التأثير المضاد للتطفير للجزر *Daucus carota* في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين في الانظمة البكترية

الهام عبد الهادي خلف زهرة محمود الخفاجي *
معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق
* العنوان الحالي : قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة الموصل / العراق .

الخلاصة

استعمل نظام G – system المكون من ثلاث سلالات مختلفة G3 (*Bacillus* spp) و G12 (*Arthrobacter* spp) و G27 (*Brevibacterium* spp) الموجبة لصبغة كرام وحساسة لصبغة البلور البنفسجي ، وكذلك حساسة لتركيز ١٠ مايكروغرام / مللتر من المضاد الحيوي الستربتومايسين و ٢٠ مايكروغرام / مللتر الريفامبيسين (واسمات كروموسومية) . استعملت السلالات لدراسة القابلية التطفيرية لعصير الجزر وكذلك القابلية المضادة للتطفير . درس تاثير عصير الجزر بتراكيز مختلفة (٥٠ و ١٠٠ و٢٠٠) مايكرولتر / مللتر من عالق البكتريا النامية الى الطور اللوغارتمي في دارىء الفوسفات . وكذلك تأثير العقار Cyclophosphamide (Cp) بتراكيز ١و ١٠ و ٥٠ و ١٠٠ مايكروغرام / مللتر من عالق الخلايا ، على السمية الخلوية للخلايا بحساب معامل البقاء Survival index (Sx) والسمية الوراثية بحساب تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين . أوضحت النتائج التي تم الحصول عليها ان التراكيز الواطئة (المستعملة) وهي ٥٠ و ١٠٠ مايكرولتر من عصير الجزر غير مؤثرة على السلالات سواء من ناحية السمية الخلوية او الوراثية ، اما التركيز ٢٠٠ مايكرولتر فقد اظهر فعالية ضعيفة من ناحية السمية الخلوية والوراثية . اختير التركيز ١٠٠ مايكرولتر لدراسة التداخل مع المطفر Cp (٥٠ مايكروغرام / مللتر) الذي أوضحت النتائج ان له سمية خلوية حيث تناقص معامل البقاء وزاد تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين المحثوثة . درس التداخل بمعاملات مختلفة (استعمال العصير مع المطفر او بعده او قبله) لمعاملة الخلايا وأظهرت النتائج التأثير الواقي لعصير الجزر تجاه السمية الخلوية وكذلك في إخماد حث الطفرات المقاومة للمضادات الحيوية ، حيث وفر حماية تجاه السمية الوراثية تراوحت بين ٨٠ – ١٠٠ % .

المقدمة

أدت زيادة الملوثات في البيئة نتيجة الفعاليات الإنسانية في مجالات الصناعة وغيرها الى إحداث مشاكل صحية للإنسان ، ومعظم الملوثات هي مركبات مطفرة للمواد الوراثية (McCann وآخرون ، ١٩٧٥) ، اذ تشير العديد من الدراسات الى ان حوالي ٨٥ % من المواد المسرطنة (Carcinogens) هي مواد مطفرة (Kier واخرون ، ١٩٨٦) .

وللأغذية النباتية دور في تثبيط فعل المواد المطفرة والمسرطنة ، فالدراسات الوبائية الواسعة تشير الى ان نسبة السرطانات في المجتمعات ذات التغذية النباتية اقل مقارنة بالمجتمعات الأقل استخداما للنباتات في غذائها اليومي (Kotake – Nara وآخرون ، ٢٠٠١) . والغذاء نظام معقد يمكن ان يحوي على المواد المضادة للتطفير والتسرطن فضلا عن احتواؤه على بعض المطفرات والمسرطنات ، ودلت بعض الدراسات الى انه يمكن ان يحث ٣٠ – ٤٠ % من السرطانات في الإنسان (Knudsen ، ١٩٨٦) ، لذلك انصبت الجهود لتحديد المواد المطفرة والمسرطنة ومضاداتها باستعمال أنظمة حيوية مختلفة سواء خارج الجسم الحي *In vivo* او داخل الأنظمة الحية *In vitro* . وتشمل الأنظمة المستعملة للكشف عن المواد المطفرة والمسرطنة ومضاداتها أنظمة قصيرة الأمد وهي الأسهل وتستعمل خارج الجسم الحي او داخله (Stich و San ، ١٩٨١) ، ومنها استعمال الحشرات او مزار خلايا اللبائن المشتقة من أعضاء مختلفة او استعمال الفطريات او الخمائر مثل *Saccharomyces cerevisiae* او *Schizosaccharomyces pombe* كأنظمة إحياء مجهرية حقيقية النواة ، وكذلك استعمال البكتريا كأحياء بدائية النواة (Stich و San ، ١٩٨١) .

مستل من رسالة ماجستير للباحثة الاولى
تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٧/١١/١٩ وقبوله في ٢٠٠٨/١/٣٠

ومن انظمة البكتريا المستعملة للكشف عن المطفرات والمسرطنات او المواد المضادة لها بكثرة هو نظام ايمس (Ames system) ، استنادا الى ان تحول الخلايا من الحالة الطبيعية الى حالة التسرطن تكون ناتجة عن تغيير جيني (طفرة) تؤدي الى تغيير الصفات الموروثة التي تسيطر على نمو الخلايا (Kada واخرون ، ١٩٨٦) . ومن الانظمة البكترية الاخرى نظام G- system الذي يعتمد على إحداث طفرات مباشرة Forward بدلا من الطفرات الراجعة المستخدمة في الأنظمة أعلاه (العزاوي ، ٢٠٠٤) . ويضم النظام ثلاث سلالات تعود لأجناس مختلفة G3 (*Bacillus* spp) G12 (*Arthrobacter* spp) و G27 (*Brevibacterium* spp) وكلها تتصف بكونها موجبة لصبغة كرام وحساسة لصبغة البلور البنفسجي وكذلك حساسة للستربتومايسين بتركيز ١٠ مايكروغرام / مللتر و ٢٠ مايكروغرام / مللتر الريفامبيسين (واسمات كروموسومية) وقد استعملت لإيجاد القابلية التطفيرية لبعض المطفرات القياسية والكشف عن بعض المواد . ومن جهة ثانية فان معظم المواد العضوية المسرطنة هي مواد مطفرة اذ يمكن ان ترتبط تساهميا الى DNA او تقلل من انسيابية تضاعف DNA ، ويعد مركب Cyclophosphamide (Cp) من المواد المطفرة القياسية (Stich و San ، ١٩٨١) ، ويستعمل في علاج بعض السرطانات كونه من مثبطات انقسام الخلايا Cytostatic والمركب من المواد السامة وراثيا Genotoxic خاصة بعد ان يتعرض للعمليات الايضية داخل الجسم (Hales ، ١٩٨٢ و Ghaskadbi واخرون ، ١٩٩٢) ، ولذلك يكون مطفرا في *typhimurium* *S.* و *E. coli* عند استعمال نظام التنشيط اللبائني S_9 (Stich و San ، ١٩٨١) . ومن الأغذية الحاوية على المواد المضادة للتطفير الجزر Carrot (*Daucus carota*) الذي يعود الى العائلة الخيمية Umbelliferae الذي تحتوي جذوره على العديد من المواد الفعالة (الزركاني ١٩٩٩) . وقد استهدفت الدراسة الحالية دراسة تأثير عصير الجزر على حث الطفرات في سلالات G-system وتأثيره المضاد للتطفير .

مواد البحث وطرائقه

السلالات البكترية المستعملة : G3 (*Bacillus* spp) و G12 (*Arthrobacter* spp) و G27 (*Brevibacterium* spp) من معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد ، والسلالات حساسة لتركيز ١٠ مايكروغرام / مللتر من المضاد الحيوي الستربتومايسين و ٢٠ مايكروغرام / مللتر الريفامبيسين وحساسة للبلور البنفسجي Crystal violet .

الأوساط الغذائية :

المرق المغذي Nutrient broth (شركة England / Mast) : حضر وفق إرشادات الشركة المنتجة .

وسط أكار أساس الدم Blood base agar (شركة England / Mast)، حضر وفق إرشادات الشركة المنتجة ودون إضافة الدم (Hedges وآخرون ، ١٩٧٨) .

ماء البيبتون : حضر باذابة ١و. غم من البيبتون (شركة England / Mast) في ١٠٠ مللتر من الماء المقطرواستعمل في تخفيف المزار البكترية .

محلول دارىء الفوسفات Phsphate buffer (PBS) : حضر برقم هيدروجيني ٥.٥ باستعمال محلول عياري من حامض الهيدروكلوريك HCl ، استعمل في إجراء عمليات التطفير وغسل الخلايا (Hudson و Hay ١٩٨٠) .

تحديد العد العيوشي Viable count : تم وفق الطرق المتبعة (Harrigan و McCance ١٩٧٦) .

تحضير عصير النبات : اتبعت طريقة Lai واخرون (١٩٨٠) مع بعض التحوير وكالاتي :

تم اخذ ١٠٠ غرام من جذور الجزر المغسولة بماء الحنفية لإزالةالأوسا والأتربة ، ثم هرست مبدئيا ثم وضعت في الخلاط الكهربائي Blender (شركة China / Moulinet) لمدة ٣ دقائق على السرعة المتوسطة ، رشح الناتج خلال طبقات من الشاش الطبي ، ثم تم ترويق العصير بالطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة ، عقم النموذج بالترشيح باستخدام مرشحات غشائية (0.22µm Millipore filter) ، وكان الناتج ٢٠ مللتر من العصير الذي استعمل طازجا في التجارب . **محلول عقار Cyclophosphamide (Cp)** : حضر محلول خزين بإذابة ٥٠ ملغم في ١٠ مللتر من الماء المقطر المعقم ، واستعمل المحلول لتحضير التراكيز المختلفة .

محاليل المضادات الحيوية : الستربتومايسين (Streptomycin sulphate) (شركة Ajanta India /) والريفامبيسين (Rifampcin) (شركة الأدوية / سامراء SDI) حضرت محاليل خزينة Stock solutions في الماء المقطر المعقم . الاول بتركيز ١٠٠ ملغم/ مللتر والثاني ٢٠ ملغم / مللتر ، وحفظت في الثلاجة لحين الحاجة خلال مدةأسبو لتحضير التراكيز المطلوبة .

دراسة تاثير عصير الجزر و Cp على السلالات البكترية : تم باستعمال الطريقة المستعملة في معهد الهندسة الوراثية (العزاوي ،٢٠٠٤) .

اما دراسة التداخل بين العصير النباتي والمطفر Cp فقد تم بثلاث معاملات :

المعاملة الاولى : عوملت الخلايا بعصير الجزر بتركيز ١٠٠ مايكرولتر / مللتر من عالق الخلايا (باعتباره التركيز الملائم) لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧° م ، ثم غسلت الخلايا بمحلول PBS وعلقت بالمحلول نفسه وأضيف المطفر Cp بتركيز ٥٠ مايكروغرام / مللتر (التركيز الملائم) وحضنت لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ٣٧° م ، بعدها فصلت الخلايا وغسلت بالمحلول PBS ، وسميت المعاملة (Ca/Cp) .

المعاملة الثانية : وفيها تم معاملة الخلايا بالمطفر أولا ثم بعصير النبات ثانيا وسميت (Cp/Ca)

المعاملة الثالثة : معاملة الخلايا بعصير النبات مع المطفر (Ca+Cp) وفيها تم مزج المطفرCp مع العصير النباتي وحضنت النماذج بدرجة حرارة ٣٧° م لمدة ٣ ساعات قبل الاستعمال (الربيعي ، ٢٠٠٠)، ثم استعملت المحاليل الناتجة في معاملة الخلايا لمدة ١٥ دقيقة بدرجة حرارة ٣٧° م ، ومن ثم فصلت الخلايا وغسلت .

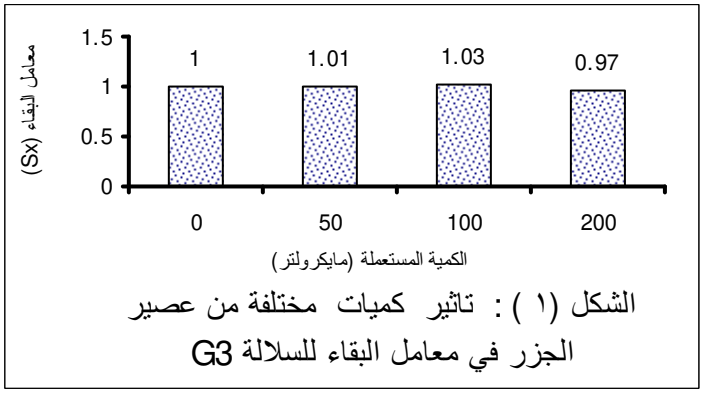
في جميع التجارب أعلاه وبعد فصل وغسل الخلايا تعلق الأخيرة في ٥ مللتر من وسط المرق المغذي ويحدد العد العيوشي لها ، ثم تحضن لليوم الثاني بدرجة حرارة ٣٧° م للتعبير الظاهري عن الطفرات ، اذ يحدد العدد الحي وعدد الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين (Miller و Miller، ١٩٧٢) .

كررت التجارب أعلاه ثلاث مرات (وبثلاث مكررات) وتم اخذ معدلات القيم في الحسابات .

التحليل الإحصائي والحسابات : تم تحديد معامل البقاء Survival index (Sx) وتردد الطفرات Mutant frequency (Mx) (Eckardt وHaynes ، ١٩٨١) . اختبرت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار دانكن متعدد الحدود (Duncan ، ١٩٥٥) .

النتائج والمناقشة

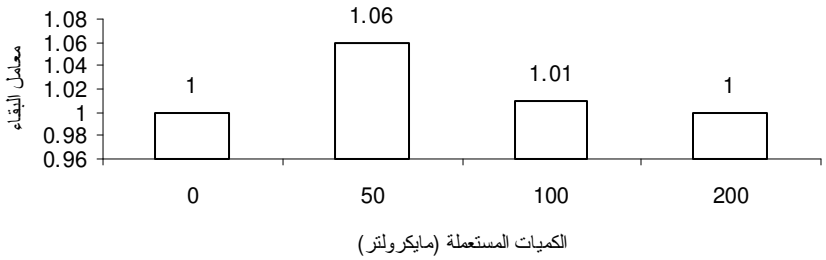
تستعمل الأنظمة البكترية للفحوص قصيرة الأمد للكشف عن المطفرات ومضاداتها ، وجميع الأحياء تتكون مادتها الوراثية من أشرطة مزدوجة وبتكرار محدد من القواعد النتروجينية لذا فأن أي كائن حي يمكن ان يستعمل لتحديد المطفرات (Ames ،١٩٧١) . كما ان الأنظمة البكترية تستعمل للتزويد بالمعلومات حول المواد السامة التي لا يمكن الكشف عنها في الأنظمة الحيوانية (Haroun و Ames ، ١٩٨١) . ومن المعروف ان التأثير المطفر يحدث بتراكيز اقل من التراكيز السامة ، ويمثل معامل البقاء Sx احد المؤشرات المهمة الدالة عليه وتوضح الاشكال ١و ٢ و ٣ معامل البقاء للسلالات G3, G12 , G27 على التوالي عند استعمال كميات متزايدة من عصير الجزر .



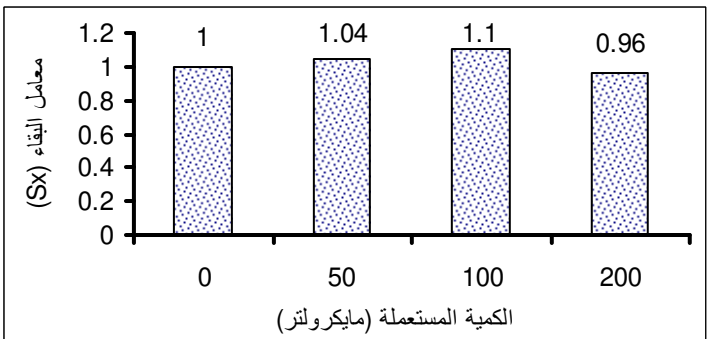
الشكل (١) : تاثير كميات مختلفة من عصير الجزر في معامل البقاء للسلالة G3

وتحدد قيم معامل البقاء مبدئيا لإعطاء فكرة عن القابلية التطفيرية للمواد وقد استعمل عصير النبات بكميات ٥٠ و ١٠٠ و ٢٠٠ مايكرولتر / مللتر

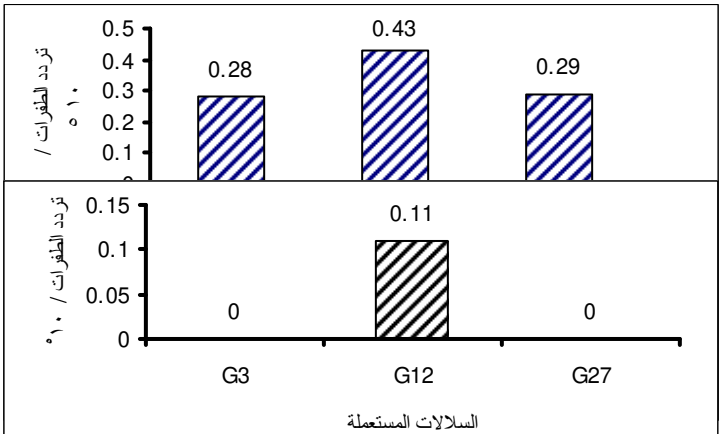
من عالق الخلايا المأخوذة من الطور اللوغارتيمي (العزاوي ، ٢٠٠٤) . وقد حددت قيم المعامل بين ٠.٩٦ – ١.٠ للمواد غير المطفرة ، والقيم ٠.٨٦ – ٠.٩٥ للمطفرات الضعيفة ، أما القيم الأقل من ٠.٨٥ فتعد مواد مطفرة (Leifer واخرون ، ١٩٨١) ، بينما تصبح المادة سامة فيما اذا أعطت معامل بقاء قيمته ٠.٥ (Haroun و Ames ، ١٩٨١) . ويلاحظ ان الكميات المستعملة لم تؤد الى خفض القيم عن الحدود الحرجة وان كان التركيز الاعلى المستعمل (٢٠٠ مايكرولتر) قد اثر بعض الشيء في السلالات G3 , G27 وأعطى قيم ٠.٩٧ و ٠.٩٦ على التوالي لذلك تمت دراسة تأثيره على حث الطفرات وذلك لان معامل البقاء وان كان يعطي مؤشرا لعمليات التطفير إلا انه لا يحل محل فحص التطفير وإنما يكون مكملا له لذلك ينصح بدراسته قبل فحص التطفير (Green و Tweast ، ١٩٨١، Leifer واخرون ، ١٩٨١) . ويوضح الشكل (٤) تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين للسلالات الثلاث والشكل (٥) للطفرات المقاومة للريفامبيسين .



الشكل (٢) : تاثير كميات مختلفة من عصير الجزر في معامل بقاء السلالة G12



الشكل (٣) : تاثير كميات مختلفة من عصير الجزر في معامل البقاء للسلالة G27



الشكل (٥) : تاثير ٢٠٠ مايكرولتر من المستخلص في حث الطفرات المقاومة للريفامبيسين في السلالات الثلاثة

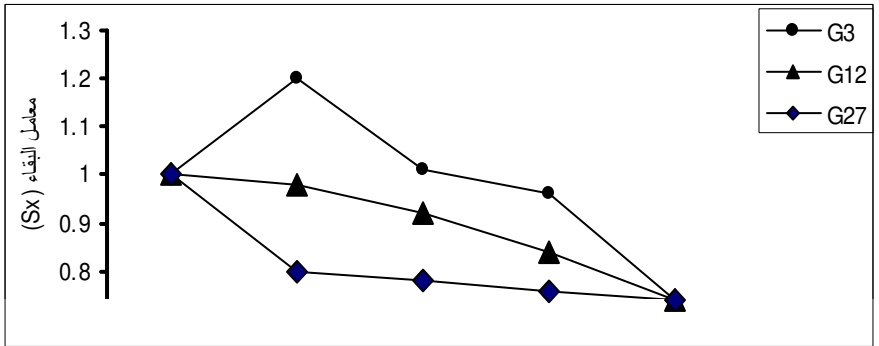
، ١٩٨١) وظهور الطفرات . اما المركب Cp فقد درس تأثيره السام للخلايا Cytotoxicity بحساب معامل البقاء ، وحساب تردد الطفرات مؤشرا للسمية الوراثية Genotoxicity . ويوضح الشكل (٦) تاثير المطفر بتراكيز ١و ١٠ و ٥٠ و ١٠٠ مايكروغرام / مللتر في معامل بقاء السلالات (والتراكيز تم اختيارها وفق تجارب اولية) .

اما الشكلان (٧و ٨) فتوضحان التأثير المطفر للمركب Cp في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبيسين على التوالي .

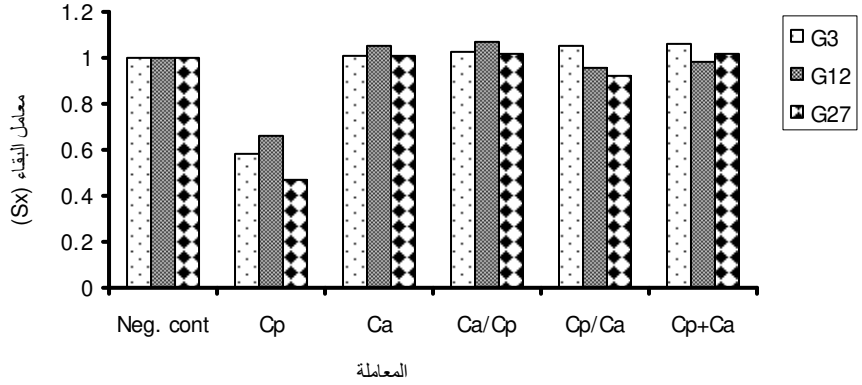
ويلاحظ ان للمركب Cp تأثيرا مطفرا اذ أدى الى زيادة في تردد الطفرات مع زيادة التركيز والتي تعد من اهم المؤشرات لاعتبار المادة مطفرة أي ان هناك ما يسمى Dose – response curve (Eckardt وHaynes ، ١٩٨١) ، ويعد Cp من المطفرات القياسية في البكتريا *Salmonella typhimurium* (Haroun و Ames ، ١٩٨١) .

ومن المشاكل المهمة التي تعاني منها أنظمة الفحوص قصيرة الأمد مثل فحص ايمس او Bridges او نظام استعمال بكتريا *B. subtilis* ان المواد المطفرة تخلط مع الوسط الغذائي الصلب الذي يجرى فيه الفحص وفي هذه الحالة ستكون الخلايا في تماس مستمر مع المواد والتي يمكن ان تؤثر على النتائج ، كما يمكن ان تتفاعل المواد مع مكونات الوسط ومادة الاكر (Bartsch وآخرون، ١٩٧٦) . وفي التجارب اعلاه والتجارب اللاحقة لهذه الدراسة تم معاملة الخلايا في محيط سائل خالي من المواد التي تسبب التداخل (أي استعمال PBS) ثم غسل الخلايا لإزالة بقايا التأثير ، وذلك لان ملامسة المادة في السائل للخلايا لمدة محدودة هي الأفضل للكشف عن المواد التي تؤثر على DNA وليس مشتقاتها او متأيضاتها وهذا يعني ان هناك عملية تعرض واحدة ، ولذلك فان التحري عن المواد باستعمال الأطباق يعتريه النقص ولا يصلح للعمل الروتيني ، وقد طورت طريقة الأطباق الى استعمال عملية تعليق الخلايا في السائل حيث تحضن الخلايا البكترية لمدة ٢٠ – ٣٠ دقيقة مع المواد المراد الكشف عنها قبل استعمالها في الأطباق ، وبهذه الطريقة تم الكشف عن العديد من المواد التي تعطي نتائج سالبة او تكون ضعيفة التطفير بطريقة الاطباق ولكنها أظهرت نتائج موجبة عند استعمال طريقة التطفير بالسائل التي هي أكثر كفاءة (Yahagi وآخرون ، ١٩٧٧) .

كما ان زيادة نضوحية الخلايا عند الحدود الخارجية تزيد من الحساسية لذلك فان سلالات ايمس قد طورت باستعمال طفرات *rfa* للتقليل من منع دخول المواد الى داخل الخلايا بواسطة الأغشية الخارجية للبكتريا السالبة لصبغة كرام (Kier واخرون ، ١٩٨٦) ، اما السلالات المستعملة في الدراسة الحالية فهي موجبة لصبغة كرام وبذلك تم تجاوز مشكلة النضوحية ، وتعد مشكلة النضوحية مهمة بالنسبة للمواد التي تحتاج الى تنشيط ايضي (Green و Tweast ، ١٩٨١) .



وعلى ضوء التجارب أعلاه تم اختيار التركيز ٥٠ مايكروغرام / مللتر من المطفر Cp والكمية ١٠٠ مايكرولتر من عصير الجزر كتراكيز ملائمة لدراسة التداخل بين العصير والمطفر في حماية الخلايا من القتل وحمايتها من حصول عملية التطفير . ويوضح الشكل (٩) تاثير كل من Cp وعصير الجزر وتداخلهما على معامل البقاء مثل استعمال الجزر لمعاملة الخلايا قبل استعمال المطفر (Ca/Cp) واستعمال العصير بعد معاملة الخلايا بالمطفر (Cp/Ca) واستعمال العصير مع المطفر (Ca+Cp) مقارنة بالسيطرة السالبة وهي دون اضافة أي من المواد .



الشكل (٩) : تاثير التداخلات المختلفة في معامل البقاء لسلالات الاختبار

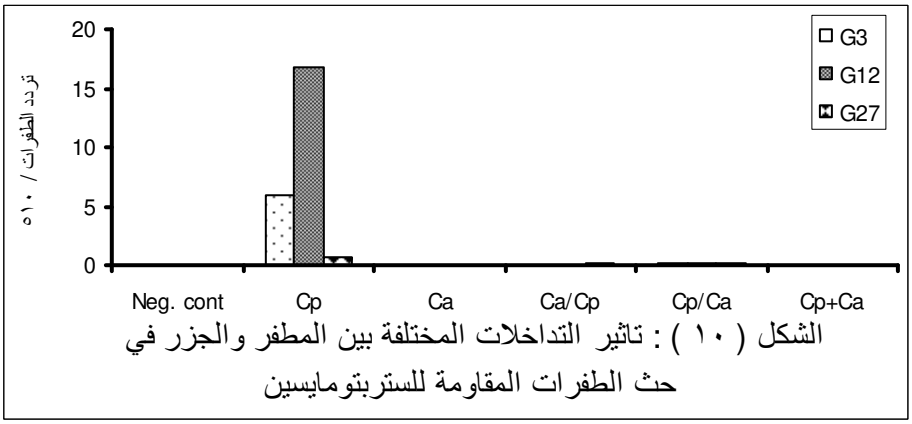
ويلاحظ ان المطفر قد ادى الى انخفاض معامل البقاء للسلالات الثلاثة بفروق معنوية عن الحالة الطبيعية (السيطرة السالبة) ، وتظهر نتائج التداخلات ان التأثيرات لم تكن ذات فروق معنوية عن السيطرة السالبة عند استعمال عصير الجزر لوحده بينما كانت الفروق معنوية عند المقارنة بالمطفر .

اما تأثير التداخلات اعلاه في حث الطفرات في السلالات الثلاث بالنسبة للطفرات المقاومة للستربتومايسين موضحة في الشكل (١٠) والطفرات المقاومة للريفامبيسين موضحة في الشكل (١١).

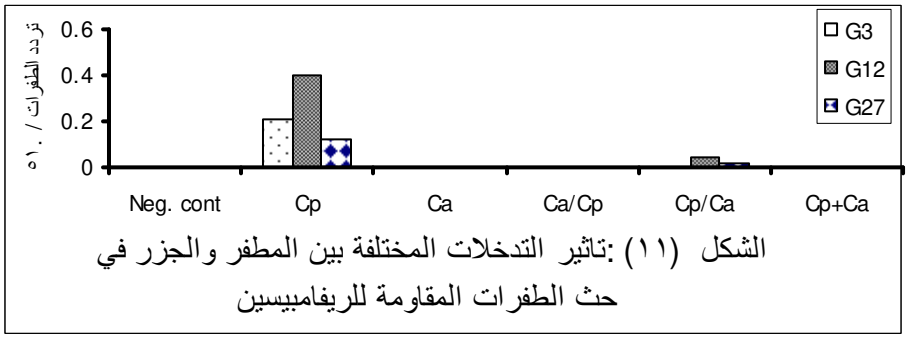
ويتضح من النتائج اعلاه ان المطفر Cp اثر في حث الطفرات وقتل الخلايا ولكن ليس بصورة متوازية لان عمليات القتل والتطفير هي عمليات غير معتمدة على بعضها وان كانت عمليات القتل تعطي مؤشرا ما لعمليات التطقير الا ان الأولى لا تحل محل عملية التطفير بل تعد دراستها مكملة كما ذكر انفا (Leifer واخرون ، ١٩٨١) . ويتضح ان عصير الجزر قد حمى الخلايا من التطفير بكافة المعاملات ولكن بدرجات متفاوتة ونتائج حماية الخلايا من حيث حث طفرات الستربتومايسين موضحة في الشكل (١٢) وطفرات الريفامبيسين في الشكل (١٣) .

وقد انفرد الجزر لوحده او مع المطفر في توفير الحماية الكاملة (١٠٠%) سواء بالنسبة لطفرات مقاومة الستربتومايسين او الريفامبيسين ولكنه لم يوفر مثل هذه الحماية لسلالة G27 عند استعماله قبل المطفر وان كانت الطفرات المستحثة اقل من حالة استعمال المطفر لوحده ، وكانت أكثر السلالات استجابة لوجود العصير النباتي وتجاوز تأثير المطفر هي السلالة G3 .

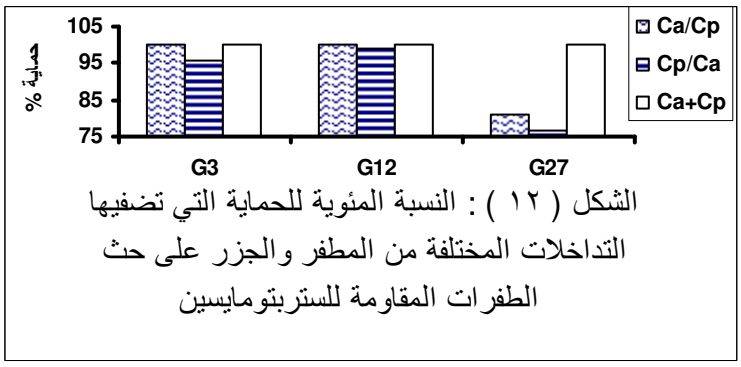
والمواد المضادة للتطفير والتي يمكن الكشف عنها باستعمال الأنظمة قصيرة الأمد صنفت الى مضادات تطفير مباشرة Desmutagens وهي التي توقف عمل المطفر او طلائعه قبل إحداث الضرر في المادة الوراثية ولذلك فان اغلبها تعمل خارج الخلايا (Kada واخرون ، ١٩٨٦) . اما الصنف الثاني هو مثبطات التطفير الحيوية Bioantimutagens وتعمل على حماية المادة الوراثية بمنع تثبيت الطفرات وبالتالي تعمل على الحد من ضرر المطفر بعد إصابة المادة الوراثية أي يكون عملها داخل الخلايا الحية (Bronzetti ، ١٩٩٧). ويمكن ان تعمل المواد المضادة للتطفير بعدة آليات مثل كسح الجذور الفعالة (Free radicals scavengers)المتولدة نتيجة للتعرض للإشعا او كونها نواتج عرضية للعمليات الايضية او الدفاعية العالية والتي تم تجنبها في الدراسة الحالية عند اختيار التراكيز الملائمة بتجارب أولية.



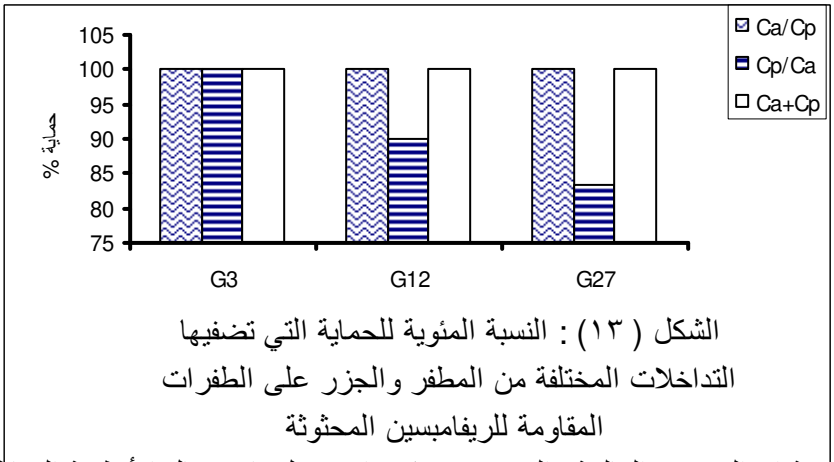
الشكل (١٠) : تاثير التداخلات المختلفة بين المطفر والجزر في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين



الشكل (١١) :تاثير التدخلات المختلفة بين المطفر والجزر في حث الطفرات المقاومة للريفامبيسين



الشكل (١٢) : النسبة المئوية للحماية التي تضفيها التداخلات المختلفة من المطفر والجزر على حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين



الشكل (١٣) : النسبة المئوية للحماية التي تضفيها التداخلات المختلفة من المطفر والجزر على الطفرات المقاومة للريفامبسين المحثوثة

الحقيقة ان الجر العالية والمستمرة يمكن ان تعدل باستعمال الأنظمة السائلة (Haroun و Ames ، ١٩٨١) والذي استعمل في الدراسة الحالية كما ذكر اعلاه . ويمكن لعصيرالجزر ان يعمل كمضاد للمطفرات الحيوية Bioantimutagens داخل الانظمة الحيوية نظرا لاحتوائه على عدد من المركبات مثل D- limonene الذي يعد من المحفزات لإنزيم Glutathion – S – transferase (Lam واخرون ، ١٩٩٤) .

والعوامل المحورة للتطفير يمكن الكشف عنها في البكتريا كما في استعمال الكشف عن المواد المضادة للأكسدة والفيتامينات والمضافات الغذائية ، وقد عدت نسبة التثبيط ٢٠ % لعملية التطفير غير مهمة (Rosin ، ١٩٨١) ، وهناك علاقة وثيقة بين المواد المسرطنة والمطفرة التي تظهرها بكتريا *Salmonella* وتستخدم بشكل رئيس للكشف عن المواد التي تتفاعل مع DNA وهذه تعد مطفرة في البكتريا المذكورة ولذلك تستعمل للكشف عن المسرطنات من المواد غير المستعملة او المعروفة سابقا ، وتصل العلاقة بين التطفير بـ *Salmonella* وتوليد السرطانات الى ٧٠ – ٩٠ % (McCann واخرون ، ١٩٧٥) ولكن هذه قد تكون لصنف معين او محدد من المواد الكيمائية ، فمثلا المواد التي تؤدي الى العقم هي مطفرات بكترية بشكل عام (Prival واخرون ، ١٩٧٧) لذلك تجرى لها فحوص قصيرة الأمد قبل استعمالها في تجارب الحيوانات ، ولكن بعض الهرمونات او المواد التي تؤثر على الهيكل الخلوي مثل Microtubules يمكن ان تؤدي الى اضطراب الانقسام الخلوي ولكنها لا تتفاعل مع DNA لذلك لا يمكن الكشف عنها بفحوص التطفير البكترية (Haroun و Ames ، ١٩٨١) . وهناك اكثر من ٣٠ فحص قصير الأمد للكشف عن المواد الكيماوية المسرطنة (Anon ، ١٩٧٨) ولكن لا يوجد نظام واحد يمكن ان يكشف عن كل المطفرات او المسرطنات ، كما ان العديد من المطفرات لا تبدو مسرطنة في الحيوانات وكذلك توجد العديد من المواد المسرطنة التي لا تحث الطفرات في الأنظمة قصيرة الأمد ، لذلك توصي الجهات المختصة مثل منظمة الصحة العالمية (WHO ، ١٩٩٣)باستعمال مجموعة من الفحوص سواء داخل الانظمة الحية او خارجها ومن النو القصيرة والطويلة الامد للكشف عن المواد ، وقد وضعت عدة شروط ومحددات لاعتبار المواد مطفرة (Kier واخرون ، ١٩٨٦) .

ANTIMUTAGENIC EFFECT OF CARROT (*Daucus carota*) ON INDUCTION OF STREPTOMYCIN AND RIFAMPICIN RESISTANT MUTANTS IN BACTERIAL SYSTEMS

Ilham A. Khalaf Zahra M. Al-Khafaji*
Institute of Genetic Engineering & Biotechnology for Postgraduate Studies / University of Baghdad / IRAQ .
* Present address : Dept. of Food Science / University of Mosul / IRAQ.

ABSTRACT

G-system was used to study the cytotoxicity and genotoxicity of carrot root juice. The system composed of three bacterial strains: G3 (*Bacillus* spp), G12 (*Arthrobacter* spp), G27 (*Brevibacterium* spp). The strains are Gram positive, sensitive to crystal violet, Streptomycin (10µg / ml) and Rifampicin (20µg / ml) (Chromosomal markers). Effect of carrot root juice at different concentrations 50, 100, 200µl on log culture suspended cells was studied. Cyclophosphamide (Cp) drug (Mutagen) was used at 1, 10, 50, 100 µg/ml. The juice and the mutagen were tested for cytotoxicity by estimating the survival index (Sx), and genotoxicity by estimating the mutant frequency of Streptomycin and Rifampicin resistance. Results showed that low conc (s) (50, 100µl) of carrot juice had no cytotoxic or genotoxic effect, while 200µl had slight cytotoxic and genotoxic activity, therefore 100µl quantity was used for subsequent investigations. Cp had both cytotoxic and genotoxic activity. The effect of different combinations between carrot and Cp was studied (Using juice and mutagen together, treating cells with juice before and after mutagen treatment), the results revealed that carrot juice provided cells with high protection against cytotoxicity and genotoxicity, the protection effect ranged 80– 100 %.

المصادر

الربيعي ، فرحة عبد (٢٠٠٠) . دراسة القابلية التطفيرية والمضادة للتطفير لبعض النباتات الطبية العراقية في الفئران البيض . رسالة ماجستير ، كلية التربية ابن الهيثم / قسم علوم الحياة / جامعة بغداد .

الزركاني ، علي صنيخ . (١٩٩٩) .عزل وتشخيص صبغة السياندين – ٣- ارابينوسايد من القشرة الخارجية لجذور نبات الجزر العراقي ودراسة بعض تطبيقاتها التحليلية والحياتية . رسالة ماجستير ، كلية العلوم / قسم الكيمياء / جامعة البصرة .

العزاوي ، غيث لطفي . (٢٠٠٤) . الكشف عن المطفرات في الأغذية والبيئة باستعمال نظام بكتيري . رسالة دبلوم عالي . معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق .

Ames, B. (1971). The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. *In* "Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection". A. Hollaender (Ed.). Plenum : New York , Vol. I.

Ashby, J. (1981). Tests for Potential Carcinogens: Unsolved Problems. *In* "Short – Term Tests for Chemical Carcinogens". H. Stich & R. San (Eds.). Springer – Verlag: New York , Heidelberg .

Bartsch, H., A. Camus and C. Malaveille (1976). Comparative mutagenicity of N-nitrosamines in a semi-solid and in liquid incubation system in the presence of rat or human tissue fractions . Mut. Res. 37 : 149 -162 .

Bronzetti, G. (1997). Therole of antimutagenesis and anticarcinogenesis. J. Environ. Pathol. Toxicol . Oncol . 16 : 259 – 262.

Duncan , D. (1955) . Multiple range and multiple F- test . Biometric 11 : 1 – 42

Eckardt, F. and R. Haynes (1981). Quantitative Measures of Induced Mutagenesis. *In* "Short – Term Tests for Chemical Carcinogens". H. Stich & R. San (Eds.). Springer– Verlag: New York, Heidelberg Ellengerger, J. and G. Mohn (1975). Mutagenic activity of cyclophosphamide, ifosamide, and trofosfamide in different genes of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* after biotransformation through extracts of rodent liver . Arch. Toxicol . 33 : 225 - 240 .

Felkner , I. ; A. Laumbach and M . Harter (1981) . Development of a *B* . *subtilis* System to Screen Carcinogens , Mutagens : DNA Damaging Mutation Assay . *In* "Microbial Testers : Probing Carcinogenesis " I . Felkner (Ed.) . Marcel Dekker Inc. : New York , Basel .

Ghaskadbi , S ; S. Rajmachikar ; C . Agate ; A. Kapadi and V . Vaidya (1992). Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C *in vivo* rodent micronucleus assay . Mutagens 12 : 11 -17 .

Green , M . and D. Tweast (1981) . An *Escherichia coli* Differential Killing Test for Carcinogens Based on *uvrA , recA , lexA* Triple Mutant . *In* " Short-Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich and R . San (Eds.) . Springer– Verlag : New York , Heidelberg .

Hales, B. (1982). Comparison of the mutagenicity and teratogenicity of cyclophosphamide and its active metabolites , 4- hydroxyl cyclophosphamide, phosphamide mustard, and acrolin . Cancer Res. 42: 3016 – 3021 .

Haroun , L. and B. Ames (1981) . The *Salmonella* / Mutagenicity Test : An Overview . *In* "Short – Term Tests for Chemical Carcinogens". H. Stich and R. San (Eds.). Springer – Verlag : New York , Heidelberg .

Harrigan , W. and M. McCance (1976) . Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology . Academic Press : London , New York .

Hedges, A . ; R. Snannon and R. Hobbs (1978) . Comparison of the precession obtained in counting viable bacteria by the Miles and Misra method. J. Appl. Bacteriol. 45 : 57 – 65 .

Hudson , L. and F. Hay (1980). Practical Immunology. 2nd Edition. Blackwell Scientific Publications : London.

Kada , T. ; T. Inoue ; K. Morita & M. Namiki (1986) . Dietary Desmutagens . *In* "Genetic Toxicology of the Diet " I . Knudsen (Ed.) , Alan , R. Liss . Inc. : New York .

Kier , L. ; D . Brusick ; A. Auletta ; E. Halle ; M. Brown ; V. Simmon ; V. Dunkel ; J. Mecann ; K. Mortelmans ; M. Prival ; T. Rao and V. Ray (1986) . The *Salmonella typhimurium* / mammalian microsomal assay : A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gen –Tox Program . Mut. Res. 168 : 240 -269 .

Kotake – Nara , E . ; M. Kushiro ; H. Zhang ; T. Sugawara ; K. Miyashita and A . Nagao (2001). Carotenoids affect proliferation of human prostate cancer cells . J. Nutr. 131 : 3303 – 3306 .

Knudsen , I. (1986) .Genetic Toxicology of the Diet . Alan R. Liss . New York .

Lai, C. ; M. Butler , and T. Matney (1980) . Antimutagenic activities of common vegetables and their chlorophyll content . Mut. Res. 77 : 245 –250 .

Lam, L. ; J . Zhang ; S. Hasegawa and H . Schut (1994) . Inhibition of chemically induced carcinogenesis by citrus limonoids . ACS-Symposium Series 546 : 209 -229.

Leifer , Z. ; J . Hyman and H. Rosenkranz (1981) . Determination of Genotoxic Activity Using DNA Polymerase – Deficient and – Proficient *E. coli*. *In* " Short – Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich & R . San (Eds.) . Springer – Verlag : New York , Heidelberg .

McCann , J . ; E . Chol ; E. Yomasaki and B. Ames (1975) . Detection of carcinogens as mutagens in the *Salmonella* / microsome test : Assay of 300 chemicals . Proc. Natl. Acad. Sci . 72 : 5315 – 5319 .

Miller , E. and J . Miller (1972) . Mutagenicity of Chemical Carcinogens Correlations , Problems and Interpretations . *In* " Chemical Mutagens : Principles and Methods for their Detection " . A. Hollaender (Ed.) . Plenum : New York ,Vol I .

Moutschen , J . (1985) . Introduction to Genetic Toxicology . John Wiley and Sons : Chichester , New York .

Prival , M ; E. McCoy ; B. Gutter and H. Rosenkranz (1977) . Tris (2,3 - dibromopropyl) phosphate : mutagenicity of a widely used flame retardant . Science 195 : 76 – 78 .

Rosin , M. (1981) . The Use of a Bacterial Assay to Identify which Agents Modify Carcinogen – Induced Mutagenesis . *In* " Short –Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich and R . San (Eds.). Springer – Verlag : New York , Heidelberg .

Stich , H and R. San (Eds.) (1981) . Short – Term Tests for Chemical Carcinogens . Springer – Verlag : New York , Heidelberg .

WHO (1993). Research Guidelines for Evaluating the Safety and Efficacy of Herbal Medicines . Regional Office for the Western Pacific . Manila .

Yahagi , T. ; M. Nagao ; Y . Seino ; T. Mataushima ; T. Sugimura and M. Okada (1977) . Mutagenicities on N – nitrosamines on *Salmonella* . Mut. Res. 48 : 121 -129 .