تأثر مستخلصي عرق السوس وثمرة الكاكي في تثبيط الانحرافات الكروموسومية الناتجة من المعاملة بمادة كبريتيت الصوديوم في الخلايا اللمفية للإنسان

رحيم فاضل حسين، *مؤيد صبري شوكت، **عبد الأمير ناصر غلوب

قسم علوم الحياة، كلية العلوم، جامعة واسط. واسط-العراق.

* قسم التقنيات الاحيائية، كلية العلوم، جامعة بغداد. بغداد-العراق.

** قسم علوم الحياة، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية. بغداد-العراق.

الخلاصة

لدراسة دور مستخلصي عرق السوس *Glyceyrrhiza glabra* وثمار الكـاكي *Diospyros kaki* في تثبيط التشوهات الكروموسومية تم الكشف عن المركبات الفعالة في تلـك المستخلصـات اذ وجـد ان المستخلص الأول يحتوي على الكلايكوسيدات والتانينات والفلويدات والصابونينات والفينولات والراتنجـات والتربينات والستيرولات والفلافونات والكومارينات في حين أحتوى المستخلص الثـاني علـى الفينـولات والراتنجات فضلاً عن المركبات المذكورة أعلاه باستثناء الكلايكوسيدات والفلويدات والكومارينات.

ولتقييم التأثيرات التثبيطية لمستخلصات نبات عرق السوس وثمار الكاكي في التشـوهات الكروموسـومية الناتجة من تأثير كبريتيت الصوديوم بتركيز ٣٠ مايكروغرام/مللتر بصفته عاملاً مطفراً للخلايا اللمفاوية في الانسان خارج الجسم الحي (In Vitro) ومحفزاً للتشوهات الكروموسومية أذ عوملت الخلايـا اللمفاويـة للانسان المصابة بالتشوهات الكروموسومية بخمسة تراكيز من المستخلصات تحت الدراسة وهي: ١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/مللتر وتبين من النتائج ان هذين المستخلصين لهما فعالية تثبيطية للتشوهات الكروموسومية المستحثة بوساطة كبريتيت الصوديوم، وازدادت هذه الفعالية بزيادة تركيـز المستخلصـات وتداخلهما.

THE EFFECT OF *glycyrrhiza glabra* AND *DIOSPYROS KAKI* FRUITS IN INHIBITING THE CHROMOSOMAL ABERRATIONS RESULTED FROM SODIUM SULFATE TREATMENT IN HUMAN LYMPHOCYTE

Raheem F. Husain. *Muayad S. Shawket. **Abd- Alameer N. Galoob.

Department of Biology- College of Science- University of Waset. Waset-Iraq.

*Department of Biotechnology, College of Science, University of Baghdad. Baghdad-Iraq.

** Department of Biology, College of Science, University of Al- Mustanseriya. Baghdad-Iraq.

Abstract

To study the role of *Glycyrrhiza glabra* and *Diospyros kaki* fruits extracts, active compounds were detected. The first extract contained glycoside, tannines, alkaloids, saponines, terpines, steroides, flavones and coumarins, while the second extract contained phenolics and resins in addition to the compounds mentioned above with an exception of alkaloids and coumarins.

The inhibition effect of the extracts on the chromosomal aberration resulted from sodium sulfate as mutagenic agent in human lymphocyte cells (In vitro) was

evaluated at concentrations of 10, 15, 25, 50, 100 mcg/ml. Results showed increasing in inhibition of the extracts on chromosomal aberration with the increase of the concentrations used and its interaction.

البحث مستل من رسالة ماجستير

المقدمة

تتعرض الكائنات الحية للكثير من العوامل الملوثة المنتشرة في الطبيعة مثل المواد الكيميائية الصناعية والسموم المنبعثة من غازات المصانع اذ تكون هذه الملوثات ذات تأثير بايولوجي عالي يؤدي الى الاضرار بصحة الكائنات الحية المختلفة [١].

ويعد التلوث بالكبريت من اهم الموضوعات التي تناولتها الدراسات لايضاح مدى تأثيره في صحة الانسان بسبب دخوله في بعض المركبات في جسم الانسان واشتراكه في كثير من الصناعات وانبعاثه من مخلفات المصانع وظهوره في الامطار الحامضية، وتعد هذه العوامل اسباباً لزيادة التأثيرات الوراثية في اللبائن بشكل عام والانسان بشكل خاص اذ ظهرت امراض وراثية عديدة فشلت كثير من العلاجات في درئها فضلاً عن ان بعض العلاجات تعد احد العوامل المسببة للامراض الوراثية، لذلك التجأ العلم الحديث الى استخدام المركبات الطبيعية المفرزة من الكائنات الحية وخصوصاً النباتات لاستخدامها علاجاً للامراض الوراثية وعلى رأسها الامراض السرطانية [٢].

تعد مركبات الايض الثانوي المنتجة من النباتات ذات اهمية دفاعية ضد الأخطار الخارجية التي تتعرض لها تلك النباتات وهي في الوقت نفسه ذات اهمية علاجية للانسان في معالجة العديد من الامراض وتكمن اهميتها وقيمتها الطبية العالية كونها ذات مصدر طبيعي ذو تأثير فعال، وقد استخدمت المركبات النباتية هذه في دول عدة في علاج أمراض عديدة ناتجة من التشوهات الكروموسومية اذ يوجد حوالي ٩٠ نوعاً من هذه النباتات تستخدم علاجاً لهذا الغرض [٣]. ان المستخلصات النباتية الحاوية على المركبات الطبيعية في النبات والتي تكون ذات فعالية في علاج التشوهات الكروموسومية التي ينتج عنها امراض سرطانية كانت النقطة الرئيسية التي تم التركيز عليها من قبل الباحثين كونها اظهرت فعالية عالية في المجال الطبي والعلاجي للكثير من الامراض السرطانية فضلاً عن فعاليتها العلاجية ضد كثير من الخطوط الخلوية السرطانية [٤].

ان اول مركب طبيعي اكتشف من النبات هو مركب Taxol الذي يعد من اهم المركبات الطبيعية ذات الفعالية العالية ضد امراض سرطانية معينة وخصوصاً مرض اللوكيميا فضلاً عن المركبات المشتقة منه ذات الفعالية ضد سرطان الثدي والمبايض [٥].

ومن المركبات الطبيعية المستخدمة في علاج الامراض السرطانية المركب الفلويدي Camptothecin من ساق شجيرة Camptotheca ذو فعالية عالية في علاج سرطان المبايض في الفئران [٦].

كما وجد [٧] ان فلويدي Vinblastin وVincristin لهما القابلية في علاج الكثير من السرطانات من خلال تثبيط استطالة سلسلة بروتينات النيوبلين المكونة للهيكل الخلوي. في حين اكتشف [٨] ان مركبات Homoharringtonin ذات فعالية عالية ضد مرض اللوكيميا من خلال منع الخلية من الاستطالة اثناء الدورة الخلوية مسبباً الموت المبرمج لها.

- نبات عرق السوس *Glyceyrrhiza glabra* واهميته الطبية

ينتمي هذا النبات الى الجنس *Glyceyrrhiza* والتي تعني المذاق الحلو واهم انواعه هو النوع *glabra* الذي ينمو في العراق بكثرة ويحتوي على مواد فعالة ذات قيمة مهمة مثل حامض الكليسيرايزيك والصمغ والزيوت الطيارة والنشا والسكريات [٩]. يعد حامض الكليسيرايزيك من اهم المركبات الكيميائية الفعالة في نبات عرق السوس الذي يعطي المذاق الحلو للنبات وتركيبه الكيميائي ($C_{24}H_{62}O_{16}$) ويتواجد على هيئة املاح الكالسيوم والبوتاسيوم كما يحتوي النبات على مركبات اخرى مثل Triterpenoidsa ponin [١٠] وIsoflavones ومركب Triterpine sterols ومركب Coumarin، وIndols والزيوت الطيارة وBenzyldehyde [١١].

استخدمت مستخلصات عرق السوس لعلاج الاورام السرطانية الناجمة عن تشوهات كروموسومية او طفرات نقطية والانقسامات الخلوية غير الطبيعية فقد اشار [١٢] الى دور حامض الكليسيرايزيك والكافائين في علاج سرطان الجلد في الفئران، اما المركبات الفلافونية Flavonoid الموجودة في جذر عرق السوس فوجدت انها ذات فعالية عالية ضد سرطان البروستات من خلال منعها من تكون العوامل المؤكسدة

للـDNA او تحفيز انزيمات تثبيط دورة الخلية بارتباطها مع بروتينات تحفيز انقسام الخليـة فضـلاً عـن تثبـيط انـزيم (Topoisomerase) Topo 1 لنوع مـن الخـط الخلـوي السرطاني المأخوذ من سرطان البروستات [١١].

- نبات الكاكي *Diospyros kaki* واهميته الطبية

تتميز ثمـار الكـاكي بانهـا تحتـوي علـى مركبـي Isodiospyrin وDiospyring اللذين يمتلكان فعالية في علاج الامراض السرطانية [١٣] كما تحتوي الثمار علـى مركـب Naphthaquinon الذي خفض الاصابة بسرطان الجلد فـي الفئران بمقدار ١٠ مرات [١٤].

المواد وطرائق العمل

تحضير المحاليل

حضرت لهذه الدراسة المحاليل الاتية حسب ماورد فـي [15].

* محلول الكولجسين
* محلول سورنس
* محلول التثبيت
* محلول كلوريد البوتاسيوم
* صبغة كمزا
* محلول بيكاربونات الصوديوم
* محلول البنسلين
* محلول الستربتومايسين
* محلول النستاتين

تحضير بلازما الدم للانسان

بعد الحصول على بلازما دم الانسان من نوع AB مـن مصرف الدم في حالة مجمدة ونقلت بوساطة صندوق مبـرد، أذيبت في درجة حرارة الغرفة ثم ثبط المتمم في حمام مـائي بدرجة حرارة ٥٦م لمدة ٣٠ دقيقة بعدها فرغت في انابيـب سعة ٥٠ مللتر تحت ظروف معقمة ثم طردت مركزياً بسرعة ٧٠٠٠ دورة/دقيقة لمدة ٣٠ دقيقة بدرجـة حـرارة ٤ م ثـم حفظت في درجة حرارة -١٨ م لحين الاستعمال.

تحضير الوسط الزرعي RPMI -١٦٤٠ الخاص بزراعـة الدم

حضر لتر من الوسط الزرعي المغذي الكامـل باذابـة ١٠.٤ غرام من مسحوق الوسط الزرعي المجهزمن شـركة سكما Sigma في ٧٥٠مل من الماء المقطر المعقم، اضـيف ١٠ مللتر من محلول الحـامض الامينـي L-glutamin ذو تركيز mM ١٠ملي مولر واضيف ٤.٧٦ غرام مـن دارئ Hepes و١٥ مللتر من محلول بكربونات الصـوديوم و٠.٥ مللتر من كل من المضادات الحياتية البنسلين (اذيبت محتويات انبولة تحتوي على مليون وحدة دولية في ٥ مل مـن المـاء المقطر)، والستربتومايسين (اذيبت انبولة تحتوي ١ غم مـن المضاد في ٥ مل من الماء المقطر) والنستاتين (محلول خزين تركيزه ٥٠٠٠٠ مكغم/مل)، ضبط الرقم الهيدروجيني على ٧.٢، ثم اكمل الحجم الى ١٠٠٠ مللتر باستعمال الماء المقطر المعقم عقم الوسط باستخدام مرشحات غشائية بقطر ٠.٢٢ µ، حضن بدرجة حرارة ٣٧م مدة ٣ ايام للتأكد من خلـوه مـن الملوثات، وزع ٣- ٤ مل منه في انابيب اختبار معقمة بحجم ٤ مللتر لكل انبوب ثم اضيف ١ مللتر من البلازما البشـرية لكل انبوب بتركيز نهائي ٢٥ %، ثم حفظت بدرجة حرارة -١٨ م.

تحضير المستخلصات النباتية

تم الحصول على عرق السوس من حدائق جامعة بغـداد (الجادرية) وثمار الكاكي من الاسـواق التجاريـة جـاهزة. وحضرت المستخلصات كما يأتي:

* جففت عينات النباتات وقطعت الى قطع صغيرة .
* طحنت العينات الجافة وحولت الى مسحوق .
* اضيف لكحول الميثانول ٧٠%الـى مسـحوق العينـات النباتية بنسبة ٥:١ (١غرام من مسحوق النبـات الـى ٥ مللتر من المذيب كل على انفراد)، واستخلصت بوساطة جهاز السكسوليت Soxholate خلال مدة ٢٤ ساعة.
* ركـزت المستخلصـات بوسـاطة جهـاز المبخـر الدوارRotary Evaporator ووضعت في قناني محكمة الغلق وحفظت بدرجة -٢٠ م لحين الاستعمال .

الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية

* الكشف عن الكلايكوسيدات: استخدمت الطريقة المتبعـة من قبل [16] وظهور الراسب الاحمر دلالة على ايجابية الكشف.
* الكشف عن الفينولات والفلويـدات: اعتمـدت الطريقـة المتبعة من قبل [17] وظهور لون اخضر دلالـة علـى وجود الفينولات واللون الرصاصي دلالة علـى وجـود الفلويدات.
* الكشف عن التربينـات، والسـتيرويدات، والراتنجـات، والتانينات، والصابونيات، والفلافونات: وذلـك بتفاعـل

الكواشف الخاصة لكل مركب مع عينات من المستخلص يؤدي إلى ظهور لون بني، ولون ازرق، وعكورة، وراسب ابيض، ورغوة كثيفة، ولون اصفر على التوالي اعتماداً على الطريقة المذكورة من قبل [18].

* الكشف عن الكومارين: اتبعت الطريقة المعتمدة من قبل [19].

تركيز مادة كبريتيت الصوديوم المطفرة

استخدم التركيز ١٠٠ ملغرام/كيلوغرام من مادة كبريتيت الصوديوم Na_2So_4 بناء على ما جاء في [20].

دراسة التأثيرات السمية الوراثية الخلوية لكبريتيت الصوديوم في الخلايا اللمفية للإنسان بوجود مستخلص عرق السوس وثمار الكاكي كل على انفراد و تداخلهما باستخدام طرق تقانة الزرع المباشر للدم

درست التأثيرات الوراثية الخلوية على الخلايا اللمفية المحفزة على الانقسام اعتماداً على طريقة [21] مع بعض التحويرات كما يأتي :

أ. اضيف كبريتيت الصوديوم بتركيز نهائي قدره ٣٠ مايكروغرام/مللتر الى انابيب الزرع الحاوية على الوسط الزرعي المغذى الكامل RPMI-1640 وعدت سيطرة موجبة.

ب. اضيف ٠.٣ مللتر من العامل المشطر للخلايا اللمفية PHA Phytohemoagglutinin والمستحصل عليه من مركز بحوث السرطان والوراثة الطبية.

ج. اضيف مستخلص نبات عرق السوس بتراكيز نهائية مقدارها ١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/مللتر الى انابيب الزرع الحاوية على مادة كبريتيت الصوديوم والوسط الزرعي مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج (تم الحصول على هذه التراكيز باذابة ١٠٠٠ ملغم من المستخلص في ١مل من الماء المقطر واجري بعد ذلك تخافيف للحصول على تلك التراكيز).

د. اضيف مستخلص ثمار الكاكي بنفس التراكيز المذكورة في ج (وبالحجم نفسه) الى انابيب اخرى حاوية على مادة كبريتيت الصوديوم والوسط الزرعي مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج.

ه. اضيف مزيج من مستخلص عرق السوس وثمار الكاكي بنفس التراكيز وبحجوم نصفية والمذكورة في ج الى انابيب اخرى حاوية على كبريتيت الصوديوم والوسط الزرعي مع مراعاة الحجم النهائي للمزيج .

و. زرع ٥-٨ قطرات من الدم في انابيب حاوية على الوسط الزرعي دون اضافة كبريتيت الصوديوم والمستخلصات وعدت هذه المجموعة سيطرة سالبة.

حصاد الخلايا

استخدمت الطريقة المتبعة من قبل [15] في عملية حصاد الخلايا لتهيئتها لعملية التصبيغ والفحص.

التقطير و تصبيغ الشرائح الزجاجية

حضرت الشرائح الزجاجية بتقطير العالق عليها باضافة ٨ قطرات من على ارتفاع ٣٠-٥٠ سم. ثم صبغت بعد جفافها تماماً بصبغة كمزا ، فحصت الشرائح الزجاجية المصبوغة بالمجهر الضوئي على القوة ١٠٠ X لغرض دراسة التغيرات الكروموسومية اذ استخدمت ٤ شرائح لكل نموذج وحسب المتوفر من العالق [١٥].

التحليل الاحصائي

استخدم برنامج Statistical Package for Social Science (SPSS) بتطبيق تحليل التباين احادي الاتجاه (ANOVA) بين المعاملات وأعتمدت الفروق المعنوية بمستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

النتائج والمناقشة

١- الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات النباتية:

اثبت الكشف الكيميائي النوعي للمركبات الفعالة عن احتواء مستخلص عرق السوس و ثمار الكاكي مركبات مختلفة قد تعزى اليها الفعالية الحيوية لمستخلصي هذين النباتين واظهر الجدول ١ احتواء مستخلص عرق السوس على الكلايكوسيدات والتانينات والصابونيات والقلويدات والفلافونات والكومارينات والتربينات والستيرويدات باستثناء الفينولات والراتنجات فيما نلاحظ ان ثمار الكاكي لم تحتوي على الكلايكوسيدات والقلويدات والكومارينات عند اجراء الكشف الكيميائي النوعي على المستخلص. فقد اشارت الدراسات الى تأثير

الفلافونات والتربينات في الامراض السرطانية المختلفة اذ انها تمنع تكوين الجذور الحرة فهي تثبط فعالية بروتينات Formaylmethionyl leucyle phenyl alanin المسؤولة عن تحفيز تكوين الجذر السام Superoxide [١١، ٢٢].

جدول ١: الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات الكحولية الخام لنباتي عرق السوس و ثمار الكاكي

المركبات الفعالة	الكاشف	دليل الكاشف	عرق السوس	ثمار الكاكي
الكلايكوسيدات	بندكت	راسب أحمر	+	-
التانينات	خلات الرصاص خلات الحديديك	راسب أبيض أخضر مزرق	+	+
القلويدات	كاشف ماركيز	لون رصاصي	+	-
الصابونيات	الرج الشديد للمستخلص كلوريد الزئبق	رغوة كثيفة راسب أبيض	+	+
الفينولات	كلوريد الحديديك	لون أخضر	-	+
الراتنجات	ايثانول ٩٥% وماء محمض	عكورة	-	+
التربينات والستيرويدات	كلوروفورم و حامض	لون بني لون أزرق	+	+
الفلافونات	حامض الخليك اللامائي وإثانول + هيدروكسد البوتاسيوم	لون أصفر	+	+
الكومارينات	ورق الترشيح مرطب بهيدروكسيد الصوديوم + أشعة فوق البنفسجية	تألق لون أصفر	+	-

٢- تأثير كبريتيت الصوديوم في استحثاث التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للانسان:

تشير النتائج المبينة في الجدول ٢ الى حدوث التشوهات الكروماتيدية والكروموسومية عند استخدام كبريتيت الصوديوم بتركيز ٣٠ مايكروغرام/مللتر بلغت نسبتها ٧.٣% و٥.٣% في حين بلغت نسبة الكسور الكروماتيدية ٠.٠١٥% والكسر الكروموسومي ٠.٠١% في السيطرة السالبة والتي اظهرت فرقا معنويا مع السيطرة الموجبة عند احتمالية ($P\leq0.05$)، أما في حالة تأثير كبريتيت الصوديوم في الخلايا اللمفية فيتضح من الجدول نفسه حدوث تشوهات كروموسومية في الخلايا اللمفية النامية خارج الجسم الحي.

اذ اشار [٢٣] الى ان ثنائي اوكسيد الكبريت يعد من اهم مسببات التشوهات والتبدلات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للعاملين في حقول الكبريت. وجاءت هذه النتائج مقاربة لما حصل عليه [٢٤] اذ ظهر ان كبريتات الالمنيوم تسبب لاستحثاث التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية المزروعة خارج الجسم الحي وتزداد هذه التشوهات بزيادة تركيز الكبريت.

جدول ٢: النسبة المئوية للتشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للإنسان المعاملة بكبريتيت الصوديوم ومستخلصي عرق السوس وثمار الكاكي وتداخلهما (خارج الجسم الحي).

المجاميع المعاملة	الجرعة مايكوغرام / مللتر	التشوهات الكروموسومية	
		كسر كروماتيدي	كسر كروموسومي
		Mean ± S.E	Mean ± S.E
سيطرة سالبة	0	0.015 ± 0.013 d	0.01 ± 0.014 d
كبريتيت الصوديوم سيطرة موجبة	30	7.3 ± 1.03 c	5.3 ± 0.55 c
مستخلص عرق السوس	10	5.3 ± 0.8 b	3.7 ± 0.51 b
	15	5.1 ± 0.8 b	3.5 ± 0.71 b
	25	3.1 ± 0.5 ab	2.2 ± 0.38 ab
	50	2.1 ± 0.4 a	1.4 ± 3 a
	100	1.8 ± 0.38 a	1.1 ± 23 a
مستخلص ثمار الكاكي	10	6.2 ± 0.59 b	4.3 ± 0.66 b
	15	5.6 ± 0.1 b	4.0 ± 0.64 b
	25	3.7 ± 0.51 ab	2.3 ± 0.39 ab
	50	2.9 ± 0.67 a	1.8 ± 0.38 a
	100	2.2 ± 0.33 a	1.5 ± 0.4 a
تداخل مستخلصي عرق السوس وثمار الكاكي (مناصفة)	10	6.3 ± 0.93 b	4.4 ± 0.61 b
	15	6.1 ± 0.48 b	4.0 ± 0.64 b
	25	4.0 ± 0.64 ab	2.9 ± 0.54 ab
	50	3.4 ± 0.47 a	2.0 ± 0.47 a
	100	2.9 ± 0.45 a	1.5 ± 0.34 a

الحروف المختلفة (a, b, c, d) تعبر عن إختلاف معنوي باحتمال $p \leq 0.05$

ولاحظ [٢٥] ان نسب تكوين النوى الدقيقة في الخلايا اللمفية يزداد مع زيادة التعرض الى ثنائي اوكسيد الكبريت، وجاءت هذه النتائج متباينة مع نتائج مع ماذكره

[٢٦] بان التعرض لاكاسيد الكبريت ليس ذو تأثير معنوي للعاملين في بعض الاماكن التي تمتاز بانها تحتوي على تركيز عالٍ من الكبريت. في حين وجد [٢٧] ان التشوهات الكروموسومية في خلايا الدم اللمفية لعمال معمل كبريت المشراق كانت ضمن المدى المقبول بسبب تغير تركيز الجرع التي يتعرض لها العمال في المعمل. يعتقد ان المادة المشطرة للخلايا اللمفية تحفز هذه الخلايا على الانقسام بسبب تأثيرها في الجينات الورمية الاولية اذ يتم تنظيم الدورة الخلوية بوساطة بروتينات السايكلينات لتمر الخلية باطوارها الانقسامية الاربعة وتتمكن من الانقسام حتى لو ازيل العامل المشطر للخلايا اللمفية عن طريق غسل المزرعة واستبدالها بوسط تنمية اخر، فلذلك من المحتمل ان يكون كبريتيت الصوديوم قد تداخل مع عمل العامل المشطر للخلايا اللمفية وتسبب في فشل أكبر نسبة منها على الانقسام او يحتمل ان العامل المشطر للخلايا اللمفية حفز الخلايا على الانقسام ولكن تداخلت مركبات الكبريت مع بروتينات ذات أهمية للخلايا ومنعتها من الانقسام بل وتسببت في قتلها [٢٨].

٣- تأثير مستخلص عرق السوس في انخفاض التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للانسان المستحثة بكبريتيت الصوديوم:

بينت النتائج الموضحة بالجدول ٢ حدوث انخفاض في معدل التشوهات الكروموسومية مصاحبا لارتفاع تركيز مستخلص نبات عرق السوس فقد كانت في حالة الكسر الكروماتيدي قيمة السيطرة الموجبة ٧.٣% في حين بلغت قيمة الكسور ٥.٣ و٥.١ و٣.١ و٢.١ و١.٨% عند معاملة الخلايا اللمفية بمستخلص عرق السوس بالتراكيز ١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/مللتر على التوالي، واظهرت التراكيز الثلاثة الاولى فروقاً معنوياً مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة وباحتمالية $P \leq 0.05$ وكذلك التركيزين الرابع والخامس فضلاً عن ان هذين التركيزين اظهرا فروقاً معنوية عن التركيزين الاول والثاني بينما لم تظهر التراكيز الاول والثاني والثالث فروقاً معنوية فيما بينها، كما لم تظهر نتائج الكسر الكروماتيدي للخلايا اللمفية المعاملة بالتراكيز الثالث والرابع والخامس. اما في حالة الكسر الكروموسومي فقد كانت نسبة السيطرة الموجبة ٥.٣% في حين بلغت قيمة الكسر الكروموسومي ٣.٧ و٣.٥ و٢.٢ و١.٤ و١.١% عند معاملة الخلايا اللمفية بمستخلص عرق السوس بالتراكيز ١٠ و١٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/مللتر على التوالي. اذ اظهرت التراكيز الثلاثة الاولى فرقاً معنوياً مع معاملة السيطرة الموجبة وكذلك مع التركيزين الرابع والخامس فضلاً عن ان هذين التركيزين اظهرا اختلافاً معنوياً عن التركيزين الاول والثاني بينما لم تظهر التراكيز الاول والثاني والثالث فرقاً معنوياً فيما بينهما كذلك التراكيز الثالث والرابع والخامس.

يتضح ان مستخلص عرق السوس تسبب في انخفاض التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للإنسان والتي تم استحثاثها بوساطة كبريتيت الصوديوم وتدعم هذه الدراسة النتائج التي ذكرت في [١، ٢٩] والتي بينت ان الاشخاص الذين يتناولون عرق السوس يومياً وباوقات منتظمة تقل نسبة التشوهات الكروموسومية في خلاياهم اللمفية مقارنة مع الذين لا يتناولون هذا النبات في مناطق ذات تلوث عالٍ وان تأثير مستخلص عرق السوس كعامل مضاد للتطفير يكون بعدة اليات فمن المحتمل ان يعمل من خلال تأثير المواد الفعالة في المستخلص في تثبيط ايض المادة المطفرة او ربما من خلال تأثيرها في تصحيح الطفرة الناتجة بسبب بعض انواع المطفرات وذلك بتحفيز الجينات المسؤولة عن الية اصلاح DNA. كما ان لبعض المركبات الفعالة في مستخلص عرق السوس القابلية على اصلاح الطفرات الوراثية بسبب قدرتها على تثبيط تخليق RNA الخاص بتشفير البروتينات المسؤولة عن دورة الخلية.

كما بينت نتائج الدراسة الحالية مع [٣٠] التي اشارت الى قابلية المركبات الفلافونويدية الموجودة في عرق السوس في تثبيط التشوهات الكروموسومية في سرطان البروستات فضلاً عن ان المركب الفعال Isoliquiritigenin له القابلية على استحثاث الموت الخلوي المبرمج او ايقاف تكوين البروتينات الضرورية للطور G_1 في خلايا سرطان الثدي.

٤- تأثير مستخلص الكحولي في انخفاض التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للانسان المستحثة بكبريتيت الصوديوم:

نتج عن استخدام مستخلص ثمار الكاكي انخفاضاً معنوياً في نسبة التشوهات الكروموسومية مصاحبا لارتفاع تركيز المستخلص المستخدم، (جدول ٢). فقد بلغت نسبة الكسر الكروماتيدي في حالة السيطرة الموجبة ٧.٣% في حين كانت النسبة المئوية عند تعريض الخلايا اللمفية الى التراكيز١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/ ملليتر من المستخلص ٦.٢ و٥.٦ و٣.٧ و٢.٩ و٢.٢% على التوالي اذ اظهرت التراكيز الخمسة فروقاً معنوية في الكسر الكروماتيدي مقارنة مع السيطرة الموجبة عند احتمالية $P\leq0.05$، واظهر التركيزين الاول والثاني فرقاً معنوياً مع التركيزين الرابع والخامس بينما لم تظهر التراكيز الثلاثة الاولى فروقاً معنوية فيما بينها، كذلك بالنسبة للتركيز الثالث والرابع والخامس. اما في حالة الكسر الكروموسومي فقد كانت نسبتها في السيطرة الموجبة ٥.٣% وبلغت نسبتها ٤.٣ و٤٠ و٢.٣ و١.٨ و١.٥% عند استخدام تراكيز مستخلص ثمار الكاكي ١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/مللتر على التوالي، اذ يلاحظ ان هناك فروقاً معنوية في نسب الكسر الكروماتيدي بين التراكيز الخمسة والسيطرة الموجبة عند احتمالية $P \leq 0.05$ فيظهر الفرق المعنوي بين التركيزين الاول والثاني مع التركيزين الرابع والخامس بينما لم تظهر فروقاً معنوية بين التراكيز الثلاثة الاولى، وكذلك فيما بين التراكيز الثالث والرابع والخامس. ان تأثير مستخلص ثمار الكاكي في تثبيط التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية يتوضح من خلال قابلية المستخلص في عملية التثبيط بزيادة تركيزه اذ اشار [٣١] الى ان المركبات الفعالة التي يمتلكها مستخلص ثمار الكاكي وخصوصاً مركب Isodiospyrin لها القابلية العالية في تثبيط السمية الوراثية الخلوية لبعض انواع المسرطنات للخلايا اللمفية اذ يمكن ان تتشابه نتائج الدراسة الحالية مع [١٣] والتي تضمنت تثبيط تطور لوكيميا الدم في الخلايا اللمفية لبعض انواع المسرطنات خارج الجسم الحي. كما ذكر [٣٢] ان لمركب Isodiospyrin المتواجد في المستخلص الخام لثمار الكاكي السمية العالية لكثير من انواع الخطوط الخلوية السرطانية منها P-388 في لوكيميا الخلايا اللمفية وخلايا سرطان العنق.

ان المركبات الفعالية في ثمار الكاكي بشكل عام ومركب Isodiospyrin بشكل خاص لها الفعالية العالية في تثبيط التشوهات الكروموسومية من خلال قابلية المركب الفعال للارتباط مع انزيم Human topoisomerase I (h Topo I) وتثبيط فعالياته من خلال التأثير في الالتفاف الحلزوني الفائق للـ DNA، وتثبيط فعاليته الاخرى المتمثلة بعمليات فسفرة بروتينات SRP، ولوحظ انه كلما زاد التركيز المستخدم للمستخلص كلما زاد الارتباط بين المركب الفعال والانزيم h Topo I، ثم تأخذ عملية التثبيط بالاستقرار النسبي عند حد معين من تركيز المركب الفعال في مستخلص ثمار الكاكي وهذا يفسر الاستقرار في تثبيط الانحرافات الكروموسومية عند استخدامنا تركيز ١٠٠ مايكروغرام/مللتر من كلا المستخلصي بسبب تشبع انزيم h Topo I وعدم تواجد كميات كبيرة من هذا الانزيم ليكون الهدف في ارتباطه مع المركبات الفعالة، اما تفسير قلة تثبيط التشوهات الكروموسومية عند التراكيز الواطئة ١٠ و١٥ مايكروغرام / مللتر فقد يكون بسبب قلة تركيز المركبات الفعالة قياساً الى تركيز انزيم h Topo I مما يؤدي الى تثبيط نسبة قليلة من الانزيم. اما الانزيم المتبقي غير المثبط فسيكون مسؤولاً عن عمليات Splicing للخلايا الحاوية على التشوهات الكروموسومية [٣٣].

٥- تأثير التداخل بين مستخلص عرق السوس وثمار الكاكي في انخفاض التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية للانسان المستحدثة بكبريتيت الصوديوم:

اظهرت النتائج المبينه في الجدول ٢ حدوث انخفاض في نسبة التشوهات الكروموسومية عند استعمال مزيج (باحجام نصفية) من المستخلصين قيد الدراسة وانخفضت نسبة التشوهات في زيادة التراكيز المستخدمة فقد بلغت نسب الكسور الكروماتيدية ٦.٣ و٦.١ و٤.٠ و٣.٤ و٢.٩% عند استخدام التراكيز ١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/مللتر من مزيج المستخلص على التوالي وكانت ذات قيمة معنوية عند مقارنتها مع السيطرة الموجبة والتي بلغت ٧.٣%، فضلاً عن ان التركيزين الاول والثاني اظهرا فرقاً معنوياً قياساً مع التركيزين الرابع والخامس بينما لم تظهر فروقاً معنوية فيما بين التراكيز الاول والثاني والثالث. وكذلك الحال

فيما بين التراكيز الثالث والرابع والخامس وذلك على مستوى احتمالية $P \leq 0.05$.

اما في حالة الكسر الكروموسومي فقد كانت نسبته في السيطرة الموجبة ٥.٣% وعند مقارنتها مع قيم الكسور الكروموسومية في الخلايا اللمفية بتأثير مستخلصي عرق السوس وثمار الكلاكي فنجد انها ذات فرق معنوي اذ بلغت القيم ٤.٤ و٤.٠ و٢.٩ و٢.٠ و١.٥% عند استخدام التراكيز ١٠ و١٥ و٢٥ و٥٠ و١٠٠ مايكروغرام/ملليتر على التوالي، كما يلاحظ ان التركيزين الاول والثاني اظهرا فرقاً معنوياً قياسياً مع التركيزين الرابع والخامس بينما لم تظهر فروقاً معنوية بين التراكيز الاول والثاني والثالث. كذلك بين التراكيز الثالث والرابع والخامس.

ان انخفاض معدلات التشوهات الكروموسومية بعد المعاملة بمزيج النباتين تحت الدراسة يشير الى امكانية تنشيط انظمة الاصلاح في الخلية بعد حصول الطفرة ومن المرجح ان يكون ضمن آليات متعددة لامكانية وصف المزيج مثبطاً لاكثر من نوع من الطفرات بسبب اختزاله للتشوهات الكروموسومية في جميع عينات الدراسة فيمكن ان يقع المزيج ضمن المثبطات الحيوية Des-Mutagens والتي ترتكز اليه في عملها لاصلاح الضرر الناشئ بفعل المطفرات فتزيد قابلية نظام اصلاح الـ DNA من خلال تنشيط الانزيمات الخاصة بهذا النظام او انها تعمل بصفة عوامل اصلاح الضرر الوراثي [٣٤].

واشار [١] الى ان المزيج النباتي يكون له القدرة التثبيطية العالية للكثير من المطفرات مما يمكن ادراجه ضمن المثبطات الحيوية المباشرة Des-Mutagens فضلاً عن عملها الاخر بصفة Bio-Antimutagen ويمكن تفسير عملها التثبيطي المباشر من خلال قابليتها على التصرف بشكل عوامل غالقة او بصفة مضادات للاكسدة من خلال ازالتها للجذور الحرة او بتفعيلها لانزيمات Super Oxide Dismutase (SOD).

المصادر

1. Urkan, A. and Rena, G. **1999.** The inhibition of the genotoxic effect of environmental pollution and the aging processes by plant anti mutagens. *Traditional Biology*. **23**:135-142.
2. Al- Berikdar, Z. T. H. **2007**. Evaluation some Immunological, antimutagenic and hepatoprotective propertes of oregano leaves extracts *(Origanum vulgare)* CCL4-induce acute hepatic injury in albino male mice. An MSc. Thesis. College of Science. Al-Nahrain University .
3. DeRoch, A. B.; Lopes, R. M. and Schwartamann, G. **2001**. Natural production in anticancer therapy. *Curr, opin. Pharmacol.* **1**: 364-369.
4. Fransworth, N. R.; Akerele, O.; Bingle, A. S.; Soijarto, D. D. and Goz, Z. **1985**. Medicinal plant intherapy. *Bull. World Health organ.* **63**:956-981.
5. Wani, M. C.; Taylor, H.; Wall, M. E.; Goggon, P. and Maphail, A.T. **1971**. Plant antitumor agent, the isolation and structure of taxol a novel anti leukemia and antitumor agent from taxus brevifolia. *J. Amer. Chem. Society*. **39**: 2325-2327.
6. Tang, W. and Eisenbrand, G. **1992**. *Chinese drugs of plant origin*. 1st ed. Berlin. Heidelberg. pp.80-91.
7. Nobel, R. L. **1999**. *The discovery of the vince alkaloid chemotherapy agent against cancer. Biochem. Cell Bio.* **8**:1344-1351.
8. Zhou, D. C.; Zitton, R. and Mari, J. P. **1995**. Hommohrrage tonine an effective natural production in cancer chemotherapy. *Bull. Cancer*. **62**:987-995.
9. وزارة الزراعة والاصلاح الزراعي **١٩٧٤**. *الموسوعة النباتية العراقية*. **(٣)**:٤٤٥-٤٤٩.
10. Weerachai, P. and Duang, B. **1998**. Simple isolation and purification of glycyrrhizic acid. *J. Sci. Fac.* **25**:87-91.
11. Suzuki, F.; David, A. Schimtt, H.; Utsunomiya, T. and Pollard, R. B. **1992**. Stimulation of host resistance against tumor by glycyrrhizin, an active component of licorice root. *In vivo*. **6**:589-569.
12. Ken, Y.; Takido, M. M.; Takenchi, M. and Nakagawa, S. **1988**. Inhibitory effect of the glycerrhizic acid and cafein on two stage carcinogenesis in mice. *Biological abstract*. **86**:11207.
13. Chun, Y.; Chia, T. H.; Hasing, T. H.; Jin, S. S.; Tzong, T. C.; Woan, Y. T.; Yao, H. K.; Jacqualine, W. P.; Leory, F. L. and Jaualang, H. **2003**. Isodiospyrin as a novel human topoisomerase 1 inhibitor. *Biochemical. Pharmacol.* **66**:1981-1991.
14. Coving, J. K.; Venkataraman, B.; Harkuni, T.; Tajao, K.; Midori, T.; Junko, K.; Kiyoshi, T. and Hoyoku, N. **1997**.

Antitumor promoting effects of nophthoquinone.

15. Balasm, A.N. and Abdul-Sahib, K.A. **1991.** Establishment of dose response relationships between doses of Cs-137 Gama ray and frequencies of micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mulation research,* **259**:133– 38.

١٦. لشيخلي، محمد عبد الستار والعزاوي فريال حسن فياض **١٩٩٣**. *المركبات الطبيعية في النبات* . دار الكتب للطباعة والنشر. الموصل. ص ٢٢١-٢٢٤.

17. Haribon, I. **1973**. *Phytochemistry method of components*. Hall. London. pp.89-100.
18. Shihata, I. M. **1951**. A pharmalogical study of Angllis arsensis. Ph.D. thesis. Cairo University.
19. Geisman, T. **1962.** *Chemistry of flavonoid compound*. MacMailan . Com. New York.

٢٠. الميالي، اشواق عبد جبير **٢٠٠٠**. تأثير تداخل كبريتيت الصوديوم واوكسيد الخرصين على بعض مؤشرات الوراثة الخلوية في الفأر الابيض. رسالة ماجستير. كلية التربية / جامعة القادسية.

21. *Manual of basic techniques* program- on press. New York. pp.143-149.
22. Guang, C.; Hungwei, I.; Chunlie, W.; Koich, Y.; Massonobo, M.; Zhiyun, M.; Suixu, X. and Hiroyoki, K. **2002**. Effect of five flavinoid compound isolated from leaves of Diospyros kaki on stimulus induce super oxide generation and tyrosyle phosphorylation of portin in human neutrophile. *Clinic chimica acta.* **226**:196-175.
23. Yadav, J. S. and Kaushik, U. K. **1996**. Effect of sulpher dioxide exposer on human chromosome. *Mutat. Res.* **359**:25-29.
24. Roy, K.; Talukder, G. and Sharma, A. **1990**. Effect of aluminum sulphate on human leukocyte chromosome in vitro. *Mutate. Res.* **299**:179-183.
25. Meng, Z. and Zhang, L. **1990**. Chromosome aberration in lymphocyte worker exposed to sulpher dioxide-Mutat. *Res*. **241**:15-20.
26. Sorsa, M.; Kolmodin, H. and Jarventaus, H. **1982**. No effect of sulpher dioxide exposer in aluminum industry on chromosomal aberration or sister chromatid exchange. *Hereditas* **97**: 159- 161.

٢٧. الركابي، عبد الامير ناصر غلوب **١٩٩٠**. دراسة كروموسومات وصحة التكاثر للعاملين في حقول كبريت المشراق. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل.

٢٨. لدليمي، هند حسين عبيد **٢٠٠٦**. دراسة بعض التأثيرات الحياتية للكولسينات في الخلايا الطبيعية والسرطانية خارج وداخل الجسم الحي. اطروحة دكتوراه. كلية العلوم. الجامعة المستنصرية.

29. Kuroda,T. **1990**. *Ntimutagenesis study in Japan*. In: Kuroda,Y.; Shankel, D. M. and Wateree, M. D. *Antimutagenesis and snticarcinogenesis mechanism*. New York. London. pp.105-108.
30. Rosen, R. T. **2002**. Novel polyphenol molecule isolated from Licorice root (glycyrrhiza glabra) induce apoptosis G2/M1 cell cycle arrest and Bel-2 phosphorylation tumor line. *J. Agri. Food Chem.* **50**: 677-684.
31. Madhushree, D. S.; Ring, G.; Amerendar, P. and Bana, H. **2007**. Synthesis and antiproliferative activity of some novel derivative of diospyrin a plant derived naphthoquinone. *Bioorganic medicinal Chem.* **15**:3672-3677.
32. Yan, X.; Kuo, H. Lee, T. J.; Shih, T. S.; Chen, C. H.; Mephail, D. R.; Macphail, A. T. and Lee, K. H. **1989**. *Cytotoxicity component of Diospyrose morruan Phytochemisitry*. **28**:1514-1543.
33. Jamal, T.; Nadia, B.; Gohann, S.; Latifa, Z.; Banasri, H.; William, L.; Brigitte, B.; Amelie, B. and Christian, B. **2005**. Selective inhibition of topoisomerase I and various step of splisosome A assembly by Diospyrin derivative. *Mol Pharmacol.* **67**:118-119.
34. Bronzetti, G. **1997**. The role of antimutagensis and anticarcinogenesis. *J. Enviro. path. Toxical and Oncol*. **16**: 259-262.