Iraqi Journal of Science

# تأثير المستخلص الخام لأوراق نبات لسان الحمل الكبير *Plantago major* في وراثة الخلايا اللمفاوية البشرية

**رغد ضياء عبد الجليل، شذى علي شفيق**
قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية. بغداد-العراق.

**الخلاصة**

أكدت النتائج أنخفاض كل من MI وBI معنويا عند أستخدام التراكيز العالية من المستخلص الخام بالمقارنة مع السيطرة ، في حين كانت التغيرات في كلا الفحصين غير معنوية عند استخدام التراكيز الأدنى التي تراوحت بين (1 – 100) مايكروغرام/مل وذلك عند معاملة الخلايا بالمستخلص لمدة ساعة واحدة وهي لذلك تراكيز غير سامة خلويا. وكانت هذه النتيجة مقاربة للنتائج التي ظهرت عند زيادة فترة الحضن لمدة 48 ساعة فكانت التراكيز غير السامة هي (1 – 10) مايكروغرام/مل. أن زيادة مدة تعريض الخلايا اللمفاوية للمستخلص المثيلي لمدة 72 ساعة أدى الى أنخفاض حاد ومعنوي في معامل التحول الأرومي BI ولجميع التراكيز المستخدمة في التجربة عند مقارنتها مع السيطرة.في الوقت الذي ظهرت تغيرات غير مهمة أحصائياً في معامل الانقسام الخيطي MI عند التراكيز الدنيا التي تراوحت بين (1 – 100) مايكروغرام/مل، اما التراكيز العالية فحدث تثبيط كامل لمعامل الأنقسام الخيطي MI . ولم يثبت أيضاً دور المستخلص في تحفيز الخلايا على التحول الارومي أو الانقسام بغياب المادة المشطرة PHA. كما تم أستخدام المستخلص الخام لأوراق النبات بأضافتها بدلا من مادة الكولجسين أظهرت النتائج وجود أنقسام خلوي متوقف عند الطور الأستوائي metaphase عند جميع التراكيز المستخدمة في التجربة. ولم توجد فروق مهمة أحصائيا لكل من دليل الأنقسام الخلوي M.I ومعامل التحول الأرومي BI بالمقارنة مع السيطرة المضاف اليها مادة الكولجسين. وأن أعلى نسبة لدليل الأنقسام الخلوي ومعامل التحول الأرومي كانت عند أستخدام المستخلص المثيلي الخام بالتركيز 100 مايكروغرام/مل إذ وصلت كل من الـMI وBI الى 5.418 و39.824 على التوالي وكان هذا الأرتفاع غير معنوياً بالمقارنة مع الكولجسين .

# THE EFFECT OF CRUDE *PLANTAGO MAJOR* LEAVES EXTRACT ON CYTOGENETIC OF HUMAN LYMPHOCYTES

**Raghad Deah Abdul Jalill Al-shybany, Shatha Ali Shafiq**
Department of Biology, college of science, university of AL Mustainsiriyah. Baghdad-Iraq.

**Apstract**

The results revealed the reduction effect of Mitotic Index and Blast Index by higher concentration after 1 hr. exposure time significantly but all of the lower concentration showed none significant changes on them. The same result was indicated when cells treated with exposure 10µg/ml of extract for 48h; BI was decrease. The extract has no toxic effect on lymphocyte at concentration 1 and 10µg/ml for 48h of treatment. After 72h of exposure time BI was significantly decreased while different values in MI were seen when cells treat with 1-100 µg/ml of extract. Moreover mitosis was inhibited at high concentrations of extract.

The effect of crude extract on human lymphocyte without mitogen (PHA) was studied at different exposure time showed no mitosis. Using different concentrations of crude extract in replacement of colchicin showed mitotic cell without any significance in comparison with control. Maximum mitotic index and blast index were appeared in 100µg/ml of crude extract (5.418, 39.824) respectively.

## المقدمة

نبات لسان الحمل الكبير *Plantago major* هـو احـد النباتات الطبية التي تمتلك العديد مـن الاسـتطبابات كمـواد مضادة للألتهابات وكمعدلات مناعية، مضادة للتأكسد والـذي يعود لعائلة plantaginaceae فصيلة الحمليـات. [1]، فقـد أستفيد من مستخلصـات الأوراق الجافـة لشـفاء الجـروح والحروق والتقرحات ولعلاج عدد كبير من الأورام السرطانية وهو مفيد لأضطرابات الجهاز الهظمي ولأمـراض الجهـاز التنفسي والقصبات الهوائية بالأضافة الى تأثيراتـه المسـكنة للآلآم وبالأخص الآم الجهاز العصبي ، كما أسـتخدم أيضـا لعلاج الأدمان على التدخين وهو فعال كمضادات حيوية لعدد من البكتريا [٢]. وأكتشف حديثاً فعاليته العالية في علاج مدى واسع من الأورام السرطانية، أذ أظهرت المستخلصات المثيلية الخام لعدة أنواع تابعة لجنس نبات لسان الحمل ومنها لسـان الحمل الكبير Plantago majior فاعلية تثبيطية عالية لخـط HepG2 لسرطان الكبد [٣] كما ظهر أن لمستخلصات المائية الخام لأوراق نوعين من لسـان الحمـل وهمـا P.majior وP.osiatico فعالية مضادة لعدة خطوط سرطانية كسـرطان أبيضاض الدم، سرطان العقد اللمفاويـة البشـري، سـرطان الخلايا الحرشفية للمثانة والكلية والمعدة والرئة، بالأضافة الى فعاليتها المضادة للفيروسات كفايروس HSV-2، ADV-11 كما أن لها تأثيرات محفزة مناعيا[٤]. أن المركبـات الفعالـة للنبات التي عزي أليها فعاليته المضادة للألتهابات والسرطان ولعمل المسرطنات هي: luteolin, nepetin, noscapine. يتركب كيميائيا مـن ثلاثـة أنـواع مـن الفلافونويـدات flavonoidوهي المركبات الفعالة الرئيسية فـي النبـات : luteolin, nepetin, noscapine وكلايكوسـيد الـ aucubinبنسبة ٢.٥% وcap-talpol بنسـبة ٠.٥-١.١ % ، كما يحتوي النبات على سكريات عديـدة : saccharose, fructose, sorbitol وعدة أنواع من الحوامض العضـوية : oleic, linoleic (seed), salicylic, caffeic, citric, ferulic, planteolitic, fumaric (leaf), وبعض أنـواع القلويـدات النباتيـة : plantagoninie, indicaine [٥]. وعزلت مركبات أخرى مـن النبـات مثـل : plantago couari acid, vanillic acid, oleanolic acid, linalool, ursolic acid, baiculein, baicalin بالأضافة الى الحامض apigenin وفيتامين c والبوتاسيوم [٦]. ولهذا النبات تأثيرات محفزة ومعدلة للمناعة [4].

فقد ذكر [٧] أن أستخدام المستخلص المثيلي الخام لأوراق نات لسان الحمل الكبير بتراكيز تراوحت بين (500-50µg/ml) أدت الى زيادة أنتاج الخلايا اللمفاوية لدم الأنسان كما أنه يزيد من أنتاج con-A وبشكل يعتمد على التركيز ومدة الحضن. كما أن كلاً من المستخلصات المائية الخام لنوعين من نبات لسان الحمل وهي نبات لسان الحمل الكبير ونبات plantago asiatica فعالية محفزة للمناعة ومعززة للأنقسام الخلوي للخلايا اللمفاوية لدم الأنسان عند أستخدامها بتراكيز أصغر من 50µg/ml وبالعكس حدث تثبيط للأنقسام الخلوي عند أستخدامها بتراكيز أكبر، وبذلك تعمل هذه المستخلصات كمركبات مغيرة للمناعة [٨]. وأكد [١] أن أضافة 0.4mg/ml و 0.2mg/ml الى مزارع نقي عظم الفئران الخلوية أدت الى زيادة

تراكيز الخلايا بشكل معنوي. وقيم [9] فعالية خمسة مركبات نقية عزلت من المستخلصات الخام لنبات لسان الحمل الكبير في الأنقسام الخلوي لخلايا وحيدة النوىmononuclear cells كالخلايا اللمفاوية والخلايا البلازمية لدم الأنسان، وأظهرت النتائج فعالية المركبات: chlorogenic acid, aucubin, ferulic acid, plantago coumaric acid, vanillic acid, في زيادة أنقسام الخلايا اللمفاوية، كما أبدت المركبات غير الذائبة بالماء مثل الـbaiculein, baicalin النتيجة ذاتها وتعد هذه المركبات محفزات مناعية والتي ربما يعزى اليها فعالية النبات في الطب الشعبي لمعالجة الألتهابات والأصابات البكتيرية والفايروسية وكمضادات للسرطان. وذكر الباحث ذاته أنه لم تؤدي مركبات أخرى معزولة من النبات ذاته مثل: oleanolic acid, ursolic acid, linalool الى زيادة الأنقسام الخلوي.

## المواد

### المواد الخاصة بتحليلات الوراثة الخلوية

جُهزت المحاليل وأجريت طرائق العمل وفقا لـ [١٠] وكما هو موضح في الفقرات الآتية الذكر:

**١. محلول المادة الموسمة 5-Bromo-2-deoxy-Uridine**

حضر هذا المحلول بأذابة 50 mg من المركب (Budr) في 100 ml ماء مقطر معقم، قسمت الى حجوم متساوية في قناني معتمة وتم حفظها في المجمدة تحت درجة ٤ºC يؤخذ منه 0.1 ml ليضاف الى انابيب الزرع الحاوية على 5 ml من الوسط الزرعي ليكون بذلك التركيز النهائي 10 µg/ml، وحفظ بدرجة حرارة – 20 م°.

**٢. البلازما البشرية Human plasma**

جُهز من عينات الدم العائدة لمجموعة ($AB^+$) ومثبطة حراريا (سخن بدرجة 56م° لمدة 30 دقيقة) مجهز من مصرف الدم بغداد.

**٣. الوسط الزرعي RPMI-1640**

لتحضير ١٠٠٠ ml من الوسط الزرعي، مزجت المركبات ادناه: 16.4g من مادة RPMI 1640، 20-10% من Human AB serum، 1ml من Streptomycin، 1ml من Gentamycin، 14 ml Sodium Bicarbonate solution، عدل الأس الهيدروجيني الى 7 وعقم الوسط بأستخدام المرشح Nalgen filter ذو سعة الثقوب 0.22 µm ووزع الوسط الزرعي على انابيب اختبار بمقدار 5 مل لكل أنبوبة. حفضت الأنابيب في الثلاجة وأستعملت خلال أقل من 14 يوما.

**٤. مادة Phytohemagglutinin (PHA)**

حضر أنيا بأذابة 1.5 ملغم من مادة PHA-P المجهزة من شركة Sigma في 3 مل من الماء المقطر المعقم، واخذ منه 0.1 مل ليضاف الى كل أنبوبة زرع حاوية على 5 ml من الوسط الزرعي ليصبح التركيز النهائي10 مايكروغرام/مل، وحفظ بدرجة حرارة – 20 م° .

**٥. الكولجسين Colchicin**

أذيب 0.5 mg من مسحوق االكولجسين في 10 مل من الماء المقطر وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال.

**٦. المحلول واطئ التوتر Hypotonic solution (KCl0.075M)**

أذيب 1.1175 غرام من KCl في 200 مل من الماء المقطر وحفظ بدرجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال، أستعمل بحالة دافئة بدرجة حرارة 37 م°.

**٧. المثبت Fixative**

حضر بالمزج الآني للميثانول المطلق مع حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) بنسبة 1:3 (حجم / حجم).

**٨. دارئ سورنسن Sorenson's buffer**

أذيب 9.47 غم من مادة $Na_2HPO_4$ مع 9.08 غم من $KH_2PO_4$ في لتر من الماء المقطر وحفظ في درجة حرارة 4 م° لحين الاستعمال .

**٩. صبغة كمزا Giemsa stain**

حضر المحلول الخزين (Stock solution) بإذابة 2غم من مسحوق صبغة الكمزا في 100 مل من الميثانول وحفظ في قنينة محكمة الغلق ومعتمة ومزج بجهاز المازج لمدة 24 ساعة، ومن ثم فلترت الصبغة بورق Whatman 1، وعند صبغ الشرائح الزجاجية أخذ 1 مل من المحلول الخزين وأضيف إليه 4 مل من محلول دارئ سورنسن في الفقرة أعلاه.

**١٠. محلول الفوسفات الفاعدي Alkaline phosphate buffer**

حضر بأذابة 28.2غم من فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين، 31.2غم فوسفات الصوديوم ثنائية الهيدروجين، و76.05غم فوسفات الصوديوم في لتر من الماء، ضبط الاس الهيدروجيني الى 11.

**١١. المايتومايسين Mitomycin c**

محلول بتركيز 250 مايكروغرام /مل أخذ 0.1 مل منه يضاف الى 5 مل من الوسط الزرعي، ليصبح التركيز النهائي 50 نانوغرام/مل.

## طرائق العمل

### جمع النبات وتحضير المستخلص النباتية

تم الحصول على الأوراق الجافة لنبات لسان الحمل الكبير من المعشب العراقي للنباتات والاعشاب الطبية/وزارة الصحة. طحنت الأوراق الجافة طحنا خشنا بوساطة جهاز الطحن، حفظت الأجزاء المطحونة في حاويات بلاستيكية نظيفة بعيدا عن الضوء والحرارة والرطوبة لحين الاستعمال. جرى تحضير المستخلصات الخام بأستخدام جهاز السكسوليت Soxhlet، وحسب الطريقة المتبعة في [١١]. وبأستخدام

المذيب methanol (70%). وزن المستخلص ثم قسم الى عدة أقسام وحفظ في قناني زجاجية معتمة ومحكمة السد تحت درجة حرارة 4°C، أستعمل المستخلص خلال مدة لاتزيد عن ثلاثة أشهر، وعند الحاجة اليه يتم تذويب 1غم من المستخلص الجاف في 10 مل من محلول داريء الفوسفات القاعدي P.B.S، وخفف بأستخدام المحلول نفسه وعقم من خلال ترشيحه بورق ترشيح Whatman 1، ثم أعيد ترشيحه بورق ترشيح nalgen filter ذات ثقوب بسعة 0.45 مايكروميتر ثم بورق ترشيح nalgen filter ذات ثقوب بسعة 0.22 مايكروميتر.

## تأثير المستخلص الخام لنبات لسان الحمل الكبير في الوراثة الخلوية للخلايا اللمفاوية البشرية.

### أولاً: دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الخام في دليل الأنقسام الخلوي Mitotic Index ومعامل التحول الأرومي Blast Index

أتبعت طريقة [١٢] في أجراء هذه التجربة وكالأتي:

- **سحب العينات والزرع**

١. تم سحب عينات الدم بشكل عشوائي من اشخاص أصحاء تراوحت أعمارهم بين 20-30 عام بوساطة محقنة طبية حاوية على محلول الهيبارين وبمقدار 5 مل من كل شخص. وأستخدمت في التجارب حالا وذلك بأضافة 0.1ml من مادة PHA المحضرة في الفقرة ٤ الى أنابيب حاوية على 5 مل من الوسط الزرعي RPMI المضاف اليها البلازما أو المصل. أضيف 0.5 مل من الدم الى محتويات كل انبوبة. ثم أضيف الى عدد من الانابيب تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية المحضرة، تم حساب تراكيز المستخلص النباتي بعد اضافتها الى الوسط الزرعي وكانت التراكيز المستخدمة كالآتي: 1 مايكروغرام/مل، 10 مايكروغرام/مل، 100 مايكروغرام/مل، 1 مليغرام/مل، 10 مليغرام/مل.

٢. تركت مجموعة اخرى من ألانابيب دون اضافة المستخلص النباتي، وذلك لأجراء بقية المعاملات، وحضنت جميع الانابيب في درجة حرارة 37 درجة مئوية.

٣. أضيفت التراكيز المحضرة نفسها من المستخلصات النباتية الى مجموعة أخرى من الأنابيب بعد مرور 24 ساعة من الزرع. ثم تركت في الحاضنة لمدة ساعة واحدة فقط، أخرجت الأنابيب من الحاضنة ونقلت الى جهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق، تم التخلص من الرائق وأبداله بوسط زرعي جديد، أعيدت الأنابيب الى الحاضنة لأكمال فترة الحضن لمدة 72 ساعة. وبذلك تكون مدة تعريض الخلايا للمستخلصات النباتية هو ساعة واحدة.

أضيفت التراكيز المحضرة من المستخلصات النباتية الى مجموعة ثالثة من الأنابيب المزروعة وذلك بعد مرور 24 ساعة من وقت الزرع الأصلي، ثم أعيدت الى الحاضنة لأكمال مدة الحضن البالغة 72 ساعة وبذلك تكون مدة تعريض الخلايا للمستخلصات النباتية هو 48 ساعة. وتركت مجموعة من الأنابيب دون اضافة أي مستخلص نباتي، وعدت هذه المعاملة كسيطرة سالبة، وأضيف الى مجموعة أخرى من الأنابيب المطفر مايتومايسين C بتركيز نهائي مقداره 50 نانوغرام/مل وعدت هذه المعاملة كسيطرة موجبة، مع مراعاة أن يثبت لكل تركيز نباتي 3 مكررات.

- **حصاد الخلايا**

تمت اضافة 0.1 مل من مادة الكولجسين المحضر في الفقرة 5 الى جميع الأنابيب وذلك قبل 15 دقيقة من انتهاء وقت الزرع الاصلى ، ثم اعيدت الأنابيب الى الحاضنة. وطردت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 2000 دورة في الدقيقة ثم تخلصنا من الرائق لنترك الخلايا المترسبة مع قليل من الوسط الزرعي في قعر الانبوبة . ثم تم رج الراسب جيدا ، وأضافة 10-5 ما من كلوريد البوتاسيوم 0.075 مولاري الدافيء اليه تدريجيا وبهدوء مع الرج المستمر. حضنت العينات في حمام مائي هزاز لمدة ساعة واحدة وبدرجة37 مئوية. نقلت العينات الى جهاز الطرد المركزي لمدة ١٠ دقائق وبسرعة 2000 دورة/ الدقيقة وتم التخلص من الرائق.

- **التثبيت fixation والغسل washing والتقطير dropping**

رج الراسب جيدا وأضيف اليه بضعة قطرات من المثبت fixitive المحضر آنيا من مزج ثلاثة حجوم من الميثانول methanol المطلق مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي glacial acetic acid على جدار الانبوبة مع الرج المستمر وأكمل الى حجم 5 مل. خلطت العينات

بوساطة الرجاج vortex ثم وضعت الانابيب في الثلاجة لمدة 90 دقيقة. ثم طردت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 2000 دورة في الدقيقة، تم التخلص من الرائق لتترك الخلايا المترسبة. أعيدت عملية التثبيت عدة مرات لحين ظهور اللون الرائق للعالق، وكمرحلة أخيرة أضيف المثبت بمقدار١ مل بعد آخر غسل. ثم حضرت شرائح جديدة ونظيفة وخالية من الدهون بوضعها في chromic acid لمدة ثلاثة ايام، اخرجت وغسلت بتيار من الماء الحار وبشكل جيد ثم بماء بارد وحفظت في الماء المقطر البارد غير المجمد. مزجت الخلايا جيدا قطرت الخلايا على الشرائح الباردة باستخدام ماصة Pasteur pipette من مسافة 0.5-1 متر وتركت لتجف.

- **التصبيغ والفحص المجهري**

تصبيغ الشرائح بشكل مباشر بأضافة ٥ مل من محلول صبغة كمزا المحضر في الفقرة 8 لمدة 2-2.5 دقيقة، ثم غسلت بداريء سورنسن، وتركت لتجف وفحصت تحت المجهر الضوئي؛ للكشف عن معامل الانقسام الخلوي (MI)، ومعامل التحول الأرومي (BI).

**ثانياً: دراسة تأثير المستخلص الخام كمواد محثة او موقفة لنمو الخلايا اللمفاوية البشرية**

استخدمت الطريقة الواردة في الفقرة ثانياً مع أجراء الاختلافات الآتية:

- تأثير المستخلصات النباتية كمواد محفزة لنمو الخلايا اللمفاوية لدم الانسان وفي هذة الحالة تم أستخدام المستخلصات النباتية بدلا من المادة المشطرة PHA وبأستخدام التراكيز الآتية: 1 مايكروغرام/مل و١٠ مايكروغرام/مل و١٠٠ مايكروغرام/مل و١ مليغرام/مل و١٠مليغرام/مل.
- تأثير المستخلصات النباتية كمواد موقفة لنمو الخلايا اللمفاوية لدم الانسان وفي هذه الحالة تم أستخدام المستخلصات النباتية بدلا من مادة الكولجسين وبالتراكيز كالآتي:1 مايكروغرام/مل و١٠ مايكروغرام/مل و١٠٠ مايكروغرام/مل و١ مليغرام/مل و١٠ مليغرام/مل.

**الاختبارات الخاصة بالتحليلات الوراثية**

- **دليل انقسام الخلايا Mitotic index (MI)**

تم حساب معامل الانقسام الخلوي حسب طريقة [١٣] اذ قسمت الخلايا التي في طور الانقسام metaphase على العدد الكلي للخلايا المفحوصة (1000) وكما في المعادلة الآتية :

MI = No. of mitotic cells /1000 X 100

- **معامل التحول الارومي Blastogenic Index**

هو النسبة بين الخلايا التي تم تحفيزها بالمشطر(PHA) وتلك غير المحفزة في (1000) خلية،[١٤].

BI = No. Blast cells / 1000 cells X 100

## النتائج

**تأثير المستخلص الخام لأوراق نبات لسان الحمل الكبير في وراثة الخلايا اللمفاوية البشرية.**

**أولاً: تأثير المستخلص الخام في دليل الأنقسام الخلوي Mitotic Index ومعامل التحول الأرومي Blast Index للخلايا اللمفاوية البشرية ولفترات حضن مختلفة.**

- **التعريض لمدة ساعة واحدة**

أدت التراكيز العالية التي تصل الى 1 و١٠ ملغرام/مل الى أنخفاض معامل الانقسام الخيطي MI و معامل التحول الارومي BI معنويا عند مستوى احتمالية $P \leq 0.01$ بالمقارنة مع السيطرة عند حضن المستخلص لمدة ساعة واحدة مع الخلايا. ويلحظ من الجدول 1 أن جميع التراكيز المتراوحة بين 1– 100 مايكروغرام/مل أدت الى حدوث تغيرات غير مهمة أحصائيا لكل من معامل التحول الارومي BI ومعامل الانقسام الخيطي MI بالمقارنة مع السيطرة عند معاملة الخلايا بالمستخلص لمدة التعريض ذاتها وهي لذلك تراكيز غير سامة خلويا.

**جدول ١: تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الخام لنبات لسان الحمل الكبير في دليل الأنقسام الخلويMitotic Index ومعامل التحول الأرومي Blast Index للخلايا اللمفاوية البشرية ولمدة تعريض ساعة واحدة.**

| التركيز | B.I | M.I |
|---|---|---|
| 10 ملغرام/مل | $13.145 \pm 1.014^{B}$ | $3.1507 \pm 0.203^{B}$ |
| 1 ملغرام/مل | $29.25 \pm 8.734^{B}$ | $3.155 \pm 0.143^{B}$ |
| 100 مايكروغرام/مل | $40.799 \pm 6.515^{A}$ | $3.368 \pm 0.4899^{AD}$ |
| 10 مايكروغرام/مل | $38.05 \pm 9.734^{D}$ | $3.08 \pm 0.219^{A}$ |
| 1 مايكروغرام/مل | $45.571 \pm 1.161^{A}$ | $3.84 \pm 0.778^{D}$ |

| | | |
|---|---|---|
| 0 | 37.454 ± 3.288 $^{AD}$ | 3.297 ± 0.308 $^{AD}$ |

**الأرقام التي تأخذ نفس الأحرف عموديا غير معنوية عند مستوى ($P\leq 0.01$) والصحيح هو العكس .**
**كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاث مكررات.**

- **التعريض لمدة 48 ساعة**

أظهر المستخلص المثيلي سمية كبيرة للخلايا عند زيادة فترة الحضن الى 48 ساعة وذلك عند أستخدام التركيزين (1 و10) ملغرام/مل تمثلت بحدوث تثبيط كامل لكل من معامل التحول الأرومي BI ومعامل الأنقسام الخيطي MI. فيما أظهر أستخدام التركيز الأوطأ 100µg/ml أنخفاضا معنويا في BI وMI بالمقارنة مع السيطرة. في حين كان الأنخفاض غير معنوي في كل من الفحصين أعلاه عند التراكيز الواطئة (1 ملـايكروغرام/مل و 10 مايكروغرام/مل) عند مقارنتها مع السيطرة، وأعتبرت هذه التركيز غير سامة خلوياً، الجدول 2.

**جدول ٢: تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الخام لنبات لسان الحمل الكبير في دليل الأنقسام الخلوي M.I. ومعامل التحول الأرومي B.I. للخلايا اللمفاوية البشرية ولمدة 48 ساعة .**

| التركيز | B.I | M.I |
|---|---|---|
| ملغرام/مل10 | 0 $^{D}$ | 0 $^{B}$ |
| ملغرام/مل1 | 0 $^{D}$ | 0 $^{B}$ |
| 100 مايكروغرام/مل | 6.092 ± 4.916 $^{D}$ | 2.142± 1.566 $^{A}$ |
| مايكروغرام/مل10 | 20.912 ± 2.782 $^{B}$ | 3.161± .374 $^{A}$ |
| مايكروغرام/مل1 | 26.156± 2.407$^{AB}$ | 2.299 ± 0.182 $^{A}$ |
| 0 | 31.101 ± 9.365 $^{A}$ | 2.481 ± .15 $^{A}$ |

**الأرقام التي تأخذ نفس الأحرف عموديا غير معنوية عند مستوى ($P\leq 0.01$) والصحيح هو العكس .**
**كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاث مكررات.**

- **التعريض لمدة 72 ساعة**

أن زيادة مدة تعريض الخلايا اللمفاوية لمستخلص المثيلي لمدة 72 ساعة أدى الى أنخفاض حاد ومعنوي $P\leq 0.01$ في معامل التحول الأرومي BI ولجميع التراكيز المستخدمة في التجربة عند مقارنتها مع السيطرة. ويتبين من الجدول 3 أن جميع التراكيز التي تراوحت بين 1 مايكروغرام/مل -100 مايكروغرام/مل أدت الى حدوث تغيرات غير مهمة أحصائياً في معامل الانقسام الخيطي MI عند معاملة الخلايا بالمستخلص المثيلي لمدة 72 ساعة، الجدول 1. في حين أظهر المستخلص سمية كبيرة للخلايا عند التراكيز العالية التي وصلت الى١٠٠-١ ملغرام/مل تمثلت هذه السمية بحدوث تثبيط كامل لمعامل الأنقسام الخيطيMI.

**جدول 3: تأثير تراكيز مختلفة من المستخلص الخام لأوراق نبات لسان الحمل الكبير في دليل الأنقسام الخلوي M.I. ومعامل التحول الأرومي B.I. للخلايا اللمفاوية البشرية ولمدة تعريض 72 ساعة.**

| التركيز | B.I | M.I |
|---|---|---|
| 10 ملغرام/مل | 0 D | 0 $^{C}$ |
| ملغرام/مل1 | 3.361± .225 $^{D}$ | 0 $^{C}$ |
| 100 مايكروغرام/مل | 3.327± .715 $^{D}$ | 1.573±1.366 $^{B}$ |
| مايكروغرام/مل10 | 12.307± 3.062 $^{C}$ | 5.801±5.526 $^{B}$ |
| مايكروغرام/مل1 | 16.947± 2.02 $^{BC}$ | 2.637± .353 $^{AB}$ |
| 0 | 40.577± 8.094 $^{A}$ | 3.169± .243 $^{AB}$ |

**الأرقام التي تأخذ نفس الأحرف عموديا غير معنوية عند مستوى $P\leq 0.01$ والصحيح هو العكس.**
**كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاث مكررات.**

## ثانيا: تأثير المستخلص الخام كمواد محثة او موقفة لنمو الخلايا اللمفاوية البشرية

- **تأثير المستخلص كمادة محفزة لأنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية**

تم أستخدام المستخلص الخام لأوراق النبات بأضافتها بدلا من المادة المشطرة PHA. أظهرت النتائج عدم وجود أي تحفيز لأنقسام الخلايا اللمفاوية ولجميع التراكيز المستخدمة إذ كان دليل الأنقسام الخلوي ومعامل التحول الأرومي صفر%، ووجدت خلايا لمفاوية غير منقسمة فقط بالمقارنة مع السيطرة المعاملة بالمادة المشطرة PHA الذي وصل دليل الأنقسام الخلوي الى ٥.٦±٠.٦٤٥ معامل التحول الأرومي ٤٤.٦±٤.٤٣، وهذا دليل على غياب اللاكتين المحفز للأنقسام.

- **تأثير المستخلص كمادة موقفة لأنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية في الطور الأستوائي metaphase**

تم أستخدام المستخلص الخام لأوراق النبات بأضافتها بدلا من مادة الكولجسبن بأستخدام تراكيز عشرية أضيفت الى الوسط الزرعي المحضر الحاوي على الدم البشري المحفز بالمادة المشطرة PHA في النصف ساعة الأخيرة قبل أنتهاء وقت الزرع الأصلي البالغ 72 ساعة. ومقارنة النتائج مع السيطرة الحاوية على مادة الكولجسين كمادة موقفة لأنقسام الخلايا

اللمفاوية في الطور الأستوائي تارة، وتارة أخرى مع أنابيب أخرى تركت دون معاملة بالكولجسين أو بالمستخلص المختبر. أظهرت النتائج وجود أنقسام خلوي متوقف عند الطور الأستوائي metaphase عند جميع التراكيز المستخدمة في التجربة. ولم توجد فروق مهمة أحصائيا لكل من دليل الأنقسام الخلوي M I ومعامل التحول الأرومي B I عند مستوى احتمالية $P\leq0.01$ و$P\leq0.001$ بالمقارنة مع السيطرة المضاف اليها مادة الكولجسين . ويلحظ من الجدول 4 أن أعلى نسبة لدليل الأنقسام الخلوي ومعامل التحول الأرومي كانت عند أستخدام المستخلص الخام بالتركيز 100µg/ml إذ وصلت كل من الـ MI والBI الى ٥.٤١٨ و٣٩.٨٢٤ وكان هذا الأرتفاع غير معنوياً بالمقارنة مع السيطرة المضاف اليها مادة الكولجسين. ممايدل على ان المستخلص الخام للنبات له تأثير مشابه لمادة الكولجسين التي تضاف في نهاية دورة الخلية في الطور الأستوائي.

**جدول 4: يمثل تأثير المستخلص الخام كمواد موقفة لأنقسام الخلايا اللمفاوية البشرية في الطور الأستوائي metaphase عند أستخدامها كبديل لمادة الكولجسين**

| التركيز | B.I | M.I |
|---|---|---|
| 10 mg/ml | $9.667 \pm 0.94^{A}$ | $3.278 \pm 0.655^{A}$ |
| 1mg/ml | $26.863 \pm 8.887^{A}$ | $2.896 \pm 1.552^{AL}$ |
| 100µg/ml | $39.824 \pm 3.891^{A}$ | $5.418 \pm 2.395^{C}$ |
| 10µg/ml | $35.59 \pm 11.148^{A}$ | $3.537 \pm 1.175^{AC}$ |
| 1µg/ml | $37.816 \pm 52.589^{A}$ | $2.897 \pm 0.539^{AL}$ |
| $CL^{+}$ | $37.454 \pm 3.288^{A}$ | $3.297 \pm 0.308^{AC}$ |

**الأرقام التي تأخذ نفس الأحرف عموديا غير معنوية عند مستوى $P\leq 0.01$ و$P\leq 0.001$ والصحيح هو العكس .**
**الأشارة +CL تعني السيطرة المضاف اليها مادة الكولجسين.**
**كل قراءة تمثل الوسط الحسابي ± الانحراف المعياري لثلاث مكررات.**

## المناقشة

أكدت النتائج أنخفاض كل من MI وBI معنويا عند أستخدام التراكيز العالية من المستخلص الخام بالمقارنة مع السيطرة، في حين كانت الزيادة في كلا الفحصين غير معنوية عند استخدام التراكيز الأدنى التي تراوحت بين (1–100) مايكروغرام/مل وذلك عند معاملة الخلايا بالمستخلص لمدة ساعة واحدة وهي لذلك تراكيز غير سامة خلويا. وكانت هذه النتيجة مقاربة للنتائج التي ظهرت عند زيادة فترة الحضن لمدة 48 ساعة فكانت التراكيز غير السامة هي 1–10 مايكروغرام/مل أن زيادة مدة تعريض الخلايا اللمفاوية للمستخلص المثيلي لمدة 72 ساعة أدى الى أنخفاض حاد ومعنوي في معامل التحول الأرومي BI ولجميع التراكيز المستخدمة في التجربة عند مقارنتها مع السيطرة. في الوقت الذي ظهرت تغيرات غير مهمة أحصائياً $P\leq0.01$ في معامل الانقسام الخيطي MI عند التراكيز الدنيا التي تراوحت بين 1– 100 مايكروغرام/مل اما في التراكيز العالية فحدث تثبيط كامل لمعامل الأنقسام الخيط MI. دلت أبحاث عديدة فاعلية المستخلصات الخام لأوراق لسان الحمل الكبير كمضادات لمدى واسع من الأورام السرطانية. فقد أظهرت المستخلصات المثيلية الخام لعدة أنواع تابعة لجنس نبات لسان الحمل ومنها لسان الحمل الكبير *Plantago majior* فاعلية تثبيطية عالية لخط HepG2 لسرطان الكبد [3] كما ظهر أن المستخلصات المائية الخام لأوراق نوعين من لسان الحمل وهما *P.majior* و*P.osiatico* فعالية مضادة لعدة خطوط سرطانية كسرطان أبيضاض الدم، سرطان العقد اللمفاوية البشري، سرطان الخلايا الحرشفية للمثانة والكلية والمعدة والرئة، بالأضافة الى فعاليتها المضادة للفيروسات كفايروس HSV-2، ADV-11 بالأضافة الى تأثيراته المحفزة مناعيا [٤]. وقد عزل الباحثون عدة مركبات فعالة من المستخلصات الخام لأوراق نبات لسان الحمل الكبير وعزي أليها فعالية النبات المضادة للألتهابات وللسرطان ولعمل المسرطنات والمغيرة للمناعة ومنها: luteolin, nepetin, noscapine, linulool, ursolic acid, oleanolic acid [١٥، ١٦، ١٧]. لقد وجد من نتائج البحث الحالي أن وقت تعريض الخلايا اللمفاوية للمستخلص الخام تأثير في سمية هذه المعاملات حيث تزداد السمية طرديا مع زيادة وقت التعريض. بمعنى أن حضن التراكيز العالية من المستخلص مع الخلايا اللمفاوية في بداية الزرع ربما يؤدي الى غلق المستقبلات الخاصة بالمايتوجين PHA ويمنع أرتباطها مع مادة الـ PHA وبذلك لاتحفز الخلية اللمفاوية على الأنقسام، أو أنها ثبطت من عمل البروتينات الخلوية المسؤولة على الانقسام الخلوي ويؤيد هذا الرأي كون حضن الخلايا اللمفاوية مع المستخلص الخام لمدة ساعة واحدة لا يؤدي الى أيقاف الأنقسام الخلوي حتى وأن أزدادت تراكيز المستخلص. إن تأثير أي مادة مشطرة يكون من خلال العمل على تنشيط المادة الوراثية للخلية، إذ يتم تفعيل الجينات المسؤولة عن النمو وهي (Proto-oncogenes) لتبدأ بإعطاء الأوامر للدخول في الدورة الإنقسامية، وضمن فترة محددة

تعتمد على نوع الخلية وكفاءة المادة المحفزة، فربما تمكن المستخلص الخام من تفعيل جينات النمو لكن لم تتمكن الخلية من المرور بأطوارها الأربعة خلال الفترة الزمنية الاعتيادية اللازمة للانقسام، ومما يؤكد ذلك هو عدم الحصول على نتائج خلال مدة (72) ساعة من التنمية. وربما أثر المستخلص بشكل مباشر على عملية تضاعف الـDNA، وبصورة عامة ومن خلال ماسبق ذكره يُستنتج إن المستخلص الخام استطاع أن يحفز الخلايا على أن تبدأ بالتكاثر من خلال الدخول بالدورة الخلوية لتتحول من خلية في طور السكون إلى أورمات لمفاوية، إلا أن تلك الخلايا لم تتمكن من الوصول إلى مرحلة الإنقسام (Mitosis). ومما يؤكد هذا الرأي ماذكره [18] بأحتواء نبات لسان الحمل الكبير على مركب luteolin الذي يقوم بتثبيط تضاعف الـ DNA وبشكل يعتمد على التركيز، وذلك من خلال تثبيطه لفعالية cyclin-dependent kinase (CDK4) (CDK2)، ممايؤدي الىأيقاف دورة الخلية عند الطورG1 وذلك بعد معاملة الخلايا باللايوتين بتركيز 40 مايكرمول/لتر لمدة ساعتين فقط وبنسبة تثبيط بلغت 38%، وأن أستخدام التركيز ذاته لمدة ٢٤ ساعة أدى الى أيقاف دورة الخلية في طور G2/M. تحتوي المستخلصات الخام على خليط من المركبات الفعالة والتي قد يؤدي أستخدام التراكيز العالية الى تعطيل نفاذية الخلية من خلال تعطيل الفعالية المحفزة لأنزيم NaKATPase مما يعطل من عمل مضخة صوديوم بوتاسيوم الأمر الذي يؤدي الى فقدان نفاذية الغشاء البلازمي وهذا ما تفعله أغلب الكلايكوسيدات والتي أكدت اغلب الأبحاث على أحتواء هذا النبات عليها منها كلايكوسيد الـ aucubin الذي يوجد بنسبة 2.5% وcaptalpol بنسبة 0.5-1.1% [١٩]، الأمر الذي يؤدي الى السماح للمركبات الأخرى الى للدخول الى داخل الخلية والعمل على أحداث التشوهات في تسلسل القواعد النايتروجينية مما قد يؤدي الى توقف الأنقسام. ومما يؤكد هذا المعنى أن مركب aucubin الكلايكوسيدي أحد المركبات المضادة للألتهابات الموجود في لسان الحمل الكبير بالأمكان أن يتحال مائيا ليعطي مركب H-AU وهذا الأخير يعمل على تثبيط أنزيم Na/K-ATPase في الغشاء البلازمي مؤديا الى زيادة تركيز أيون الكالسيوم والصوديوم الخلوي ونقصان لأيون البوتاسيوم مما يسبب تحرير للسايتوكروم c cytochrome من المايتوكوندريا وبذلك تتعطل نفاذية الغشاء الخلوي [٢٠]. كما ذكر [٢١] أحتواء هذا النبات على الفوربول أستريز phorbol esters الذي يتفاعل مع غشاء الخلية ويغير من نفاذيتها مما قد يؤثر على دخول وخروج الأحماض الأمينية ومركبات أخرى والمنظمة لأيض الخلية. كما تم أستخدام المستخلص الخام لأوراق النبات بأضافتها بدلا من مادة الكولجسين بأستخدام تراكيز عشرية أضيفت الى الوسط الزرعي المحضر الحاوي على الدم البشري المحفز بالمادة المشطرة PHA في النصف ساعة الأخيرة قبل أنتهاء وقت الزرع الأصلي البالغ 72 ساعة. ومقارنة النتائج مع السيطرة الحاوية على مادة الكولجسين كمادة موقفة لأنقسام الخلايا اللمفاوية في الطور الأستوائي تارة، وتارة أخرى مع أنابيب أخرى تركت دون معاملة بالكولجسين أو بالمستخلص المختبر. أظهرت النتائج وجود أنقسام خلوي متوقف عند الطور الأستوائي metaphase عند جميع التراكيز المستخدمة في التجربة. ولم توجد فروق مهمة أحصائيا لكل من دليل الأنقسام الخلوي M.I ومعامل التحول الأرومي B I بالمقارنة مع السيطرة المضاف اليها مادة الكولجسين. وأن أعلى نسبة لدليل الأنقسام الخلوي ومعامل التحول الأرومي كانت عند أستخدام المستخلص المثيلي الخام بالتركيز 100 مايكروغرام/مل إذ وصلت كل من الـMI وBI الى 5.418 و39.824 وكان هذا الأرتفاع غير معنوياً بالمقارنة مع الكولجسين، مما يدل على ان المستخلص الخام للنبات له تأثير مشابه لمادة الكولجسين التي تضاف في نهاية دورة الخلية في الطور الأستوائي لتقطيع خيوط المغزل في هذه المرحلة مما يمنع الخلايا من أكمال دورة حياتها، وربما يكون للمستخلص الخام تأثير مشابه لهذه الميكانيكية. ومما يعزز هذا التفسير ماذكره الباحث [٢٢] من أن مركب noscapine وهو أحد القلويدات الرئيسية في نبات لسان الحمل الكبير يسلك سلوك مشابه لمركبي الكولجسين ومركب podphylloxin المسؤلان عن تقطيع خيوط المغزل في طور الـmetaphase وذلك عند أستعماله بتركيز 20µM ولمدة ٢٤ ساعة حضن، أذ أظهرت الخلايا شكل غير طبيعي لخيوط المغزل وفشل في تجمع الكروموسومات عليها كما وجد أن هذه الخلايا كانت ذات أقطاب متعددة وفي تجارب للباحث ذاته [٢٢] أثبت أرتباط مركب noscapine بشكل مباشر مع خيوط المغزل في مواقع معينة مختلفة عن مواقع أرتباط الكولجسين مع خيوط المغزل مما سببت فشل في تجمع الكروموسومات عليها، كما أن حضن المركب المذكور لمدة 48 ساعة حضن

أدى الى ظهور خلايا ذات أنوية متجزئة وغير طبيعية وقد عانت من الموت المبرمج.

**شكر وتقدير**

خالص شكري وأمتناني أقدمه للأستاذ الدكتور ناهي يوسف ياسين لما قدمه من توجيه سديد ونصائح قيمة كانت لها الأثر الكبير في إنجاح هذا العمل. كما أتوجه بالشكر الجزيل لجميع منتسبي المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية لمساعدتهم الطيبة في رفد متطلبات البحث العلمي بكل رحابة صدر.

## References

1. Velasco-lezama, R.; Tapia-Aquilar, R.; Roman-Romos,R.; Veqa- Avila, E.; peroz-Gutierrez, M.S. **2006**. Effect of plantago major on cell proliferation in vitro. *J. Ethnopharmacol*. 3; **103**(1):36-42.
2. Samuelsen, A. B. **2000**. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. *A review. J. Ethnopharmacol.* **71**:1-21.
3. Ruffa, M. J.; Ferraro, G.; Wagner, M. L.; Calcagno, M. L.; Campos, R. H. and Cavallaro, L. **2002**. Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. *J. Ethnopharmacol*. **79**:335-9.
4. Chiang, L. C.; Chiang, W.; Chang, M. Y. and Lin, C.C. **2003**. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of Plantago major and Plantago asiatica. *Am. J. Chin. Med.* **31**:225-34.
5. Rahn, K. A. **1996.** *phylogenetic study of the Plantaginaceae. Bota. J. of the Linnean Society* **120**: 145-198.
6. Chiang, L. C.; Chiang, W.; Chang, M. Y.; Ng, L. T. and Lin, C. C. **2003**. Antileukemic of selected natural products in Taiwan. *Am. J. Chin. Med.* **31**:37-46.
7. Gomez-Flores, R.; Calderon, C.L.; Scheibel, L.W.; Tamez-Guerra, P.; Rodriguez-Padilla, C.; Tamez-Guerra, R. and Weber, R.J. **2000**. Immunoenhancing properties of Plantago major leaf extract. *Phytother Res.* **14**(8):617-22.
8. Chiang, L. C.; Chiang W.; Chang, M.Y. and Lin, C. C. **2003**. In vitro cytotoxic, antiviral and immunomodulatory effects of Plantago major and Plantago asiatica. *Am. J. Chin. Med.*; **31**(2):225-34.
9. Chiang, L.C.; Ng, L.T.; Chiang, W.; Chang, M.Y. and Lin, C. C. **2003**. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species. *Planta Med.* **69**(7):600-4.
10. Yaseen, N. Y. **1990**. Cytogenetic study of human colorectal cancer cell. Ph.D. Thesis, Sheffield. Univ.
11. Simandi, B.; Kery, A.; Kristo, S. T.; Andras, C.; Prechi, A.; Fekete, J. **2001**. Supercritical fluid extraction of non-volatile terpenoids from medicinal plants. *Acta. Pharm. Hung.*, **71**: 318-324.
12. Verma, R.S.; Babu, A. **1989**. *Human chromosomes manual of basic techniques*. Pergamon. Press. pp. 240.
13. King, M.; Wild, D.; Gocke, E. and Eckhardt, K. **1982**. *5- Bromo.* deoxy uridine tablets with improved depot effect for analysis in vivo of SCE in bone marrow and spermatogonal cells. *Mut. Res.* (97): 117-129.
14. Stites, D. **1979**. Laboratory methods of detection cellular immune function. In: Basic and clinical immunology, Fundberg, H. H.; Stiter, D.; *Coldwell, J. (ed)*, LAGE, Medical publication, California**.**
15. Militao, G. C.; Albuquerque, M. R.; Pessoa, O. D.; Pessoa, C.; Moraes, M. E.; Moraes, M. O.; Costa-Lotufo, L. V. **2004**. Cytotoxic activity of nepetin, a flavonoid from Eupatorium ballotaefolium HBK. *Pharmazie*. **59**:965-6.
16. Aneja, R.; Zhou, J.; Zhou, B.; Chandra, R.; Joshi, H. C. **2006**. Treatment of hormone-refractory breast cancer: apoptosis and regression of human tumors implanted in mice. *Mol. Cancer Ther.* **5**:2366-77.
17. Selvendiran, K.; Koga, H.; Ueno, T.; Yoshida, T.; Maeyama, M.; Torimura, T.; Yano, H.; Kojiro, M.; Sata, M. **2006**. Luteolin promotes degradation in signal transducer and activator of transcription 3 in human hepatoma cells: an implication for the antitumor potential of flavonoids. *Cancer Res.* **66**: 4826-34.
18. Lim, D.Y.; Jeong, Y.; Tyner, A.; Park, J. H. **2006**. Induction of Cell Cycle Arrest and Apoptosis in HT-29 Human Colon Cancer Cells by the Dietary Compound Luteolin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **10**: Epub ahead of print.
19. Rahn, K. **1996**. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society* **120**: 145-198.

20. Mccoukey, D. J.; Lin, Y.; Nutt, L. K.; Huseyin, Z.; Ozel, A.; Newman, R. A. **2000**. Cardiac Glycosid stimulate $Ca^{+2}$ increases and apoptosis in androgen-independent, metastatic human prostate adenocarcenoma cell. *Amer. Assoc. Cancer Res*. **60**: 3807-3812.
21. Rizk, A. F. M. **1987**. *The chemical constituents and economic plants of the Euphorbiaceae.* In: Jury. S. L.; Reynolds, T.; Cutler, T.D.F.; Evans, F.J.; editors.
22. Keqiang, Y.; Yong, K.; Keshava, N,; Shanks, J.; Kapp, J. A.; Tekmal, R. R.; Petros, J. and Joshi, H. C. **1998**. Opium alkaloid noscapine is an antitumor agent that arrests metaphase and induces apoptosis in dividing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 17; **95**(4): 1601–1606.