التاثير الوراثي الخلوي للمستخلص المائي الخام لاوراق نبات العوسج *Lycium barbarum* على خلايا القمم النامية لجذور البصل *Allium cepa* L.

*بتول علي شهاب** *سمارة يعقوب** *علي حسين ادحيه***

تاريخ قبول النشر 2008/3/5

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة للكشف عن التأثيرات الوراثية الخلوية للمستخلص المائي الخام لأوراق نبات العوسج *Lycium barbarum* احد نباتات الفلورا ألعراقية على خلايا القمم النامية لجذور البصل بأستخدام ثلاث تراكيز (50,25,12.5) ملغم/مل ولثلاث فترات معاملة (6,4,2)ساعة وبالاعتماد على بعض معايير التحليلات الوراثية الخلوية وهي دليل ألانقسام ودليل الطور والزيغ الكروموسومي ولوحظ بأن المعاملة بالتركيز 50 ملغم/مل ولمدة 6 ساعات ادت الى خفض معدل دليل الانقسام الى دون 50% مما يدل على تأثيره السمي والشبة مميت وكذلك اظهر المستخلص قابلية تطفيرية حيث ظهرت حالات مختلفة من الزيغ الكروموسومي.

المقدمة:

أستعملت النباتات كدواء لالاف السنين (1) اصدرت منظمة الصحة العالمية WHO دراسة اوضحت ان حوالي 80% من سكان العالم ما زالوا يستعملون الطب الشعبي في العلاج (2). أنصب اهتمام العلماء في التركيز على النباتات الطبية التي ممكن ان تستخدم كعلاج للامراض(3) حيث وجد ان العديد من هذه النباتات تحتوي على الكثير من مركبات الايض الثانوي secondary metabolic compounds التي ممكن ان تستخدم ضد الاورام antitumor agents (4) او كعلاج ضد االاورام السرطانية اذ استخلصت مواد مثبطة لتكاثر الخلايا السرطانية مثل القلويدات كقلويد الكولجسين colchicine المعزول من نبات *colchicum autumnale* (5) او الكلاكوسيدات مثل podophyllotoxin المستخلصة من جذورالجنس *podophyllum* sp.(6) .

نبات العوسج *Lycium barbarum* احد نباتات الفلورا العراقية المنتشر بشكل واسع في العراق حيث يستخدم مغلي الاوراق كشاي وكذلك في علاج قروح الفم والحكة وامراض اللثة و الاسهال وتخفيف الالام الحيض (7). وجد ان الكلاكوسيدات المستخلصة من ثمار نبات العوسج ثبطت نمو احد الخطوط الخلوية لمرض ابيضاض الدم في الانسان وكذلك وجد انها تحث الخلايا على الموت المبرمج apopotosis وتزيد من سيولة الاغشية (8)كما ان هذه الكلاكوسيدات ثبطت تكاثر خلايا ورم الكبد للانسان من خلال ايقاف الدوره الخلوية في الطور S(9) اما تأثير

*جامعة بغداد / كلية العلوم للبنات / قسم علوم الحياة
** الوحدة البايلوجية للمناطق الحارة / جامعة بغداد

هذه الكلاكوسيدات على الجهاز المناعي لوحظ انها ادت الى زيادة في الفعالية البلعمية لخلايا البلعم الكبير Macrophage phagocytosis والى زدياد تكاثر الخلايا اللمفية للطحال وزيادة القابلية على انتاج الاضداد(10).

أما على المستوى الفسيولوجي فقد اظهرت الكلاكوسيدات لثمار هذا النبات القدرة على زيادة فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة antioxidant enzymes خصوصاً الانزيمين catalase, superoxide dismutase وبالتالي فأنها تمتلك القدرة على حماية الخلايا والانسجة الجسمية من الضرر الذي تسببه الجذور الحرة Free radicals(11) وانها تؤدي ايضاً الى تقليل محتوى الكولسترول الكلي في المصل والترايكليسرويدات Total cholesterol Triglyceride (12)أما (13) وجدوا ان هذه السكريات قد قللت من تأثير عقار mitomycin C المثبط لنقي العظم حيث وجدوا بأنها فعالة في اعادة العد الطبيعي لكريات الدم الحمر وخضاب الدم للفئران التي سبق وان جرعت بالعقار.

كذلك وجد ان اوراق نبات العوسج تحوي على العديد من المركبات الفعالة مثل alkaloids و Tropein و sesquiterpenes و الاخير من المركبات السامة والذي يستخدم في صناعة مبيدات الادغال (14).

أجريت هذه الدراسة لمعرفة التأثيرات الخلوية الوراثية للمستخلص المائي لاوراق نبات العوسج على القمم النامية لجذور البصل *Allium cepa* L من خلال دراسة عدد من المعايير الوراثية الخلوية وهي دليل الانقسام mitotic index ودليل الطور phase index والزيغ الكروموسومي chromosoma aberration.

المواد وطرق العمل:

حضرت المستخلصات المائية لاوراق نبات العوسج وبتراكيز(50, 25, 12.5) ملغم/مل (15) زرعت الابصال بعد تنظيفها جيداً في قناني مناسبة حاوية على ماء الحنفية وبعد نمو الجذور الى طول 1-0.5 سم نقلت الى قناني اخرى حاوية على المستخلص المائي وتركت لفترات معاملة مختلفة (2-4-6) ساعة وبعدها قطعت الجذور وحفظت في مثبت محلول كاروني (3 احجام كحول اثيلي : 1 حجم حامض الخليك الثلجي) المحضر انياً لمدة 24 ساعة نقلت بعدها الى قناني حاوية على 70% كحول اثيلي لحين الفحص . حضرت شرائح زجاجية بأستعمال صبغة اسيتوكارمين وفحصت 1000 خلية لكل مكرر اي 3000 لكل تركيز ولكل فترة معاملة.

استخرج المعدل العام لكل تركيز فضلاً عن جذور السيطرة (ماء فقط) وحسب دليل الطور ودليل الحالات الشاذة وفقاً لماورد (16) وحسب المعادلات التالية.

دليل الانقسام=(عدد الخلايا المنقسمة ÷ العدد الكلي للخلايا) ×100

دليل الطور=(عدد الخلايا الطور ÷ عدد الخلايا المنقسمة) ×100

دليل الحالات الشاذة =(عدد الخلايا الشاذة للطور ÷ العدد الكلي للخلايا في الطور نفسه) ×100

حللت نتائج البيانات احصائياً بأستخدام اختبار دنكن (17).

النتائج والمناقشة :

معدل دليل الانقسام ودليل الطور ونسبة الحالات الشاذة موضح في الجدول (1) حيث وجد ان معدل دليل الانقسام في جذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي لاوراق العوسج في التركيزين 12.5mg/ml و25mg/lml لم يختلفا معنوياً عن جذور السيطرة ولفترات المعاملة الثلاثة، اما

الجذور المعاملة بالتركيز 50mg/ml فقد اختلف معدل دليل الانقسام معنوياً عن جذور السيطرة للفترات (6،4 ساعات) حيث ادى الى خفض المعدل العام لدليل الانقسام لتلك الفترات الى اقل من 50% عند حسابه كنسبة مئوية من السيطرة(35.93, 47.43) على التوالي جدول (2) مما يدل على ان لهذا المستخلص تأثير سمي شبه مميت cytotoxic حيث اوضح كل من (20, 19, 18) بأن المواد او المستخلصات التي تسبب انخفاضاً في دليل الانقسام بنسبة 50% او اقل هي ذات تأثير سمي شبه مميت حيث اشار (15) بأن معاملة القمم النامية لجذورالبصل بمستخلصات ذات تراكيز مختلفة لكل من الحبة السوداء *Nigella sativa* وساق خناق الدجاج *Euphorbia helioscopla* والسماق *Rhus coriaria* والثوم *Allium sativum* قد خفضت دليل الانقسام الى اقل من 50% في فترة 6ساعات وقد يعود ذلك لاحتواء هذه المستخلصات على العديد من مركبات الايض الثانوي والتي وجد بان لها القابلية على خفض معدل دليل الانقسام من خلال ايقاف او تثبيط احدى مراحل الدورة الخلوية (21).

الجدول (2) يبين ان المعدل العام لدليل الطور كنسبة مئوية من جذور السيطرة اوضح زيادة في نسبة الطور الاستوائي 153.35% والطورين الانفصالي والنهائي 175.08% وذلك بسبب ظهور الكروموسومات المتميعة خاصة في التركيز 50mg/ml.

شكل(1) يبين الحالات الشاذه نتيجة المعاملة بالمستخلص حيث ان لزوجة الكروموسومات وتميعها يدل على تأثير المستخلص المائي لاوراق نبات العوسج على المادة النووية والبروتينات النووية حيث يؤدي الى تجمعها وتكتلها مما يمنع انتقالها الى الطور التالي واحتباسها في هذه الاطوار وربما ايضاً ان زيادة فترة التعرض للمستخلص يؤثر على المادة الكروماتينية مما يؤدي الى تميعها (23,22) وقد اشار(24) بأن المستخلص المائي لنبات المديد *convolvulus arvensis* الغني بالقلويدات قد ادى الى تميع الكروموسومات.

ان ظهور الكروموسومات المتميعة تعتبر حالة من حالات الزيغ الكروموسومي chromosome aberration حيث وجد ان المستخلصات تؤثر على مادة الدنا DNA وتؤدي الى تكسر اطراف الكروموسومات وفقدان مناطق telomeres مما يساعد على التحامها مع كروموسومات اخرى مماثلة في الضرر وايضاً نتيجة عدم بلمره الدنا DNA depolymerisation وانحلال البروتينات النووية المغلفة للدنا مما يؤدي الى حدوث كسر وتبادل بين الياف الكروماتيدات وبالتالي تكوين اشكال غير منتظمة ومتكتلة (27,26,25).

ان ظهور حالات تميع الكروموسوم في الطور الاستوائي تجعل عملية انفصال الكروماتيدات الشقيقة غير كاملة في الطور الانفصالي حيث تبقى متصلة بالجسور bridges (26,23) وان ظهور هذه الجسور ادى الى ظهور الانوية الصغيرة والتي هي نتيجة لتكسر الكروموسومات عند الانسحاب حيث تتكون قطع صغيرة عديمة السنترومير تبقى في وسط السايتوبلازم او بسبب الكروموسومات المتأخرة في الانسحاب lagging chromosome وذلك لتأثير المستخلص على خيوط المغزل والذي ادى الى تأخر ارتباط هذه الكروموسومات بالخيوط المغزلية او عدم ارتباطها(28) .

يمكن الأستنتاج من خلال هذه النتائج ان المستخلص المائي لاوراق نبات العوسج له قدرة تطفيرية على القمم النامية لجذور البصل.

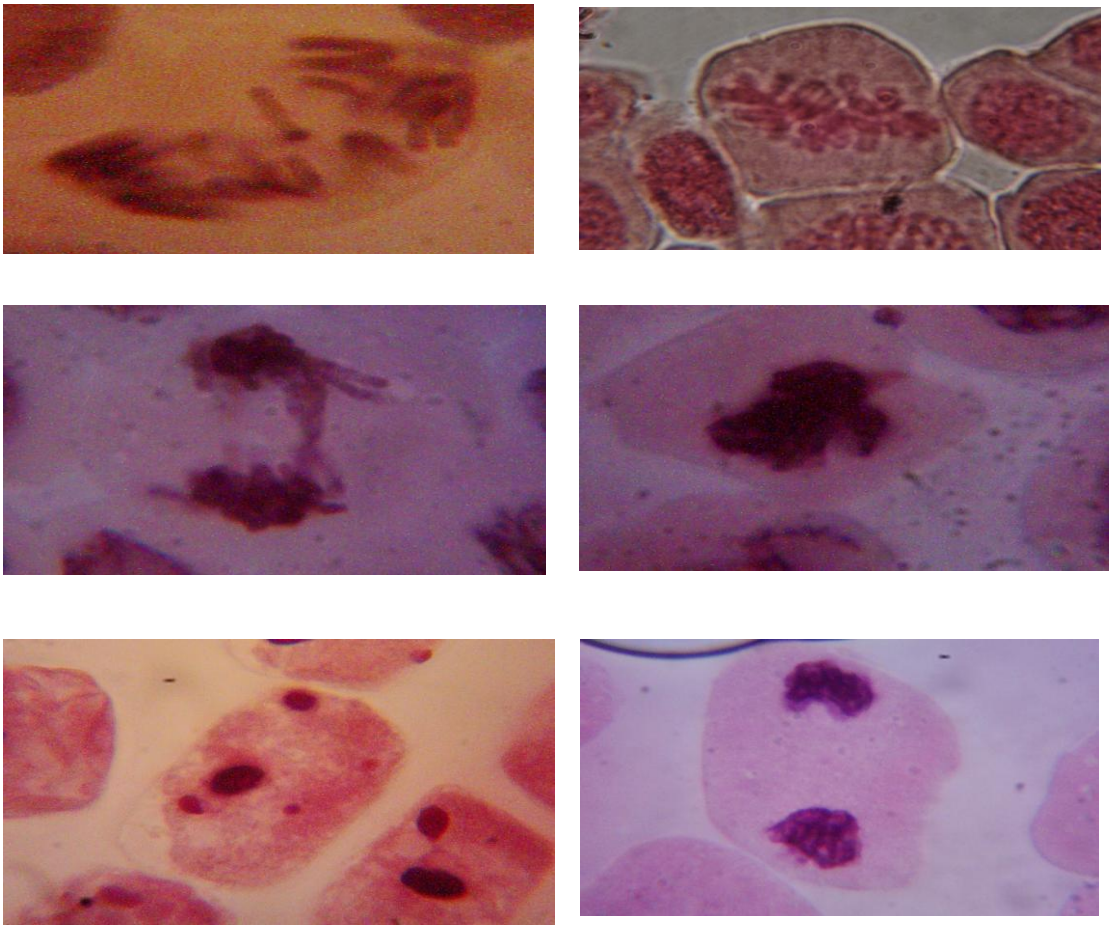
جدول (1) معدل دليل الانقسام ودليل الطور والحالات الشاذة، في خلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لأوراق نبات العوسج (*L. barbarum*)

الساعات	التركيز ملغم/مل	دليل الانقسام (%)	دليل الطور(%)			الحالات الشاذة(%)				
			التمهيدي	الاستوائي	الانفصالي والنهائي	استوائي متوقف	استوائي متميع	جسور	انفصالي ونهائي متميع	كروموسومات متأخرة
2	0.00	1.12 ±6.26 cde	54.36	16.71	28.91	–	–	–	–	–
	12.5	0.92±8.33e	66.21	18.65	15.12	–	2.17	–	–	–
	25	0.96±7.70 e	58.09	24.72	17.23	–	78.57	–	14.28	–
	50	0.60±3.90 abc	40.48	24.44	35.04	–	90.32	–	100.00	–
4	0.00	0.37±5.06 bcd	66.42	19.52	13.99	–	–	–	–	–
	12.5	0.53±3.53 ab	61.41	28.01	9.55	17.85	–	–	–	25.00
	25	0.61±3.66 ab	55.43	23.55	20.97	–	–	–	–	–
	50	0.72±2.40 a	41.08	31.23	27.64	–	100.00	66.66	100.00	–
6	0.00	0.65±6.40 de	62.82	21.27	15.88	–	–	–	–	–
	12.5	0.80±6.13 cde	60.93	22.95	16.08	2.38	–	–	–	–
	25	1.04±4.10 abcd	39.04	22.36	38.57	–	65.21	12.5	93.05	–
	50	0.01±2.30a	33.94	32.72	32.75	–	100.00	20.00	100.00	–

* الأحرف المختلفة تمثل فروقاً معنوية (الاحتمالية ≤ 0.05) بين معدلات العمود الواحد.

جدول (2): النسبة المئوية لدليل الانقسام ودليل الطور لخلايا القمم النامية لجذور البصل المعاملة بالمستخلص الخام لأوراق العوسج *L. barbarum*

التركيز	الساعات	دليل الانقسام (%)	الأطوار (%)		
			التمهيدي	الاستوائي	الانفصالي والنهائي
12.5	2	133.06	121.79	111.6	52.30
	4	69.76	93.96	143.49	68.26
	6	95.78	96.99	107.89	101.38
المعدل العام		99.53	104.24	120.99	73.98
25	2	123.0	106.86	147.93	59.59
	4	72.33	83.45	120.64	149.89
	6	64.06	62.14	105.12	243.19
المعدل العام		86.46	84.15	124.56	150.89
50	2	62.30	74.46	146.25	121.2
	4	47.43	61.84	159.98	197.56
	6	35.93	54.02	153.83	206.49
المعدل العام		48.55	63.44	153.35	175.08



شكل (1) خلايا القمم الناميه لجذور البصل المعاملة بالمستخلص المائي الخام لنبات العوسج

1- طور استوائي متوقف 2- كروموسومات متاخره في الانسحاب في الطور الانفصالي
3- لزوجه وتميع المادة النوويه في الطور الاستوائي 4- جسور وتميع الماده النوويه في الطور النهائي
5- تميع ولزوجة في الطور النهائي 6- - تجزء المادة النوويه
قوة التكبير (1000 x)

Reference

1. Ruffa,M.J.,Ferraro,G.,Wagner,M. L.,Calgano,M.L.,of Campos, R.H., 2002 .Cytotoxic effect of Argentina medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line . *J.Ethnopharmecal* .70 : 335 – 339 .
2. Cordell ,G.A. 1995.Changing strategies in natural products chemistry . *Phytochemistry* 40 : 1585 – 1612 .
3. Aydin,S.,Basaran ,A.A.& Basaran , N. 2004.The protective effects of some phenylethanoid glycosidase on the mitomycin C induced DNA strand break age. Itacettepe University , *Journal of faculty of pharmacy* 24 : 1 – 11 .
4. Estevez, A.,Marquina ,G. , Polanco , N. ,Contreras,D., 1976 . Antitumor substances from twenty –two Cuban plants . *Revista Cuban de farmacologia* 10: 223 – 227 .
5. Hastie,S.B., 1991. Interaction of colchicine with tubulin . *Pharmacol . Tner.* , 51: 377 – 401 .
6. Cragg,G.M.; Newman , D. J. , of weiss , R.B. 1997 .The worldwide exploration of nature for nove anticancer agents . *Oncol* : 24 : 156 – 163 .
7. الدبعي ، عبد الرحمن سعيد والخليلي ، عبد الولي احمـد، 1997، النباتـات الطبيـة والعطرية في اليمن ، انتشارها ، مكوناتها الفعالة ، اسـتخداماتها . مركـز عبـادي للطباعة والنشر ، صـنعاء ، الجمهوريـة اليمنية .
8. Gan , L. ; Wang , J.; &Zhang , S. ; 2001. Inhibition the growth of human leukemia cells by *Lycium barbarum* polysaccharide . *Wei – Sheng – Yan – Jiu* , 30 :333 – 5 .
9. Zhang , J.; Tian , Q. ; Yung , S. ; Zhou, S. ; 2005 . Metabolism and transport of oxazaphosphorines and the clinical implications . *Drug Metabolism Reviews* . 37 : 611 – 703 .
10. Li , G. ; Yang , J. ; Ren , B. ; & Wang , Z. 2002 . Effects of *Lycium barbarum* L. on mice caused by hypoxia . *Wei – Sheng – Yan – Jiu* , 31 ; 30 – 1.
11. Zhang , M. ; Wang , J. and Zhang , S. 2002. Study on the composition of *Lycium barbarum* polysaccharides and its effects on the growth of wealing mice . *Wei – Sheng - Yan – Jiu*. 31: 118 – 9.
12. Luo , Q.; Cai , Y. ; Yan , J.; Sun , M. and Cork , H. 2004. Hypoglycemic and Hypolididemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum* .*Life Sci.* , 26:137 - 49 .
13. Hai -Yang , G.; Ping , S. ; Li,J.I.;Chang - Hong, X. and fu., T. 2004. Therapeutic effects of Lycium barbarum polysaccharide (LBP) on mitomycin C - indaced myelosuppressive mice . *Journal of Exp. Ther . Oncol*. 4:181 - 7 .
14. Khalid,S.;Ahmed, T. and Shad , R.A. 2002 Use of allelopathy in aqriculture .*Asi.J.plant* Sci.1:292 - 297 .
15. العبيدي ، شيماء صباح مهـدي ،2004، تأثير بعض المستخلصات النباتيـة الخـام على الانقسام الخلوي . رسالة ماجسـتير . كلية العلوم للبنات .جامعة بغداد.
16. Becker, W.M. ;Kleinsmith , L.J.;and Hardin, J. 2003 .The World of the cell . 5th edition Benjamin Cummings Publishing Company . Inc. New York
17. Duncan , D.B. 1955 . Multiple range and multipile F. test. *Biometrics*, 1:1 – 45

18. Antonise - Wiez, D. 1990 Analysis of the cell cycle in the root mersitem of *Allium cepa* under the influence of Leda. Krin. Histochem . *Cytobiol*. 26: 76 - 96.

19. Panda , B.B.&Sahu, U.K. 1985. Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of *Allium cepa* . by the organe phosphorus insecticide Fensul fothion *Cytobios* . 42: 147 - 155 .

20. Sharma, C.B.S.R. , 1983. Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. *Curr. Sci*. 52:1000 – 1002

21. Mihara, M.;Shintani,S. ;Kiyota , A. ; Matsumura, T., and Wong, D.T.W. ; 2002 . Cyclin - Dependent Kinase inhibition suppresses growth and induced Apoptosis by regulating BCL - Xinhead& neck squamous cell carcinoma cells .*Int. Oncol.* 21:95 – 101

22. Yeong , F.M. 2004 . Anaphase , promoting complex in *Caenorhabditis elegans*. *Molecular&Cellular Biology*. 24:2215 - 2225.

23. Losada, A. & T.Hirano 2001 . Shapinathe metaphase chromosome Coordination of cohesion & Condensation. *Bio Essays* . 23:924 - 935.

24. القيسي ، بيداء عـــامر (2006).تـــأثير مستخلصـــات المديـــد Convolvulus arvensis L في تثبيط الانقسام الخلوي .رسالة ماجستير .كليـــة العلـــوم للبنـــات .جامعة بغداد.

25. Soliman , M.I. 2001. Genotoxicity testing of Neem plant (Azadirachta indica A. Juss.) using the *Allium cepa* chromosome abrration assay .*J.Biol* . *Sci.* 1:1021 - 1027 .

26. Badr, A.;Ghareeb,A.;El -din , H.A. 1992 .Cytotoxicity of some pesticides in mitotic cells of *Vicia faba* roots . *Egypt.J.Appl.Sci*.7:457 - 468 .

27. Chauhan, L.K.S.; Dikshith, T.S.S.&Sandararaman, V. 1986 . Effect of deltamethrin on plant cell. Cytobiological effects on the root meristems of *Allium cepa* . *Mut. Res*. 171:25 – 30

28. Singh, M.R. 1982.Effect of all with Maleic Hydrazide and Colchicine on root tip mitosis. *Cytologia* . 47:419 - 426.

Cytogenetic effect of crude aqueous extract from leaf of *Lycium barbarum* on root tip of *Allium cepa* L.

Batool A. shahab **** Samara N. yaqub*** *****Ali . H. Adhia ****

* Department of Biology – College of Science for Women – University of Baghdad.
** Tropical – Biological Research unit , College of Science , University of Baghdad.

Abstract:

This study was carried out to investigate the cytogenetic effects of crude aqueous extract of *Lycium barbarum* on the roots tip of *Allium cepa* Using three concentration 125, 25, 50 mg/ ml for 2, 4, 6 hours treatment periods.This study were included some cytogenetic analysis such as mitotic index , phase index and chromosome aberration. The data showed that the treatment with 50mg/ml for 6huors led to reduce the mitotic index less than 50% . This reduction considered to have toxic and sublethal effect . These results revealed mutagenic potency by inducing differents type of chromosome aberration.