الفعالية المطفرة والمضادة للتطفير للكارنوسين في نظام بكتيري
1: القابلية التطفيرية للكارنوسين وبعض نواتج تفاعل ميلارد

ضحى داود سلمان عامر خلف الدروش

الملخص

درست التأثيرات السمية والتطفيرية للكارنوسين والمركبات الناتجة من تفاعله مع الفركتوز وكذلك نواتج تفاعل ميلارد بين بعض الحوامض الامينية مع الفركتوز بوساطة نظام بكتيري يرمز له G-system مكون من ثلاث عزلات بكتيرية ***Bacillus* spp. (G3)**، ***Arthrobacter* spp. (G12)** و(G27)***Brevibacterium* spp.**. تمتاز العزلات بصفة الحساسية للمضادين الحيويين الستربتومايسين والريفامبسين. اعتمد معامل البقاء لدراسة التاثيرات السمية، وحث الطفرات المقاومة للمضادات الستربتومايسين والريفامبسين كواسمات كروموسومية. استخدمت تراكيز مختلفة لكل من الكارنوسين ومركبات نواتج تفاعلات ميلارد لاختبار سميتها الخلوية والوراثية في النظام البكتيري، توصلت الدراسة الى عدم امتلاك الكارنوسين المنقى من عضلة صدر الدجاج بتركيز 50، 100 و250 مايكروغرام/ مليلتر سمية خلوية او سمية وراثية في النظام البكتيري المستخدم، كما لم تلاحظ فعالية تطفيرية لنواتج تفاعل الفركتوز مع الكارنوسين بتركيز 1 و5% مقارنة بنواتج تفاعل الفركتوز مع اللايسين التي ادت بتركيز 1 و5% الى ظهور طفرات مقاومة للستربتومايسين في العزلات البكتيرية الثلاث وطفرات مقاومة للريفامبسين في العزلتين G12 وG27 فقط، بينما أدت نواتج تفاعل الفركتوز مع الارجنين الى ظهور طفرات مقاومة للستربتومايسين فقط وفي العزلات الثلاث وعند استخدامها بالتركيزين المذكورين.

المقدمة

انصب اهتمام البحوث الحديثة في الاونة الاخيرة في دراسة السمية الوراثية للاغذية التي يتناولها الانسان والتي تحتوي العديد من المركبات الطبيعية او المضافة او الناتجة عن العمليات التصنيعية والتي تمتلك خاصية التطفير للمادة الوراثية، اذ اخذت هذه المركبات تهدد حياة الانسان من خلال الحاق الضرر بصحته واحداث الامراض وعلى قمة هذه الامراض هو السرطان. تشكل الاغذية نسبة 30% من مسببات السرطان (21، 22) وخاصة منها الاغذية المطبوخة أذ تشكل البروتينات المعاملة بدرجات حرارة مفرطة خطراً كبيراً (34) لأن المركبات الناتجة عن التحطم الحراري للبروتينات والحوامض الامينية عند الطبخ تعد مطفرات قوية لبكتريا ***Salmonella typhimurium*** كما اظهرت قابلية لاحداث السرطانات (29). هنالك مركبات مطفرة تنشأ من تفاعلات الاسمرار **Browning reaction** التي تحدث بين السكريات والامينات (تفاعل ميلارد)، اذ اثبتت العديد من التجارب التي اجريت على خليط الحامض الاميني اللايسين وسكر الكلوكوز المعامل بدرجات حرارة 100–120م بانها تنتج مركبات ذات فعالية مطفرة، تزداد هذه الفعالية بصورة متوازية مع زيادة الاسمرار (31). كما ان الفعالية المطفرة يمكن ان تنشأ باستخدام احماض امينية اخرى غير اللايسين او استخدام سكريات اخرى مثل الفركتوز بدلاً من الكلوكوز (13).

الكارنوسين ببتيد ثنائي يتوفر طبيعياً بتراكيز عالية (5–40 ملي مولار) من العضلات الهيكلية للفقريات وخاصة منها العضلات البيضاء (9) يمتلك الكارنوسين العديد من الوظائف الحياتية التي جعلت منها محط انظار العديد من الباحثين لدراستها وابرازها مثل سعته الدارئة (6) فعالية المضادة للاكسدة (11) فعالية المضادة للشيخوخة (9) حماية بروتينات ودنا الخلايا من التحوير بعملية **Carbonylation** (16) وفعاليته في الدماغ والاعصاب (17)،

جزء من أطروحة دكتوراه للباحث الأول.

كلية الزراعة – جامعة بغداد – بغداد، العراق.

معالجة الجروح وتحسين الجهاز المناعي (33)، تنظيم مستوى الكلوكوز في الدم (28) وغيرها من الوظائف الاخرى. ولاهمية هذا البيتيد كان لابد من اجراء دراسات للتاكد من عدم سميته الخلوية والوراثية فقد اجرى مكتب المرضى الاوربيين عام 2000 دراسة للكشف عن القابلية التطفيرية للكارنوسين باجراء فحص امس باستخدام بكتريا ***S. typhimrium*** وتوصلوا الى عدم امتلاك اية قدرة تطفيرية للعزلة المذكورة.

استخدمت أنظمة حيوية متنوعة للكشف عن سمية المواد الكيميائية وقابليتها على احداث الطفرات الوراثية وشملت انظمة الاحياء المجهرية وانظمة اللبائن (7، 30). استخدم نظام بكتيري بسيط يحمل صفة اختيارية وهي صفة الحساسية للمضادين الحيويين الستربتومايسن والريفامبسين (2) يشمل هذا النظام ثلاث عزلات بكتيرية موجبة لصبغة كرام عزلت من التربة وهي (***Bacillus*** spp.(G_3)، (***Arethrobacter*** spp.(G_{12}) و ***Brevibacterium*** spp.(G_{27})) حيث لايمكن لهذة العزلات النمو في وسط يحتوي على احد هذين المضادين بالحدود الدنيا وهي 10 مايكروغرام/مللتر للستربتومايسين و20 مايكروغرام/مللتر للريفامبسين. يمتاز هذا النظام باعتماده على الطفرات الامامية **Forward mutation**. تم تطبيق هذا النظام للكشف عن سمية العديد من المركبات (2، 3، 4).

هدفت هذه الدراسة الى اختبار السمية الخلوية والوراثية للكارنوسين المنقى من صدر الدجاج والمركبات الناتجة من تفاعله وبعض الاحماض الامينية مع الفركتوز باستخدام نظام بكتيري **G-System** يتألف من العزلات ***Bacillus*** spp.(G_3)، ***Arthrobacter*** spp.(G_{12}) و***Brevibacterium*** spp.(G_{27}). تمتاز هذه العزلات بحساسيتها للمضادين الحيويين الستربتومايسين والريفامبسين، اذ اعتمد معامل البقاء وحث الطفرات المقاومة للمضادين الحيويين كأساس للكشف عن السمية والقابلية التطفيرية.

المواد وطرائق البحث

جهز الدجاج بعمر ستة أسابيع من مفقس الأمل الواقع في منطقة الثنية ذات السلاسل/ الكاظمية– بغداد، قطع اللحم وثرم وعبأ في أكياس نايلون وخزنت بالمجمدة (– 15°م) لحين الاستعمال. استخلص الكارنوسين من لحم صدر الدجاج باستعمال الماء المقطر وفقا للطريقة التي ذكرها **Chan** وجماعته (10) ونقي الكارنوسين وفقاً للطريقة الموصوفة من قبل **Huang** و**Kuo** (18). با ضافة خلاصة لحم صدر الدجاج المركز على عمود التبادل الايوني الموجب كاربوكسي مثيل سليلوز (**C\M-cellulose**) اذ ازيلت الاجزاء غير المرتبطة بالعمود باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 1 ملي مولار برقم هيدروجيني 3.5، ثم استرد الكارنوسين باستعمال محلول فوسفات الصوديوم الدارىء بتركيز 10 ملي مولار ذي الرقم الهيدروجيني 8.5 وبسرعة جريان 60مل/ساعة بواقع 8 مللتر للجزء الواحد. قيست الامتصاصية للاجزاء المفصولة على طول موجي 570 نانومتر باستعمال التفاعل اللوني مع النهايدرين المحضر وفقاً لما ذكره العواد (1) كما قيست الاجزاء المفصولة بطول موجي 500 نانومتر بطريقة **Diazo** المحضرة وفقاً لما ذكره **Macpherson** (26) باستعمال جهاز المطياف الضوئي **Spectrophotometer**، جمعت الاجزاء المفصولة الممثلة لمنحني الكارنوسين وجفدت.

استعمل في هذه التجربة نظام بكتيري للكشف عن قابلية التطفير للكارنوسين والمركبات الناتجة من تفاعله مع الفركتوز فضلاً عن نواتج تفاعل بعض الحوامض الأمينية مع الفركتوز وكذلك الكشف عن فعالية الكارنوسين المضادة للتطفير، إذ يضم هذا النظام ثلاث عزلات بكتيرية عزلت من التربة ولهذه العزلات مواصفات خاصة منها الحساسية للستربتومايسين بتركيز 10مايكروغرام/مللتر والريفامبسين بتركيز 20 مايكروغرام/مللتر، وموجبة لصبغة كرام وهذه الأنواع الثلاثة هي ***Bacillus*** spp. رمز لها (G_3)، ***Arthrobacter*** spp. ورمز لها (G_{12}) و***Brevibacterium*** spp. رمز لها (G_{27}) تم الحصول على هذه العزلات من الدكتورة زهرة محمود الخفاجي في

معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا/جامعة بغداد، وقد صمم هذا النظام في إحدى الدراسات الخاصة بالمعهد من قبل العزاوي (2) وقد سمي هذا النظام باسمه الأول (Ghiath system).

اتبعت الطريقة المستخدمة من قبل العزاوي (2) لاجراء هذه الدراسة، إذ حضرت 4 أنابيب معقمة ووزع فيها المزروع المنشط على وسط المرق المغذي (N.B) بعمر 24 ساعة للعزلة قيد الدراسة بمقدار 5 مللتر، عرضت الأنابيب للنبذ المركزي بسرعة 572xg مدة 15 دقيقة، أضيف للراسب البكتيري 5 مللتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم المعقم بتركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 5.5 (مطروح منه حجم الاضافة اللاحقة)، ثم أضيف للأنابيب رقم 2، 3 و4 حجم 0.1، 0.2 و0.5 مللتر على التوالي من محلول الكارنوسين الخزين ذي التركيز 0.25 ملغم/100 مللتر من الماء المقطر لتعطي تركيز 50، 100 و250 مايكروغرام/مللتر على التوالي، أما الأنبوب رقم 1 فعد سيطرة سالبة حدد فيها العدد البكتيري الحي بعد إضافة 5 مللتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم.

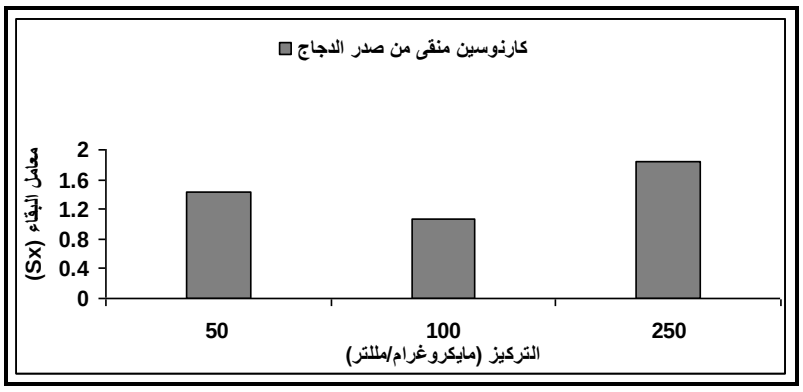
حضنت الأنابيب الأربعة بدرجة حرارة 37م مدة 15 دقيقة، عرضت بعدها الأنابيب للنبذ المركزي وبالسرعة السابقة نفسها وغسلت بمقدار 5 مللتر من دارئ فوسفات البوتاسيوم مرتين متتاليتين وأجري النبذ المركزي بعد كل مرة وعلقت أخيراً بمقدار 5 مللتر من المرق المغذي وتم تحديد العدد الحي للبكتيريا للمعاملات المختلفة من مركب الكارنوسين المعبر عنها بمعامل البقاء Sx (ويمثل معامل البقاء مقدار الزيادة في العدد الحي للعزلات عند حضنها بتراكيز من الكارنوسين في 37°م (مدة 15 دقيقة))، ثم حضنت بعدها المعلقات البكتيرية لليوم التالي على درجة حرارة 37م للتعرف على التعبير الظاهري الناجم عن احتمال بقاء آثار الكارنوسين جراء عدم الغسل الجيد في الخطوة السابقة، كما تم تحديد عدد الطفرات المقاومة للمضادين الحيويين الستربتومايسين والريفامبسين وذلك بتقدير عدد البكتريا النامية على الوسط الحاوي على هذه المضادات بالتركيزين 10 مايكروغرام/مللتر للستربتومايسين و20 ميكروغرام/مللتر للريفامبسين وبثلاثة مكررات. اتبعت خطوات العمل نفسها في تحليل القدرة التطفيرية لنواتج تفاعل الفركتوز مع كل من اللايسين والارجنين والكارنوسين (تفاعل glycation) المحضر باذابة 1.25 غم من الفركتوز في 5 مللتر من دارىء فوسفات الصوديوم ذو التركيز 0.05 مولار ورقم هيدروجيني 7 للحصول على محلول الفركتوز بتركيز 50 ملغم/مللتر ذوبت فيها اوزان معلومة من الحوامض الامينية اللايسين والارجنين والكارنوسين لتعطي تركيز 0.5 مولار، ثم عوملت المحاليل في 100°م مدة 80 دقيقة وعقمت باستعمال مرشحات معقمة بمسامية (0.45 µ). اذ اضيفت حجوم مختلفة من نواتج التفاعل وهي 50 و250 مايكروليتر بمقدار 5 مللتر من العالق البكتيري (مطروح منه حجم الاضافة) لتعطي تركيز 1 و5 % على التوالي (14) تم اجراء الخطوات على العزلات البكتيرية الثلاث.

النتائج والمناقشة

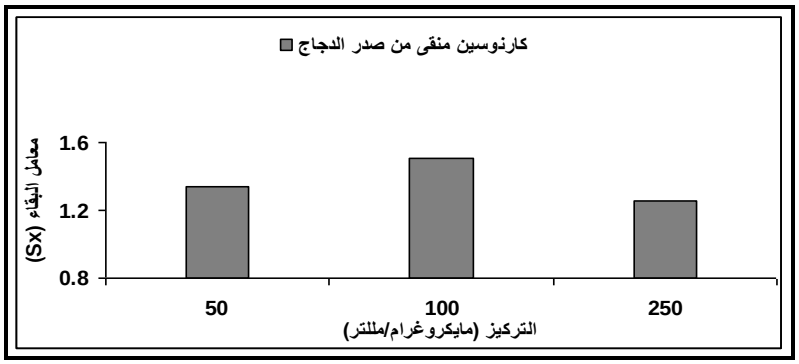
اظهرت نتائج دراسة تأثير الكارنوسين المعزول من صدر الدجاج بتركيز 50 و100 و250 مايكروغرام/مللتر على العدد الحي للعزلات الثلاث (*Bacillus* spp.(G_3)، (*Arthrobacter* spp (G_{12}) و *Brevibacterium* spp. (G_{27}). والموضحة في الشكل (1، 2 و3) حدوث زيادة في العدد الحي المعبر عنها بمعامل البقاء (Sx) للعزلة G_3، G_{12} وG_{27} عند حضن هذه العزلات مع التراكيز الثلاثة المستعملة من الكارنوسين المعزول من صدر الدجاج على درجة حرارة 37م مدة 15 دقيقة.

تعطي هذه النتائج تصوراً مبدئياً عن عدم سمية الكارنوسين للعزلات قيد الدراسة إذ يتضح ان الكارنوسين المعزول من صدر الدجاج لم يسبب انخفاضاً في عيوشية الخلايا للعزلات الثلاث وبالتراكيز المستخدمة مما يعطي انطباعاً ايجابياً حول عدم سميته لتلك العزلات، إذ لم يسبب الكارنوسين بالتراكيز المستعملة انخفاضاً في معامل البقاء عن القيمة 1 والتي تمثل قيمة معامل البقاء لنموذج السيطرة. يمكن تفسير زيادة العدد الحي للعزلات الثلاث الى ان الكارنوسين عبارة عن ببتيد

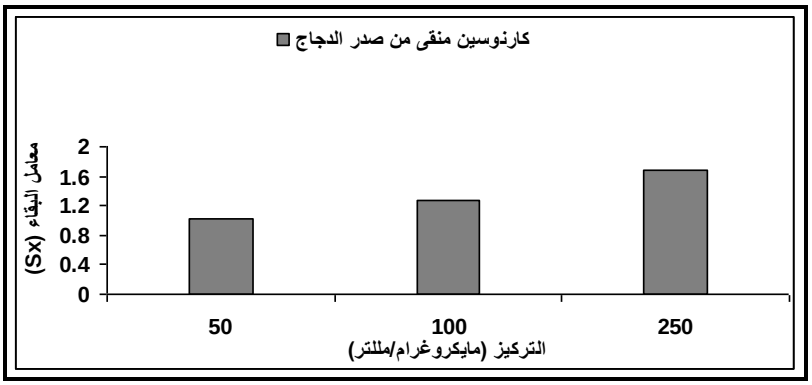
ثنائي يتألف من بيتا – الانين وهستدين لذا فهو يعد مصدراً غذائياً محفزاً للنمو ممتازاً للعديد من البكتريا (8). والتي بامكانها ان تنقل هذا الببتيد بصورته الكاملة أو بعد تحليله الى مكوناته الاساسية من الحامضين الامينيين الى داخل الخلية ليتم تأييضه واستخدامه كمصدر كربوني ونتروجيني في بناء احتياجات الخلية.



شكل 1: تأثير تراكيز مختلفة من الكارنوسين المنقى من صدر الدجاج والمنتج مختبريا في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_3



شكل 2: تأثير تراكيز مختلفة من الكارنوسين المنقى من صدر الدجاج والمنتج مختبريا في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_{12}



شكل 3: تأثير تراكيز مختلفة من الكارنوسين المنقى من صدر الدجاج والمنتج مختبريا في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_{27}

بالرغم من ان دراسة تأثير المواد في العدد الحي للخلايا في العزلات قيد الدراسة تعد اولى المؤشرات حول تأثيرها السمي الا ان موت الخلايا يعد حدثاً مستقلاً عن عملية التطفير (12)، لذا تمت دراسة تأثير الكارنوسين في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين والتي استعملت كواسمات كروموسومية **chromosomal genetic markers** على العزلات البكتيرية الثلاث قيد الدراسة والتي تمثلت بحساسيتها لهذين المضادين (2) إذ لوحظ عدم وجود تأثير مطفر للكارنوسين في العزلات الثلاث حيث لم تظهر اية خلايا بكتيرية في الاوساط الحاوية على كِلَي المضادين الحيويين بمعنى بقاء العزلات الحساسة للمضادين الحيويين محتفظتين بهذه الصفات. وهذا ينطبق مع التجارب التي اجريت من قبل **European Patient Office** (13) والتي اثبتت عدم امتلاك الكارنوسين أية فعالية مطفرة لعزلة

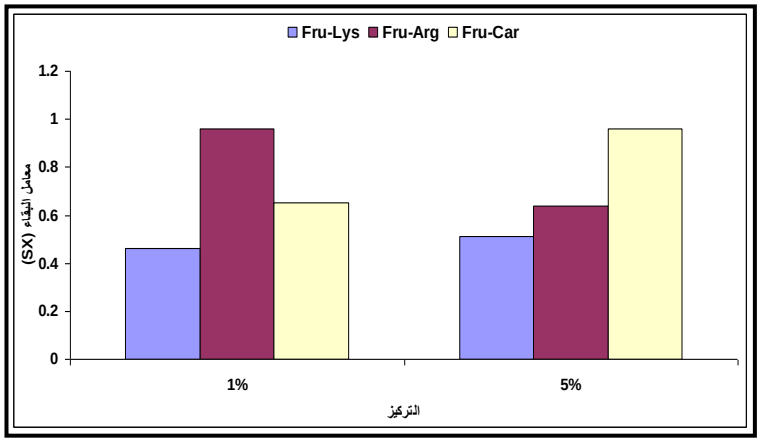
Salmonella typhimurium TA_{100} ويمكن تفسير عدم فاعلية الكارنوسين كمادة مطفرة هو ان الكارنوسين من المركبات المحبة للنواة Nucleophilic compounds (23) في حين المركبات المطفرة للدنا هي عبارة عن مركبات محبة للالكترونات Electrophilic compounds تبحث وتتفاعل مع مراكز ذوات ذرات غنية بالالكترونات الموجودة في الخلية (الحامض النووي DNA) وتؤدي الى حدوث الطفرات (14).

اظهرت نتائج تأثير نواتج تفاعلات ميلارد أو Glycation (GR) لثلاث معاملات في العدد الحي للعزلات الثلاث الموضحة في الاشكال (3، 4 و5) والتي تبين العلاقة بين معامل البقاء survival fraction (Sx) والذي يعد مؤشراً واضحاً لعيوشية الخلايا وللسمية الخلوية cytotoxicity (25) وبين التراكيز المستخدمة من نواتج تفاعل GR للمعاملات الثلاث، حدوث انخفاض واضح في العدد الحي لخلايا العزلات الثلاث اختلفت باختلاف التراكيز المستخدمة من نواتج تفاعل GR وباختلاف انواع المركبات الناتجة من هذه المعاملات الثلاث المختلفة والتي قد تكون سامة لعزلة معينة دون اخرى.

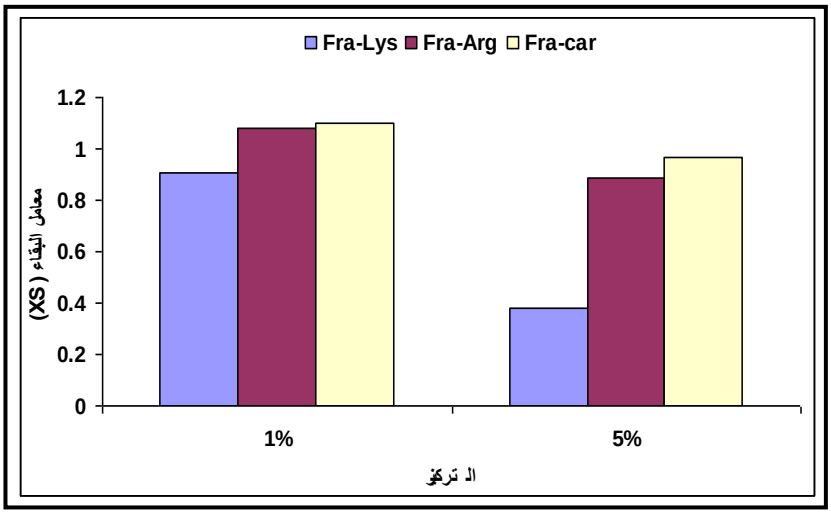
اظهرت نواتج المعاملة الاولى (Fru-Lys) انخفاضاً كبيراً في معامل البقاء لخلايا العزلات الثلاث وقد يعود ذلك الى ان نواتج هذه المعاملات تكون سامة قاتلة ومطفرة قوية. الا ان العزلة G_{27} كانت الاكثر حساسية لهذه المعاملة حيث بلغ الجزء الحي المتبقي لها (Sx) عند حضنها مع 1% من هذه المعاملة 0.44 وارتفعت قيمة Sx بزيادة التركيز المستخدم من هذه المعاملة الى 5% حيث بلغت 0.46. أما نواتج المعاملة الثانية (Fru-Arg) فقد اظهرت تاثيراً سلبياً في العزلة G_3 وG_{12} إذ حدث انخفاض في معامل البقاء (Sx) مع زيادة التركيز، أما العزلة G_{27} فقد انخفض معامل البقاء عند معاملة الخلايا بتركيز 1% من المعاملة الثانية اذ بلغت قيمة Sx 0.44، ثم ارتفعت عند حضن الخلايا مع 5 % من المعاملة نفسها و بلغت 0.72 (شكل 4، 5 و6).

وقد يعود هذا الارتفاع في العدد الحي للخلايا بالرغم من زيادة كمية المركبات السامة الى حدوث تنافس لهذه المركبات على الحدود الخارجية وعدم امكانية دخولها الى داخل الخلية أو ان المركبات المطفرة قد استمرت بالتأثير في دنا الخلية مما قد ادى الى حدوث طفرات مخمدة Suppressor mutation والتي تلغي العديد من الطفرات المميتة (19).

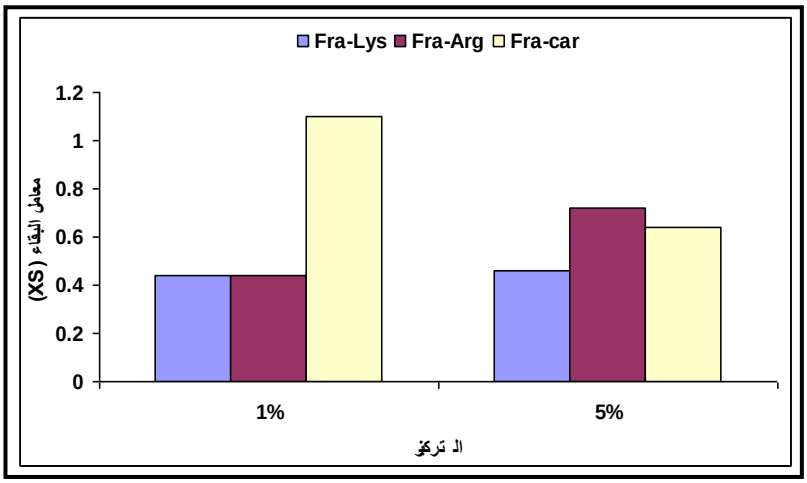
أما بالنسبة لنواتج المعاملة الثالثة (Fru-Car) فقد حدث أيضاً انخفاض في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_3 عند تعرضها لتركيز 1% وانخفاض في العزلة G_{27} عند تعرضها لتركيز 5% بينما كانت العزلة G_{12} اقل تحسساً لسمية نواتج هذه المعاملة مقارنة بالعزلتين الاخريين.



شكل 4: تأثير تراكيز مختلفة من نواتج تفاعل Glaycation (GR) للايسين والارجنين والكارنوسين مع الفركتوز في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_3



شكل **5**: تأثير تراكيز مختلفة من نواتج تفاعل **Glaycation (GR)** للايسين والارجنين والكارنوسين مع الفركتوز في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_{12}



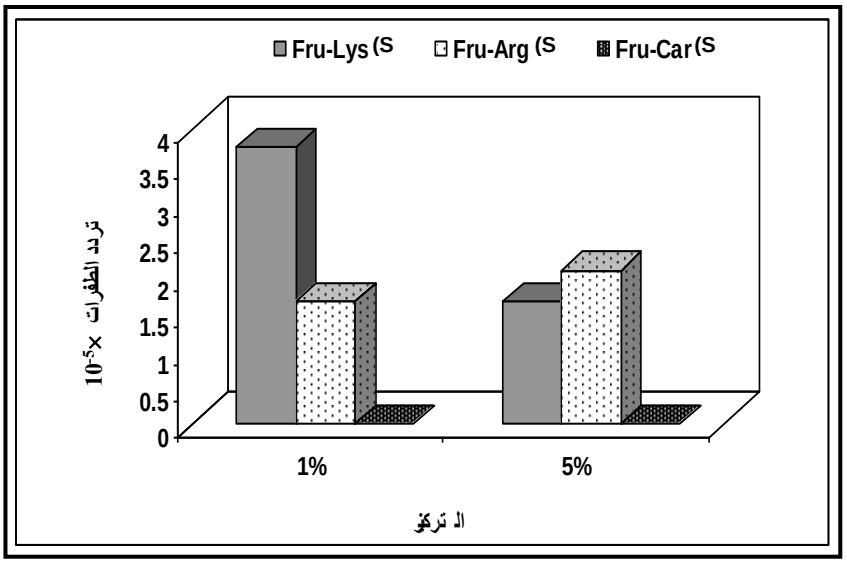
شكل **6**: تأثير تراكيز مختلفة من نواتج تفاعل **Glaycation (GR)** للايسين والارجنين والكارنوسين مع الفركتوز في معامل البقاء (Sx) للعزلة G_{27}

ومن الجدير بالذكر ان تحديد معامل البقاء يعد من المؤشرات المهمة إذ يمكن ان يعول عليها في تحديد قابلية مادة معينة على التطفير حيث ان المركبات التي تعطي قيم (Sx) بمدى **0.96– 1** تعد مركبات غير مطفرة وتكون هذه المركبات عند الحد الفاصل **Border line** أو غير مؤثرة أو انها مطفرات ضعيفة جداً عندما تكون قيم (Sx) بمدى **0.86 – 0.95**، أما عندما تكون قيم (Sx) اقل من **0.85** فتعد هذه المركبات مطفرات قوية (**25**). من المؤشرات التي يمكن من خلالها تحديد كون المادة مطفرة او لا هو حساب تردد الطفرات **Mutation Frequency (Mx)** والتي تعد مؤشراً للسمية الوراثية **Genotoxicity** وفيها تنسب عدد الطفرات الى عدد الخلايا في نموذج السيطرة (غير المعاملة بالمادة المطفرة) في مرحلة التعبير الظاهري إذ توضح الاشكال (**7**، **8** و**9**) تأثير التراكيز المستخدمة من المعاملات الثلاث على حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين في العزلات الثلاث. إذ ان ما يميز هذه الاشكال هو اختفاء التأثير المطفر لنواتج المعاملة الثالثة (**Fru-Car**) وبالتراكيز المستخدمة إذ لم يحدث حث للطفرات المقاومة للستربتومايسين أو الريفامبسين وان كانت تلك النواتج قد اثرت في العدد الحي للخلايا (Sx) وهذا يخضع لحقيقة ان موت الخلايا قد يكون حدثاً مستقلاً ومنفصلاً عن عملية التطفير (**12**). ويمكن تفسير هذه النتيجة على اساس ان نواتج هذا التفاعل ليس لها تأثير مطفر من خلال احداث تغيير في البروتينات الرايبوزومية (**30s**) والتي تكون هدفاً لعمل المضاد

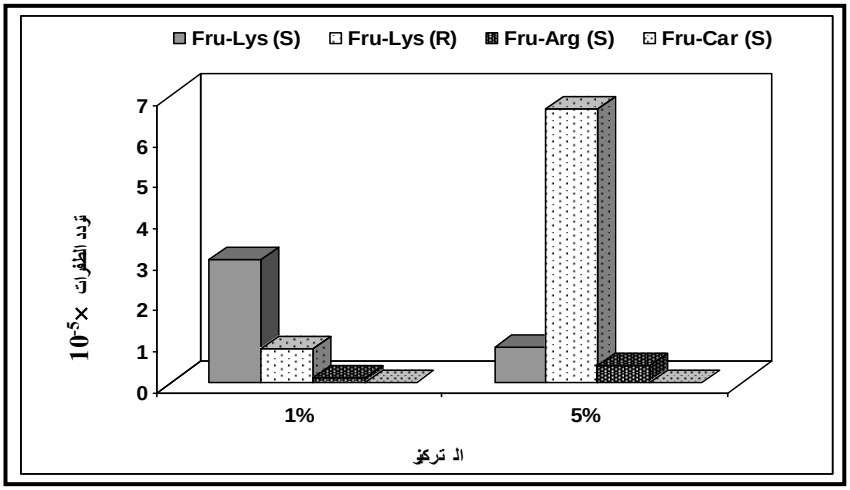
الحيوي الستربتومايسين أو التأثير في الوحدة β لإنزيم كوثرة RNA (RNA polymerase) والتي تكون هدفاً لعمل المضاد الحيوي الريفامبسين (15). والتفسير الاكثر احتمالاً هو ان الكارنوسين غير المتفاعل في المعاملة (Fru-Car) يعمل كمثبط مباشر للمطفرات Dismutagenes من خلال فعاليته كمضاد أكسدة Antioxidant مزيل للجذور الحرة وكذلك عمله كمضاد للمركبات الكاربونيلية السامة Anticarbonylation. اذ بامكان الكارنوسين التفاعل مع المركبات الكاربونيلية (الالديهايدية والكيتونية) وكذالك التفاعل مع المركبات النهائية لتفاعله مع الكلوكوز مركبات (AGE_s) وتثبيطها وبذلك لاتظهر هذه المركبات فعالية مطفرة مقارنة بالدور المطفر للمركبات الخطرة (AGEs) النهائية لتفاعل الحامضين الامينيين اللايسين والارجنين مع الكلوكوز (24).

أما تردد الطفرات المقاومة للمضادين للمعاملة الاولى (Fru-Lys) فقد لوحظ انخفاض في حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين مع زيادة التركيز المستخدم من المعاملة في العزلتين G_3 وG_{12}، (شكلي 7 و8) بينما ازداد تردد الطفرات مع زيادة الحجم المستخدم للمعاملة في العزلة G_{27} (شكل 9). تفسر هذه النتيجة ان التراكيز العالية من المواد المطفرة تستمر في حث الطفرات والتي قد تنشأ عنها طفرات مخمدة لطفرات مقاومة الستربتومايسين. ومن هذا يتبين ان العزلة G_3 هي اكثر حساسية لنواتج هذه المعاملة إذ ازداد تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين فيها اكثر من بقية العزلات. ولوحظ زيادة تردد الطفرات المقاومة للمضاد الحيوي الريفامبسين مع زيادة التركيز للمعاملة الاولى في العزلتين G_{12}، G_{27} واختفاء هذه الطفرات في العزلة G_3 وقد يعود ذلك الى انخفاض عدد المناطق الوراثية (الجينات) المسؤولة عن تخليق إنزيم RNA polymerase في هذه العزلة والمكونة من عدة وحدات 2α، β وβ' وهي والتي يؤثر فيها الريفامبسين على الوحدة β' مما يؤدي الى قتل الخلايا وبذلك فان احتمال حدوث الطفرات في هذه الجينات بفعل نواتج هذه المعاملة تكون اقل.

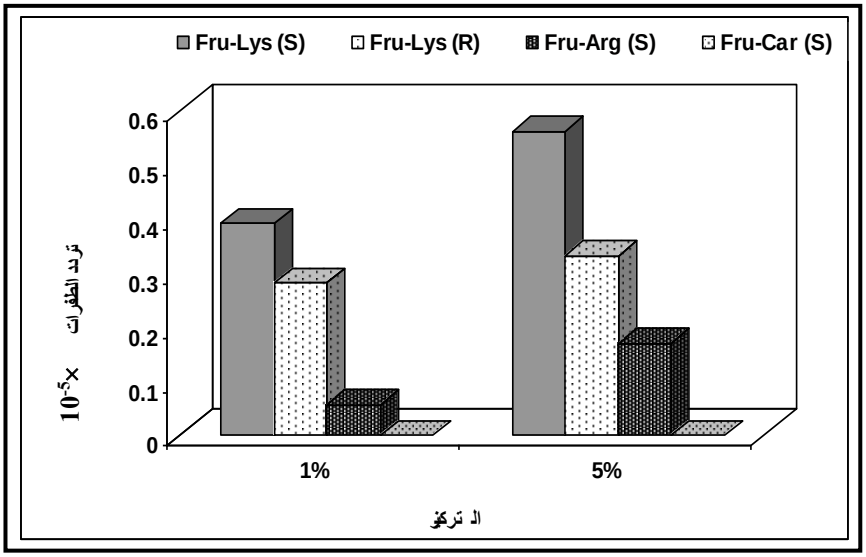
كما أدت نواتج المعاملة الثانية (Fru-Arg) الى زيادة تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين للعزلات الثلاث مع زيادة التراكيز المستخدمة، بينما لم تسبب في حث الطفرات المقاومة للريفامبسين وقد يعود ذلك الى ان نواتج هذه المعاملة لاتؤدي الى احداث طفرات في موقع الهدف لعمل المضاد الحيوي الريفامبيسين الاشكال (7، 8 و9).



شكل 7: تأثير تراكيز مختلفة من نواتج تفاعل Glaycation (GR) اللايسين والارجنين والكارنوسين مع الفركتوز في الزيادة في تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين (S) للعزلة G_3



شكل 8: تأثير تراكيز مختلفة من نواتج تفاعل Glycation (GR) للايسين والارجنين والكارنوسين مع الفركتوز في الزيادة في تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين (S) والريفامبسين (R) للعزلة G_{12}



شكل 9: تأثير تراكيز مختلفة من نواتج تفاعل Glaycation (GR) للايسين والارجنين والكارنوسين مع الفركتوز في الزيادة في تردد الطفرات المقاومة للستربتومايسين (S) والريفامبسين (R) للعزلة G_{27}

ويتضح من النتائج اعلاه ان بعض نواتج تفاعل الحوامض الامينية مع السكريات والتي يطلق عليها بتفاعلات **glycation (GR)** أو تفاعلات ميلارد **(MR)** في كيمياء الاغذية هي مواد مطفرة وكما اثبتت في العديد من الدراسات الاخرى (**30**).

وقد جاءت هذه النتائج مشابهة لما توصل اليه **Kim** وجماعته (**20**) من ان هنالك فعالية مطفرة لنواتج تفاعل اللايسين والارجنين مع الكلوكوز على البكتريا ***Salmonella tyhimurium*** **(TA_{100})**. بينما لم تظهر نواتج تفاعل الكارنوسين مع الكلوكوز أية فعالية مطفرة في العزلة المذكورة. كما توصل **Hipkiss** وجماعته (**15**) إلى ان الكارنوسين ونواتج تفاعل الكارنوسين مع الكلوكوز غير مطفرة للعزلة ***Salmonella typhimurium*** **(TA_{100})** بينما اظهرت نواتج تفاعل اللايسين مع الكلوكوز فعالية مطفرة للعزلة المذكورة.

ومن الجدير بالذكر ان نواتج هذه التفاعلات تعد مطفرات مباشرة للعزلات المستعملة في الدراسة الحالية إذ لم تحتاج الى عملية تنشيط ايضي بوجود مستخلص S_9. إذ اثرت هذه النواتج في حث الطفرات وقتل الخلايا لكن ليس

بصورة متوازية لان عمليات القتل والتطفير هي عمليات غير معتمدة على بعضها وان حساب معامل البقاء وان كان قد يعطي مؤشراً لعمليات التطفير الا انه لايحل محل التطفير بل مكملاً له (25).

كما توضح نتائج هذه الدراسة ان اختبار القابلية التطفيرية لمادة معينة لايعتمد على نوع واحد من البكتريا وانما يجب ان يتم استعمال انواع مختلفة من البكتريا تحمل صفات وراثية محمولة على الكروموسومات، فعلى سبيل المثال وجد ان المواد غير المؤثرة في سلالات ايمس ***Salmonella typhimurium*** كانت مطفرة في بكتريا ***Bacillus subtillis*** وهذا يعني انه لايوجد نظام واحد يكشف عن كل المطفرات كما يفضل ان تجرى اختبار فعالية المواد المطفرة في انظمة اللبائن امعاناً في التاكد من المواد المطفرة (14، 27). ويتضح من نتائج البحث الحالي عدم سمية الكارنوسين للانسان اذ يمكن تناوله للاستفادة من وظائفه المختلفة كمضاد للاكسدة او مضاد للشيخوخة وتقليل الاصابة بامراض القلب والسرطانات من خلال قابليته في التفاعل مع المركبات الكاربونيلية والتي تدعى بتفاعل ميلارد وتقليل تاثيرها في اعضاء الجسم، كما ان نواتج تفاعل الكارنوسين مع هذه المركبات الخطرة لايعد ساماً للانسان كما يساعد الكارنوسين على اخراجها من الجسم.

المصادر

1- العواد، قاسم حسن (1977). دراسة تأثير فترة الانضاج على المكونات البروتينية ونوعية جبن الجدر المصنع من حليب الجاموس رسالة ماجستير–كلية الزراعة– جامعة بغداد، العراق.

2- العزاوي، غيث لطفي عارف (2004). الكشف عن المطفرات في الاغذية والبيئة بأستعمال نظام بكتيري. رسالة دبلوم عالي، معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية – جامعة بغداد، العراق.

3- الربيعي، الهام عبد الهادي خلف (2005). التأثير المضاد للتطفير لنباتي الجرجير ***Eruca sativa*** والجزر ***Daucus carota*** في نظامي البكتريا واللبائن. رسالة ماجستير– معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية للدراسات العليا– جامعة بغداد، العراق.

4- الشمري، علي عيسى عبد زنيد (2004). استخلاص وتنقية مركب اللكنان من بذور نبات الكتان ***Linum usitatissimum*** ودراسة قابليتة المضادة للتطفير على انظمة مختلفة. رسالة ماجستير– معهد الهندسة الوراثية والتقنيات الاحيائية– جامعة بغداد، العراق.

5- **Ames, B. N. and C. Yamafsky (1971). The detection of chemical mutagens with entaric bacteria. In "chemical mutagens principles and methods for their detection "Ed. A. Hollandr, Plenum: New York, 1: 267-382.**

6- **Abe, H. (2000). Review: Role of histidine related compounds as intra cellular proton buffering constituents in vertebrate muscle. Biochemistry (Moscow), 65 (7): 757-765.**

7- **Ames, B. N.; J. Mccamn and E.Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with *Salmonella mammalian* Microsome mutagenicity test. Mutation. Res., 31: 347-364.**

8- **Bhatt, A.; R. Green; R. Coles; M. Condon; and N. D. Connell (1998). A mutant of *Mycobacterium smegmatis* Defective in dipeptide transport. J. of Bacteriology, 180 (24): 6773-6775.**

9- **Boldyrev, A. A. (2000). Problems and perspective in studing the biological role of carnosine. Biochemistry (Moscow), 65 (7): 751-756.**

10- **Chan, K. M.; E. A. Decker and W. J. Means (1993). Extraction and activity of carnosine, a naturally occurring antioxidant in beef muscle. J. Food. Sci., 58 (1).**

11- **Chun wu, H.; C. Shiau; H. Chen and T. Chiou (2003). Antioxidant activities of carnosine, anserine, some free amino acid and their combination. J. Food and Drug Analysis, 11(2): 148-153.**

12- **Eckardt, F. and R. H. Haynes (1981). Quantitative measures of induced mutagenesis. Cited from: Stich, H. F. and San, R. H. C. (1981), Short-term tests for chemical carcinogens. Springer- verlog: New York.**
13- **European Patients Office (2000). Corrected european patent specification printed by Jouve, 75001 Paris.**
14- **Felkner, I. C. (1981). Microbial tester: Probing carcinogensis. Marcel Dekker, Inc: New York, Basel.**
15- **Hipkiss, A. R.; J. Michaelisand and P. Syrris (1995). Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide L-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. FEBS letters, 371: 81-85.**
16- **Hipkiss, A. R.; C. Brownson; M. F. Bertani; E. Ruiz; and A. Ferro (2002). Reaction of carnosine with aged proteins: another protective process? Ann. N. Y. Acad. Sci., 959: 285-94.**
17- **Horning, M. S.; L. J. Blakemore and P. Q. Trambley (2000). Endogenous mechanisms of neuroprotection: role of zinc, copper, and carnosine. Brain Res., 852 (1): 56-61.**
18- **Huang, S. and J. C. Kuo (2000). Concentrations and antioxidative activity of anserine and carnosine in poultry meat extracts treated with demineralization and papain. Proc. Natl. Sci. Counc. Roc (B), 24 (4): 193-201.**
19- **Kilbey, B. J. (1981). Ultraviolet mutagensis: A comparison of mechanisms in *E. coli* and yeast (*Saccharomyces cerevisioe*). Cited from: Felkner, I. C. (1981). Microbial testers: Probing carcinogensis. Marcel Dekker, Inc: New York, Basel.**
20- **Kim, S. B.; J. C. Kim; D. M. Yeum; and Y. H. Park (1991). Mut. Res., 254: 56-59. Cited from: European patent office 2000. Corrected european patent specification, printed by Jouve, 75001 Paris.**
21- **Knudsen, I, (Ed) (1986). Genetic toxicology of the diet. Alan R. Liss, New York**
22- **Krinsky, N. I. and S. M. Deneke (1982). Interaction of oxygen and oxy-radicals with carotenoids. J. Natl. Cancer Inst., 69: 205 -209**
23- **Kyriazis, D. and M. D. Bios (2003). Cross-Link breakers and inhibitors. http://www.antiaging-systems.com/home.htm.**
24- **Kyriazis, M. (2005). Carnosine the new antiaging Supplement. www.antiaging-systems.com.**
25- **Leifer, Z.; J. Hyman and H. S. Rosenkranz (1981). Determination of genotoxic activity using DNA polymerase-deficient of proficient *E. coli*. Cited from: Stich, H. F. and San, R. H. C. 1981. Short-term test for chemical carcinogens. springer-verlog, New York.**
26- **Macpherson, H. T. (1942). Modifid procedure for the colorimetric estimation of arginine and Histidine. Biochem. J., 36: 59-63.**
27- **Mcmahon, R. E.; J. C. Cline and G. Z. Thompson (1979). Assay of 855 test chemical in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. Cancer Res., 39: 682-693.**
28- **Nagai, K.; A. Niijima; T. Yamamo; H. Otani; N. Okumra; N. Tsuruoka; M. Nakai and Y. Kiso (2003). Possible role of L-carnosine in the regulation of blood glucose through controlling autonomic nerves. Experimental Biolog and Medicine, 228: 1138-1145.**
29- **Nagao, M.; T. Yahogi; T. Sugimura; T. Kosugo; K. Tsuji; K. Wakaboyoshi; S. Mizusokai, and T. Matsumoto (1977). Comutagenic action of norharman and harman. Proc. Jpn. Acad., 53 (2): 95-98.**
30- **Powrie, W. D.; C. H. Wu; M. P. Rosin and H. F. Stich (1981). Clastogenic and mutagenic activites of maillard reaction model systems. J. food. Sci., 46: 1433-1438.**

31- Shinohara, K.; R. T. Wu; N. Jahan; M. Tandka; N. Morinago; H. Murakami and H. Omura (1980). Mutagenicity of the browning mixtures by amino carbonyl reactions on *Salmonella typhimurium* TA 100. Agri. Biol. Chem., 44: 671-672.

32- Stich, H. F. and K. H. C. San (1981). Short-term tests for chemical carcinogens. Springer-verlog, New York.

33- Stvolnisky, S. L.; E. S. Pontesh.; V. L. Sergienko and A. A. Boldyrev. (1996). Immunomdulatary effects of carnosine in vitro and in vivo. Membr. and Cell Biol., 10 (3): 323-330.

34- Sugimura, T.; S. Sato; H.Ohgaki; S.Takayama; M. Nagao, and K .Wakabayashi (1986). Mutagens and careinogens in cooked food. Genetic Toxicology of the Diet .Ed .I .Knudsen.Alan R. liss, Inc., New York.

THE MUTAGEN AND ANTIMUTAGEN ACTIVITY OF CARNOSINE ASSESSED BY BACTERIAL SYSTEM 1: THE MUTATION CAPABILITY OF CARNOSINE AND SOME MAILLARD REACTION PRODUCTS

D. D. Salman **A. K. Al-darwash**

ABSTRACT

The effect of mutagencity, toxicity of carnosine and products from carnosine and amino acid reaction with fructose (milliard reaction) were studied by using bacterial system (G – system) that consisted of three isolates. namely, *Bacillus* spp (G_3), *Arthrobacter* spp. (G_{12}), *Brevibacterium* spp. (G_{27})

These isolate were characterized by sensitivity to both streptomycin and rifampcin. The Survival index (Sx) and induction of resistant mutant of streptomycin and rifampcin were considered in this study. Different concentrations of carnosine and milliard reaction products were used to study their genetic and cellular toxicity in the above mentioned bacterial systems. The study revealed that: The purified carnosine from chicken pectoral muscle with concentration of 50, 100 and 250 μg/ml showed neither cytotoxic nor mutagenic effects in bacterial systems. The products of lysine-fructose reaction at concentrations of 1 and 5% showed resistance toward mutation of streptomycin in the three bacterial isolates, and mutant resistance to rifampcin in bacterial isolates G_{12} and G_{27}. However, products of argenine-fructose reaction at concentrations of 1 and 5% showed only mutant resistance to streptomycin in the three isolates, and the mutagenic activity of the products of Carnosine-fructose reaction was disappeared.

Part of Ph.D thesis of the first author.
College of Agric., Baghdad Univ., Baghdad, Iraq.