تست "Ames"
و کاربرد آن در تعیین موتاژنیسیته مواد

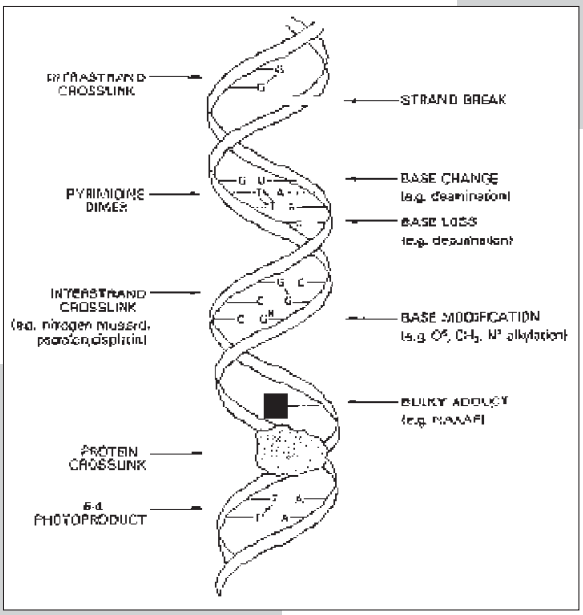
مجید رضایی بصیری: کارشناس ارشد سم‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
علی‌رضا پرتوآذر: کارشناس ارشد میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

■ مقدمه

ترکیبات فراوانی وجود دارند که می‌توانند روی DNA اثر کرده و منجر به تغییراتی در مولکول DNA شده و نهایتاً ایجاد به موتاژنیسیته و کارسینوژنیسته بنمایند. این ترکیبات روز به روز در حال افزایش بوده و در محیط زندگی، محل کار و صنایع کشاورزی و دارویی و خوراکی و به‌عنوان آلاینده‌های هوا و آب مشاهده و ثبت می‌گردند. برخی از این ترکیبات پس از جذب در بدن تا حدودی قابل دفع بوده و برخی به متابولیت‌هایی در بدن تبدیل که می‌توانند به بازهای آلی ساختمان مولکول DNA سلول‌ها از جمله گوانین، سیتوزین، تیمین متصل و به اشکال متفاوت: Bulky addut chemical جابجایی بازها، Frame Shift mutation، حذف بازها و ... تیمین دیمر ایجاد موتاسیون بنمایند.

در ایجاد موتاسیون پیوندهای نیتروژنی بازهای موجود در DNA هدف اصلی تهاجم ترکیبات آسیب‌زننده به DNA می‌باشند. عواملی از قبیل فلزات سنگین (Cr، As)، پرتوهای

یونیزان، پرتو UV، عوامل بیولوژیک (ویروس ها)، بنزوپیرین ها و داروها اثر سمی به DNA داشته و موتاژنیسته و نهایتاً کارسینوژنیسیته را ایجاد می‌نمایند. به این جهت استفاده از برخی تست ها جهت بررسی موتاژنیسته در نمونه های بیولوژیک اهمیت دارند. جدول ۱ نشان دهنده موتاژن های مهم شکل ۱ نمایشگر انواع مکانیسم های ژنوتوکسیته و یا موتاژنیسته و کارسینوژنیسته را می‌باشد و شکل ۲ مسیرهای مختلف طی شده توسط DNA آسیب دیده را نشان می دهد (۲ و ۱).



شکل ۱ـ انواع آسیب DNA

جدول ۱ـ انواع موتاژن‌ها (Mutagens)

- Physical factors
- UV-Ilght
- Ionizing radiation
  X-ray
- Chemical factors
  Metals
  Cr, As
- Organic compounds
  Benzapyrene
- Biological factors
  Virus: Rous Sarcome

■ تاریخچه

آزمایش Ames اولین بار توسط پروفسور Ames و همکارانش بر روی ژنوم باکتری سالمونلاتیفی موریوم در اواخر دهه شصت میلادی پایه‌گذاری شد و توسط آن ترکیبات شیمیایی موتاژن مورد تشخیص و غربالگری قرار گرفتند و از اوایل دهه هفتاد میلادی مورد قبول رسمی آژانس‌ها و سازمانی‌های نظارتی امریکا جهت قبول و یا ردّ کردن ترکیبات شیمیایی به‌عنوان موتاژن قرار گرفته و نیز در دهه هفتاد میلادی ژنوم سایر باکتری‌ها نظیر اشرشیاکلی نیز جهت بررسی ترکیبات شیمیایی موتاژن توسط محققان ژاپنی مورد استفاده قرار گرفت.

پی‌درپی ۹۳۸/۲۰۲

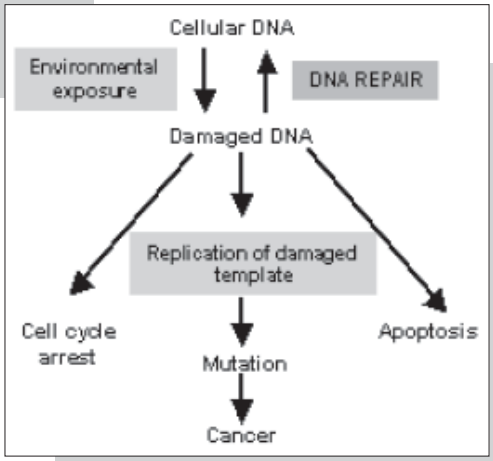
تا به حال بیش از ۵۰۰۰ ترکیب شیمیایی موتاژن با این آزمایش تشخیص داده شده‌اند (۲).

■ آزمایش Ames و تست های جانبی و کاربردهای آن

آزمایش Ames روش روتین جهت تشخیص و غربالگری ترکیبات شیمیایی موتاژن است. این آزمایش با هزینه نسبتاً ارزان و در مدت زمان حداکثر سه روز می‌تواند ترکیبات شیمیایی موتاژن را تشخیص و غربالگری نماید. در آزمایش Ames از تکنیک های سم شناسی و باکتری شناسی استفاده می شود. در این روش از سوش های جهش یافته (موتانت) باکتری سالمونلاتیفی موریوم استفاده می‌گردد. از آنجایی که باکتری ها فاقد سیستم آنزیمی سیتوکروم P450 هستند برای تامین این سیستم آنزیمی از سوپرناتانت سانترفوژ کبد موش صحرایی یا خوکچه استفاده می‌شود. تغلیظ آنزیم به شکل بافر S-9 صورت گرفته در حضور بافر فوق و ترکیب کارسینوژن و در حضور مقدار بسیار کم (trace) بیوتین و اسید آمینه هیستیدین باکتری در محیط‌های کشت اختصاصی طبق پروتکل انجام آزمایش که در این مقاله توضیح داده خواهد شد کلنی های برگشتی (revertant) ایجاد می نماید که با مقایسه کلنی های خودبخودی (Spontaneously) سوش ها می‌توان موتاژن بودن ترکیب را اثبات کرد. در کنار آزمایش Ames می توان برای اثبات موتاژنیسیته ترکیب مورد مطالعه، از تست های جانبی نیز استفاده نمود که نام برخی از تست های نامبرده در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- تست موتاژنیسیته

1- Comet Test = Human Leukocyte.
2- Yeast = Saccharomyces Service.
3- Higher plants = Vicia Faba.
4- Rodent animal Carsinogenicity Test.
5- Ames Test = Salmonella/Microsome assay.



شکل ۲- مسیرهای مختلف طی شده توسط DNA آسیب دیده

افرادی که در مشاغل مختلف از قبیل صنایع پتروشیمی، آسفالت کردن، صنایع داروسازی، کشاورزان، صنایع تهیه مواد غذایی، آزمایشگاه های تحقیقاتی و پاتولوژی مشغول به کار هستند و نیز مصرف کنندگان برخی مواد غذایی، دارویی و در معرض قرار گرفتن آلاینده های محیطی قرار گیرنده، ممکن است مواد موتاژن را از ادرار خود دفع نمایند که بر

روی این نمونه بیولوژیک مناسب می‌توان تست Ames را انجام داد. ترکیباتی که پس از انجام آزمایش Ames بـه عنـوان مـوتـاژن معرفی می‌شوند در ۷۷ تا ۹۰ درصد مواقع در جوندگان کارسینوژن می‌باشند (۲).

■ مکانیسم موتاسیون ها

در آزمایش Ames از سوش های سالمونلا تیفی موریوم که دستکاری ژنتیکی بر روی ژنوم آن ها انجام شده استفاده می گردد و این سوش ها در اثر جهش یا موتاسیون زایی در برابر ترکیبات کارسینوژن به سوش های وحشی در محیط‌های کشت تبدیل می‌شوند که در اثر این عمل ایجاد کلنـی هـای برگشتی (revertant colony) می‌نمایند. مکانیسم موتاسیون مربوط به هر سوش متفاوت است و معمولاً برای این آزمایش از دو سوش پارالل استفاده می‌شوند. سوش‌های سالمونلاتیفی موریوم آزمایش Ames عبارتند از:

TA_{97} ، TA_{100} ، TA_{101} ، TA_{102} ، TA_{1535} ، TA_{1537}. به عنوان مثال در سوش TA_{98} و TA_{100} که سوش های His منفی هستند در محیط کشت GM آگار در حضور مقدار Trace اسید آمینه L ـ هیستیدین و بیوتین و سیتوکروم P_{450} حاصل از کبد موش صحرایی به‌عنوان بافر S–9 و ترکیب موتاژن، سوش‌ها به سوش‌های وحشی His^+ تبدیل و در نتیجه ایجاد کلنی‌های برگشتی می‌نمایند.

در سوش TA_{100} His^- با جایگزینی باز آلی گوانین به جای باز آلی سیتوزین کد بازها تغییر و سوش به نوع وحشی تبدیل می گردد.

$TA_{\backslash..}$ His^- (لوسیون) GGG/CCC ⟶ $TA_{\backslash..}$ His^+ (پرولین) GAG/CTC

سویه وحشی (که قابل شمارش هستند)

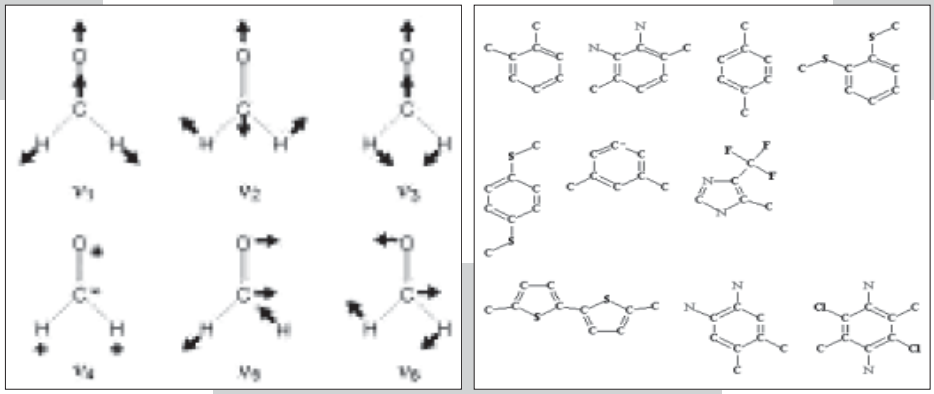
به طور کلی آزمایش Ames الگویی از مقایسه موتاژنیسته و کارسینوژنیسته سلول ها را در محیط‌های کشت نشان می‌دهد و میزان ایجاد موتاسیون یک در ده میلیون سلول باکتری اتفاق می‌افتد یعنی از ده میلیون باکتری یک باکتری دستخوش ایجاد موتاسیون تبدیل His^- به His^+ و نهایتاً ایجاد کلنی های برگشتی در محیط کشت اختصاصی می گردد. به این معنی که در محیط‌های کشت اختصاصی در حضور ترکیب شیمیایی موتاژن از ده میلیون باکتری فقط یک باکتری دستخوش ایجاد موتاسیون شده و از حالت His^- به حالت His^+ سالمونلاتیفی موریوم تغییر و توانایی ایجاد کلنی های برگشتی را پیدا می‌کند. در جدول ۳ و در شکل ۴ و ۵ خلاصه پروتکل انجام آزمایش Ames را مشاهده می‌نماییم (۱).

■ خلاصه روش اجرای آزمایش Ames

الف ـ از نمونه های ادرار ترکیبات موتاژن استخراج و آزمایش Ames را بر روی آن انجام می گیرد.

ب ـ در صورت استفاده از سیستم سیتوکروم P450 بـرای بـرخـی تـرکیبات موتاژن و متابولیت های آن کبد موش صحرایی به شکل سـوسپانسیون درآمده و با دور ۹۰۰۰G یا ۱۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شده و با کوفاکتورهای FAD NAD به شکل بافر S–9 درآمده و در فریزر نگهداری $-80^{\circ}C$ می شود.

پی‌در پی ۹۴۰/۲۰۲



شکل ۳ـ ساختمان شیمیایی فرمالدیید (چپ) و گزیلن (راست)

ج ـ محیط‌های کشت:

۱ـ محیط نوترینت براث اکساید جهت غنی‌سازی TA_{98} و TA_{100} (سویه‌های سالمونلاتیفی موریوم) به صورت کاملاً استریل تهیه می‌گردد. سوش‌های مزبور که به شکل لیوفیلیزه آماده می‌باشند به محیط کشت شده افزوده و پس از تکان دادن به شکل کاملاً استریل به مدت ۱۵ تا ۱۸ ساعت در شرایط بدون نور در ۳۷°C کشت داده می‌شوند.

جدول ۳ـ اساس آزمایش ایمز

- “A revision assay” Various strains that are unable to synthesize histidine - gene mutations in or nearby the histidine operon can restore function.
- Tested with or without metabolic activation since beacterial cells does not have P450 system metabolic activation systems are added.
- Use Salmonella thyphimurium a gram negative bacteria.
- There are several ways to enhance the test’s sensitivity.

۲ـ محیط تاپ آگار: به میزان ۲ میلی‌لیتر در لوله در پیچ دار ریخته و سپس اتوکلاو می‌شود.

۳ـ یک محیط آگار GM (حداقل گلوکز و آگار) که حاوی (۵۰X) Vogel – Bonner Medium E (VB).

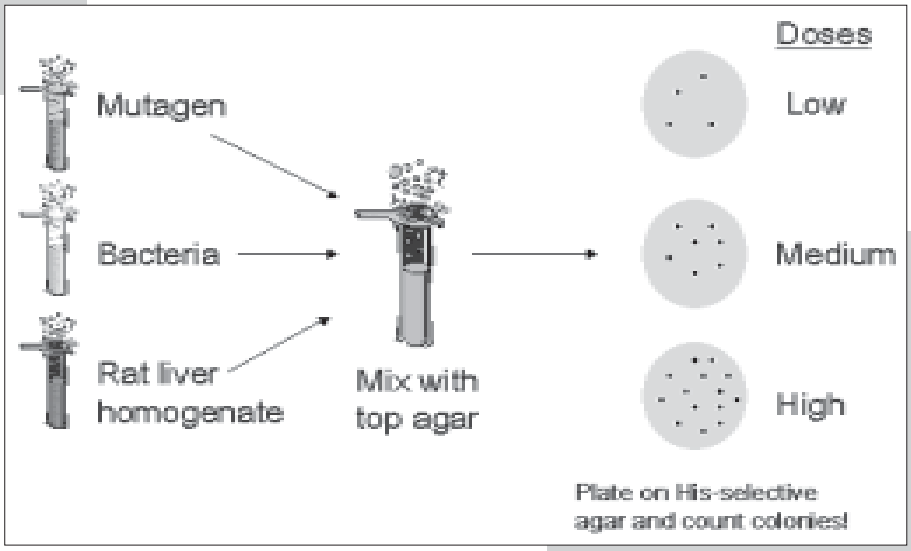
د ـ پروتکل انجام آزمایش:

۲ میلی لیتر تاپ آگار را که حاوی نیم میلی‌مول هیستیدین و بیوتین است در ۴۳ تا ۴۸ درجه سانتی‌گراد ذوب می‌شود و به آن نیم میلی‌لیتر از بافر S–9 تهیه شده از کبد موش صحرایی اضافه شده و سپس به آن ۰/۰۵ میلی‌لیتر از ماده شیمیایی تهیه شده از حاصل استخراج ادرار به عنوان مواد موتاژن اضافه و سپس ۰/۰۵ میلی‌لیتر از سویه‌ها سالمونلای تهیه شده از محیط کشت نوترینت براث افزوده می‌شود. مواد فوق کاملاً تحت شرایط استریل مخلوط و در سطح GM آگار پخش می‌شود. بعد از چند دقیقه سرد شدن GM آگار، آن را وارد انکوباتور ۳۷C نموده بعد ۴۸ تا ۷۲ ساعت

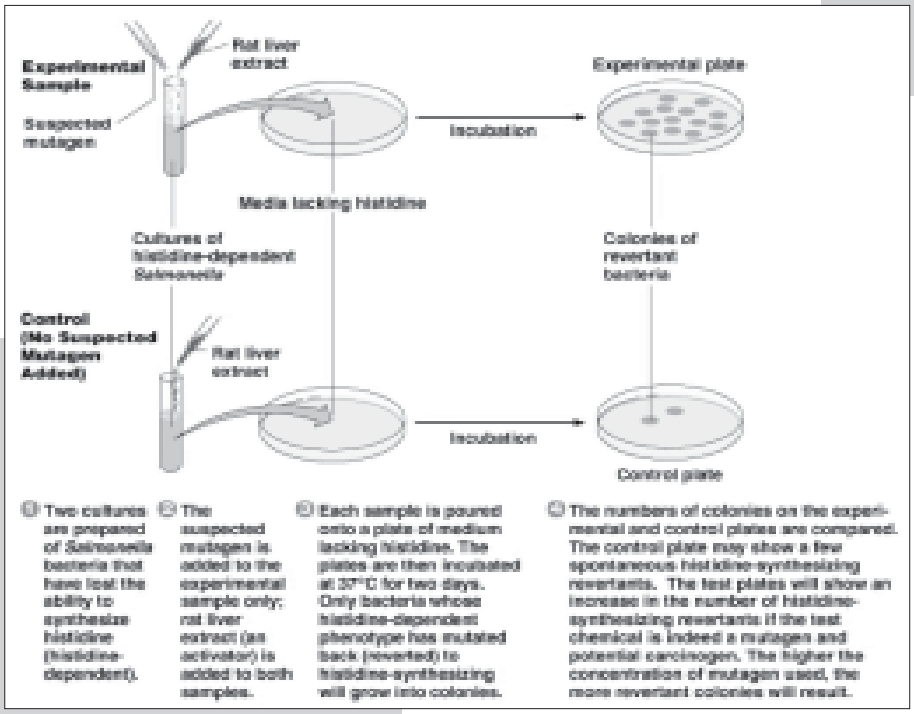
کلنی ها شمارش شده و نتایج در صورت وجود ترکیبات شیمیایی موتاژن به صورت تعداد کلنی های برگشتی گزارش می گردند (۲).

■ ترکیبات موتاژن

برخی از ترکیبات به کار گرفته شده در آزمایشگاه ها شامل هماتوکسیلن، ائوزین، فرمل، فرمالدیید، گزیلن، گزیلول، پارافین موتاژن می باشند. چون در محیط آزمایشگاه تکنسین ها با این مواد سر و کار دارند ممکن است این ترکیبات به نحوی وارد بدن آن ها شده و از طریق ادرار دفع شوند. به موجب مطالعات انجام شده (۳) متعدد اغلب این ترکیبات موتاژن هستند و ساختمان شیمیایی برخی از این ترکیبات در شکل ۳ آمده است. اغلب این ترکیبات با بازهای پورینی هسته سلول های بدن متصل گردیده و پیوندهای محکمی با نیتروژن بازها ایجاد و از این طریق موتاژنیسیته را القا می نمایند. بدن انسان در حالت عادی بسیاری از این موتاژن ها را توسط مکانیسم های متابولیسم کبدی از بدن خارج کرده و فرآیند آپوپتوزیس نیز در جلوگیری از سرطان در بدن کمک کننده می باشد ولی تماس طولانی مدت این مواد در صورت کاهش و یا فقدان آپوپتوزیس و متابولیسم کبدی منجر به انباشت این ترکیبات در بدن و نهایتاً ایجاد موتاژنیسته و کارسینوژنیسته می شود. لازم به یادآوری است ترکیب مانند پارافین به طور مستقیم از پوست دست کارکنان آزمایشگاه قابل جذب می باشد که این ترکیب به طور کامل موتاژن می باشد (۴ و ۳).



شکل ۴ـ آسی استاندارد ایمز



شکل ۵- پروتکل آزمایش ایمز

منابع

1. Curtis D. Klassen, Casarett and Doulls Toxicology, McGraww hill medical publishing division (2001) pp: 241-250.

2. Zeiger E, Mortelmans. K, The Ames Salmonella / microsome mutagenicity assay; 1 Molecular & Genetc Toxicoloy (2000). pp: 29-60.

3. SOFFRITTI. M, BELPOGGI. F, LAMBERTIN. L, LAURIOLA. M, PADOVANI. M & CESARE MALTIONI, Results of long-Term Experimental Studies on the Carcinogenicity of Formaldehyde and Acetaldehyde in Rats, Cancer Research Center, European Ramazzini Foundation for Oncology and Environmental Sciences, Ann. N.Y. Acad. Sci. 982: 87-105 (2002).

4. Zeiger E. GENOTOXICITY DATABASE, in: L.S. Gold, Zeiger. E (Eds). Hand book of CARCINOGENIC POTENCY and GENOTOXICITY DATABASE, CRS Press, Boca Raton, FL, 1997; pp: 687-729.