همراه مگنت درون آن قرار داده تا بخوبی حل گردد. در نهایت شش غلظت یا رقت تهیه شد. رقت اول: ۰/۱ گرم تریاک در ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر (0/001 g/ml)، رقت دوم: ۰/۱ گرم تریاک درml ۱۰ آب مقطر (0/02 g/ml)، رقت سوم: ۰/۱ گرم تریاک در ml ۵ آب مقطر (0/04 g/ml)، رقت چهارم: ۰/۱ گرم تریاک در ml ۲/۵ آب مقطر (0/08g/ml)، رقت پنجم: ۰/۱ گرم تریاک در ml ۱/۲۵ آب مقطر (0/16 g/ml)، رقت ششم: ۰/۱ گرم تریاک در ml ۰/۶۲ آب مقطر (0/32 g/ml). مراحل کار بدین صورت بود که از رقت‌های مذکور توسط سمپلر استریل مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به لوله‌های حاوی ۲ میلی‌لیتر تاپ آگار و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول هیستیدین- بیوتین و ۰/۱ میلی‌لیتر کشت شبانه سوش TA100 افزوده شد. سپس محتویات لوله‌ها پس از ۳ ثانیه تکان‌دهی توسط شیکر به طور یکنواخت در سطح پلیت‌های حاوی گلوکز آگار حداقل (GM آگار) پخش شدند. بعد از سفت شدن آگار پلیت‌ها را وارونه کرده به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (برای هر ماده مورد آزمایش ۳ تکرار در نظر گرفته شد). در اینجا این مرحله یعنی تست ایمز با بافر با پری انکوباسیون ۶ بار با رقت‌های مختلف تریاک که در مرحله قبل آماده شده بود، انجام شد و تهیه گردید. مرحله استفاده از بافر بدون پری انکوباسیون همانند تست ایمز به روش قبل بود با این تفاوت که مرحله پری انکوباسیون وجود نداشت و محیط تاپ آگار مستقیم به GM اضافه شد. در مرحله دیگر ما از بافر S_9 در تست ایمز استفاده نکردیم، به همین دلیل تعداد کلنی‌ها می‌بایست نسبت به روش با بافر و پری انکوباسیون متفاوت باشد. در این حالت برای انجام تست ایمز از نمونه تریاک و باکتری TA100 به محیط تاپ آگار اضافه شده و به محیط GM اضافه می‌شدند. که از بافر S_9 استفاده نمی‌شد. این کار برای ۶ رقت مختلف تریاک انجام شد. برای کنترل مثبت این آزمون ۵۰ میکرولیتر ازمحلول سدیم آزید را با ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری TA100 به میکروتیوب ریخته و محلول میکروبی را به ۲cc تاپ آگار منتقل و روی محیط کشت GM در پلیت ریخته و انکوبه نمودیم. برای کنترل منفی نیز ۵۰ میکرولیتر از آب مقطر را با ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری TA100 را در میکروتیوب ریخته و محلول میکروبی را به ۲cc تاپ آگار منتقل و روی محیط کشت GM در پلیت ریخته و انکوبه کردیم.

در این تحقیق اطلاعات جهت تجزیه و تحلیل نتایج از آمار توصیفی به صورت جدول، و برای انجام آمار استنباطی از آزمون تحلیل واریانس یک راهه (ANOVA) و آزمون تعیقبی Schefe

(شفه) با نرم افزار SPSS استفاده و نتایج به صورت جداول موردتحلیل قرار گرفتند. مرز معنی‌داری در P≤۰/۰۵ قرار داده شد. تمامی اصول «راهنمای اخلاقی پژوهش بر حیوانات» طبق کد اخلاق شماره ۸۴۹- ۱۳۹۵ رعایت گردیده است (۱۴).

نتایج

در تائید ژنوتیپ سوش سالمونلا تیفی موریم TA100، این سویه به علت فقدان نسبی سد لیپوپلی ساکارید در پوشش سطح باکتری، رنگ کریستال ویوله به داخل دیواره نفوذ کرده و باعث مرگ باکتری‌ها و تشکیل هاله‌های حدود ۱۴ میلی‌متر شد. مقاومت به آمپی‌سیلین به علت وجود پلاسمید PKM101 در سویه مورد آزمایش مشاهده شد. در قسمتی از پلیت حاوی باکتری TA100 که تحت تاثیر اشعه UV قرار گرفته بود، عدم رشد مشاهده گردید که نشان دهنده جهش uvrB بود (جدول ۱).

نتایج آزمایش با باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 نشان می‌دهد که با افزایش غلظت تریاک جهش‌زایی افزایش یافته و در رقت‌های ۰/۰۴ به بالا جهش‌زایی برای نمونه‌های تریاک صورت گرفت. سطح معنی‌داری در رقت ۰/۰۰۱ برای سه مرحله تست، اختلافی با کنترل منفی نداشت و نشان داد که آن غلظت نمی‌توانست جهش‌زا باشد، اما برای رقت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱۶ سطح معنی داری کمتر از میزان خطای ۰/۰۵ است که نشان بر جهش‌زا بودن تریاک دراین رقت‌ها است (جدول ۲).

جدول ۲، نتایج حاصل از مرحله دوم آزمایش که در حضور بافر S_9، همراه با پری انکوباسیون و بدون بافر S_9 ولی همراه با پری انکوباسیون انجام شد را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، هرچه حجم بیشتر شود جهش‌زایی هم افزایش می‌یابد. کلنی‌های به دست آمده با کلنی کنترل منفی مقایسه شده و نتایج در قسمت اختلاف میانگین شرح داده شده است، در صورتی که نمره اختلاف میانگین از ۲ بیشتر باشد جهش‌زایی وجود دارد. کلنی‌های هر حجم با کنترل منفی مقایسه شده است که به خوبی می‌توان جهش‌زایی را در حجم‌های ۰/۰۴ به بالا مشاهده کرد میانگین کلنی‌های با بافر برابر ۳۰۰/۲۸ و بدون بافر ۲۸۶ است با توجه به نتایج جدول ۳ مشاهده می شود که سطح معنی اختلاف میانگین بین سه گروه از کلنی های مورد نظر از نظر رقت های مختلف در سطح ۰/۰۵ معنی داری است (p<۰/۰۵ و p=۰/۰۰۱). نتایج آزمون تعقیبی در جدول ۴ نشان دهنده این است که سطح تغییرات در کلنی با بابافر S9 و پری انکوباسیون در سطح معنی داری ۰/۰۵ (p=۰/۰۰۱) بیشتر از کلنی های بافر S9 بدون پری انکوباسیون بدون بافر S9 است و کلنی بافر S9 بدون پری انکوباسیون کمتر از دو کلنی دیگر است (p=۰/۰۰۱).

جدول ۱: مشخصات ژنوتیپی سالمونلا تیفی موریوم TA100

سویه مورد آزمایش	جهش Rfa	پلاسمید PKM101	جهش UVrb
سالمونلاتیفی موریوم TA100	+	+	+

جدول ۲: میزان هاله کلنی‌های نمونه تریاک در سه مرحله با کنترل منفی

رقت‌های تریاک (g/ml)	تعداد کلنی			
	بابافر S_9 و پری انکوباسیون	بابافر S_9 بدون پری انکوباسیون	بدون بافر S_9	میانگین کلنی‌ها
۰/۰۰۱	۱۴۰	۱۳۰	۱۲۰	۱۳۰
۰/۰۱	۱۸۰	۱۷۰	۱۶۰	۱۷۰
۰/۰۲	۲۴۰	۲۳۰	۲۲۰	۲۳۰
۰/۰۴	۳۰۰	۲۹۰	۲۸۰	۲۹۰
۰/۰۸	۳۸۵	۳۷۵	۳۶۰	۳۷۳.۳
۰/۱۶	۴۴۰	۴۲۰	۴۰۰	۴۲۰

جدول ۳: آزمون ANOVA جهت بررسی اختلاف مجموع میانگین های جهش زایی کلنی ها در حضور رقت های مختلف تریاک

تریاک در رقت های مختلف	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	سطح معنی داری
بین گروه ها	۵۷۲/۶۷۶	۲	۲۸۶/۳۳۸	۱۱۶۶/۹۶۲	۰/۰۰۱
درون گروه ها	۰/۷۳۶	۳	۰/۲۴۵	-	-
مجموع	۵۷۳/۴۱۲	۵	-	-	-

جدول ۴: آزمون تعقیبی جهت اولویت بندی اختلاف میانگین کلنی ها بر اساس رقت تریاک

گروه (I)	گروه (J)	اختلال میانگین (I-J)	سطح معنی داری	ضریب اطمینان ۰/۹۵	
				حداقل نمره	حداکثر نمره
بابافر S_9 و پری انکوباسیون	بابافر S_9 بدون پری انکوباسیون	۲۳/۹۱۶۶*	۰/۰۰۱	۲۱/۷۵۱۶	۲۶/۰۸۱۸
	بدون بافر S_9	۱۱/۲۵*	۰/۰۰۱	۹/۰۸۴۹	۱۳/۴۱۵۱
بابافر S_9 بدون پری انکوباسیون	بابافر S_9 و پری انکوباسیون	-۲۳/۹۱۶۶*	۰/۰۰۱	-۲۶/۰۸۱۸	-۲۱/۷۵۱۶
	بدون بافر S_9	-۱۲/۶۶۶۶*	۰/۰۰۱	-۱۴/۸۳۱۸	-۱۰/۵۰۱۶
بدون بافر S_9	بابافر S_9 و پری انکوباسیون	-۱۱/۲۵۰۰*	۰/۰۰۱	-۱۳/۴۱۵۱	-۹/۰۸۴۹
	بابافر S_9 بدون پری انکوباسیون	-۱۲/۶۶۶۶*	۰/۰۰۱	۱۰/۵۰۱۶	۱۴/۸۳۱۸

* تایید اختلاف میانگین نمونه ها در سطح ۰/۰۵

بحث

در قرن حاضر یکی از علل مرگ و میر در جوامع امروزی سرطان می‌باشد. در دو دهه گذشته انواع متفاوتی از مواد جهش‌زا و سرطان‌زا شناخته شده اند. امروزه دانشمندان بر این عقیده اند که آسیب‌ها و تغییرات ژنتیکی اعم از تغییرات ایجاد شده در توالی و انسجام DNA، بروز جهش یا موتاسیون در ژن‌ها و دیگر تغییرات ژنتیکی در ساختار کروموزومی در سرطان‌زایی نقش بسزایی دارند. از این جهت طراحی روش‌هایی برای مشخص نمودن سرطان‌زایی مواد بسیار با اهمیت می‌باشد. امروزه روش ایمز جهت غربالگری و شناسایی مواد جهش‌زا و ضد جهشی از روش‌های متداول است (۹،۱۵،۱۶). کاربرد روش ایمز در این تحقیق به عنوان آزمونی استاندارد و دقیق جهت شناسایی جهش‌زایی تریاک می‌باشد. در این پژوهش جهش یافتگی سالمونلا TA100 با جدول پروفسور Ames که در سال ۱۹۹۴ بر اساس آخرین تحقیقات ارائه داده شده است هم‌سویی نشان داده و سوش‌ها تائید شدند. بر طبق نتایجی که ایمز و همکاران با بررسی بیش از ۳۰۰ نوع ماده شیمیایی داشتند این تئوری بیان گردید که در صورتی که تعداد کلنی‌ها بر روی محیط کشت ۲ برابر شاهد منفی باشند ماده جهش‌زا محسوب می‌شود. نتایج به دست آمده از این تحقیق بااین تئوری هم سویی و مطابقت دارد (۱۷). برخی از انواع مواد سرطان‌زا که در تست‌های قبلی منفی گزارش شده بود، با استفاده از سویه‌های آزماینده جدید و یا بهبود روش‌ها نتایج جدیدی را نشان داد (۱۸). Wakabayashi و همکاران در سال ۲۰۰۴ عنوان نمودند ترکیبات مختلف را بر اساس تعداد کلنی‌های برگشتی (برگشت از حالت جهش یافته به حالت وحشی) به ۴ گروه تقسیم کردند: جهش‌زای ضعیف (۵۰۰ کلنی برگشتی)، جهش‌زای متوسط (۲۵۰۰-۵۰۰ کلنی برگشتی)، جهش‌زای قوی (۵۰۰۰-۲۵۰۰ کلنی برگشتی) و جهش‌زای بسیار قوی (بیش از ۵۰۰۰ کلنی برگشتی) (۱۹). طبق مطالعه فوق هرچه تعداد کلنی‌های برگشتی بیشتر باشد نشان دهنده برگشت TA100 از حالت جهش یافته به حالت وحشی یا طبیعی است و این نشان‌دهنده جهش‌زا بودن ماده مورد آزمایش می‌باشد و اکثر مواد جهش‌زا،

سرطان‌زا هم می‌باشند. که در مطالعه حاضر با افزایش غلظت تریاک تعداد کلنی‌های برگشتی بیشتر شدند که نشان داد تریاک در غلظت‌های بالا می‌تواند جهش‌زا یا سرطانزا باشد. به دنبال نتایج حاصل از پژوهش‌های M.Kranendonk و همکاران سوش‌های سالمونلا تیفی موریوم TA104،TA97،TA100 و نیز سوش E.coli K12 جهت سنجش جهش‌زایی و سرطان‌زایی برخی از مواد شیمیایی مناسب هستند. آن‌ها با بررسی بر روی نقش آنزیم‌های ویژه درفعال سازی کارسینوژن‌ها و نیز فعال سازی ظرفیت‌هایشان اهمیت بسیار زیادی دارند (۱۱). بررسی‌های انجام شده در تحقیق حاضر بر روی جهش‌زایی تریاک نشان می‌دهد که در رقت‌های ۰/۰۱ تا ۰/۱۶ بیشترین میزان جهش‌زایی قابل مشاهده می‌باشد. میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی سالمونلا تیفی موریوم در عدم حضور میکروزوم کبد موش برای بررسی جهش‌زایی تریاک با رقت ۰/۱۶، ۴۰۰ و در حضور میکروزوم کبد موش ۴۴۰ کلنی گزارش شد. بنابر نتایج به دست آمده تریاک مورد آزمایش با حدود اطمینان ۹۹ درصد در رقت ۰/۱۶ جهش‌زا و سرطان‌زای قوی می‌باشد (P≤۰/۰۵). مهرابیان و همکاران در سال ۱۳۹۳ به بررسی خواص ضد سرطانی Artimaurmiana با استفاده از باکتری سالمونلا تیفی موریوم TA100 پرداختند. در این پژوهش بررسی دقیق اثر ضدجهش‌زائی عصاره‌های آرتمیای خشک، سیست و تخم دکپسوله پرداخته شد. و تعداد کلنی‌های برگشتی در سویه سالمونلاتیفی موریوم TA100 و درصد ممانعت از مواد جهش‌زا در مجاورت مواد ضد جهش وارد برنامه SPSS گردید و با استفاده از آزمون‌های آماری لون، اتوا، ولک و میزان واریانسی معنی‌داری معین شد و به این ترتیب در مواردی که (P≤۰/۰۵) بود همچنین فرض محقق مبنی بر تائید جهش‌زایی عصاره‌های آرتمیای خشک، سیست و تخم دکپسوله با تست ایمز تائید شد (۲۰). همچنین در سال ۲۰۱۵ و ۲۰۱۶ مطالعات متعددی در مورد اثر جهش زایی بتولین (Betulin) با استفاده از سالمونلا تیفی موریوم TA100 و تست ایمز انجام شد و مشخص گردید که این ماده نه تنها جهش زا یا سرطان‌زا نیست بلکه اثر ضد سرطان دارد و در آینده شاید بتوان به عنوان داروی ضد سرطان استفاده نمود. این مطالعات از نظر جدید بودن حائز اهمیت می‌باشند و به اعتبار تست ایمز جهت شناسایی موتاژن بودن مواد و در نتیجه به ارزش مطالعه حاضر می‌افزایند (۲۳-۲۱).

نتیجه‌گیری

با توجه به خاصیت جهش‌زایی تریاک، و همچنین با علم به اینکه هرماده جهش‌زایی می‌تواند سرطان‌زا باشد، لذا جهت حفظ سلامتی باید از مصرف این ماده خوداری یا حداقل مصرف آن به صورت خوراکی ممنوع باشد.

سپاسگزاری

از تمام افرادی که در مراحل انجام این مطالعه همکاری داشته اند، کمال تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

References:

1- Wessner DR, Maiorano PC, Kenyon J, Pillsbury R, Campbell AM. ***(Spot- over- lay Ames test of potential mutagens***, See in- formation in: http://www.zoo.utoronto.ca/able 2000;1-16.

2- Bertman G. Katzong. ***Basic and clinical pharmacology***. Mc Graw- HillCompanies Inc 2009; 6th ed. P: 531-68.

3- Kaplan, Sadock. ***Comprehensive text book of psychiatry***. Eighth ed. Philadelphia. Vol:2. USA: lippincot Williams, Wilkins 2010; 1265-91.

4- Shahramian I, Kohan F, Moradi A. ***Opioids in pediatric***. Opioid history, first Ed, Golban press, 2004: 1-3, 80.

5- Shirazi EM. ***Efionieh Thesis***.1nd Ed. Tehran: Almaa; 2009; 134,142,146,149. [Persian]

6- Hallinan R, Byrne A, Agho K, McMahon C, Tynan P, Attia J. ***Erectile dysfunction in men receiving methadone and buprenorphine maintenance treatment.*** J sexual med 2008; 5: 684-92.

7- Maron DM, Ames BN. ***Revised methods for the Salmonella mutagenicity test***. Mut. Res 1983; 113: 173- 212.

8- Emtiazjo M. Mutagenic and carcinogenic effects of three additives compounds to crude oil of Persian Gulf by salmonella mutagenicity test [dissertation].Tehran Uni; 2007.

9- The study of mutagenic and carcinogenic effect of heavy and light polyethylene using Salmonella typhimurium TA100, TA97, TA104 and microsomes. Hakim Res J 2004; 24(1): 45-51. [Persian]

10- Bathini M, Goto S, Tian H, Ando F, Fukuhara M, Watanabe I. ***Mutagenicity of 1,3-Butadiene, 1,4-Pentadiene -3- ol, Isoprene, 2,4- Hexadiene, cis and trans- piprylene, Envi- ron***. Health Perspect 2002; 3: 73-78.

11- Dorothy M, Ames BN. ***Revised meth-ods for the salmonella mutagenicity test.*** Mu-tat Res 1983; 113:173- 216.

12- Mortelmans K, Zeiger E. ***The Ames salmonella/microsome mutagenicity assay*** Mutat Res 2000; 455: 29-60.

13- Mccann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. ***Detection of carcinogens in the Salmo-nella/ microsometest. Assay of 300 chemicals***. Proc NatL Acad Sci USA 1975; 72: 5135- 5139.

14. Animal Care and Ethics committee, Islamic Azad University, Boroujerd Branch, Iran, 2012. Available from: http://www.iaub.ac.ir/English/ANIMALCAREANDETHICS.pdf

15- Berg K. Braun C. Krug I. Schrenk D. ***Evaluation of the cytotoxic and mutagenic potential of three ginkgolic acids.*** Toxicology 2015; 327, 47–52.

16- Berg K, Bischoff R, Stegmüller S, Cartus A, Schrenk D. ***Comparative investigation of the mutagenicity of propenylic and allylic asarone isomers in the Ames fluctuation assay***. Mutagenesis 2016; 31:443–451.

17- Ames BN. ***Method for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/ mammalin microsome mutagenicity test***. Mutat Res 1976; 31; 347-349.

18- http://tuberose.com/Teflon.html(2006).

19- Wakabayashi K, Watanabe T, Ohe T. ***Mutagens in surface water: a review.*** Muta-sion Res 2004; 567(2-3): 109-149.

20- Mehrabian S, Majd A, Kheiri A, Joniubi PA. ***Study of the antimutagenic effects of different extracts of Aloe vera leaf gel and latex using Ames test***. Arak Med Uni J 2012; 15(2):100-106.

21- Ferraz MC, de Oliveira JL, de Oliveira Junior JR, Cogo JC, Dos Santos MG, Franco LM, et al. ***The triterpenoid betulin protects against the neuromuscular effects of bothrops jararacussu snake venom in vivo***. Evid Based Complement Alternat Med 2015; 2015: 939523.

22- Krol SK, Kielbus M, Rivero-Muller A, Stepulak A. ***Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent.*** Biomed Res Int 2015; 2015: 584189.

23- Yoshida EH, Tribuiani N, Sabadim G, Neto Moreno DA, Varanda EA, and Franco YO. ***Evaluation of Betulin Mutagenicity by Salmonella/Microsome Test***. Adv Pharm Bull 2016; 6(3): 443–447.

Evaluation of Mutagenicity and Carcinogenicity of Opium Using the Ames Test

Mahnaz Mottaghi [1], Kyumars Safinejad *[2], Hassan Mohammad Asghari [3]

[1] Graduate Master in Microbiology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran
[2] Molcular Genetics, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran
[3] Microbiology, Borujerd Branch, Islamic Azad University, Borujerd, Iran

Received: 24 Jul 2017 **Accepted:** 12 Oct 2017

Abstract

Introduction: Cancer is one of the most common diseases in the world. Due to the carcinogenic combinations of drug, there is a risk of mutagenic substances in consumers. The aim of this study was to investigate the mutagenicity of opium by the Ames test.

Methods: Firstly, the purity of the Salmonella typhimurium strain TA100 was confirmed in terms of purity of mutagenic properties. Then, samples of opium were prepared separately in different volumes and by various repetitions and were added to the culture medium containing TA100 fresh night culture, after that subsequently were compared with negative control (distilled water+ TA100) samples. In that case, colonies were evaluated in terms of mutagenicity in three stages: without the buffer microsomal rat liver (S_9) -without pre incubation, with S_9– with pre incubation and with S_9- without pre incubation. The colonies were evaluated by counting revertant TA100 colonies number. The results were analyzed using ANOVA and Schefe's post hoc test to determine and prioritize the difference in mean of groups based on opium dilution.

Results: Results of data analysis and counting of revertant coloniesshowed that opium had mutagenic effect in over 4% dilution. There were significant differences in dilution and repetition of without S_9- without pre incubation, with S_9- with pre incubation and with S_9 without pre incubation compared to the negative controls.

Conclusion: The results of this research showed that opium is fully and on all volumes has mutagenic effect. Therefore, we recommend taking these drugs should be avoided.

Keywords: Ames test, Mutagenesis, Opium, Cancer, Salmonella typhimurium, TA100

This paper should be cited as:
Mottaghi M, Safinejad K, Mohammad Asghari H. **Evaluation Of Mutagenicity And Carcinogenicity Of Opium Using The Ames Test.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2017; 25(9): 728-35.

***Corresponding author: Tel: 09121510731, email: q_safinejad@yahoo.com**