تثبيط الفعالية التطفيرية للسايكلوفوسفومايد باستخدام مستخلص الشاي الاخضر

علي حمود السعدي
قسم علوم الحياة – كلية العلوم – جامعة بابل

(NJC)

(تاريخ الاستلام 23 /2/ 2009) **(تاريخ القبول 28 / 4 /2009)**

الخلاصة

يمتلك عقار السايكلوفوسفومايد CP تاثيرات وراثية ضارة اذا ما استخدم بجرع عالية , ولهذا السبب انجزت هذه الدراسة لتحديد هذه التاثيرات ومحاولة تقليلها باستخدام المستخلص الميثانولي لنبات الشاي الاخضر .فقد تم توصيف المستخلص باستخدام الـ (TLC) حيث اوضحت النتائج بانه يحتوي على اكثر من مكون . هذا وعند معاملة الفئران بجرع مختلفة من الـ (CP) تبين بان هناك علاقة مباشرة بين جرعة الـ (CP) ومستوى تحلل الـ DNA لخلايا الدم البيضاء , كما اظهرت النتائج بان اعطاء مستخلص الشاي الاخضر قبل الـ (CP) هو الطريقة المثلى للتقليل من النتائج الضارة للعقار في الـ DNA , وهذا يدل على ان المستخلص يعمل كعامل مضاد للطفرة داخل الخلية , في حين يعمل كعامل مضاد للطفرة خارج الخلية عندما يعطى مع الـ (CP) . ولوحظ بان معاملة الجرذان بالـ (CP) فقط ادت الى تقليل الـ MI (23.33) مقارنة بالسيطرة السالبة (39.33) . في حين ان اعطاء المستخلص قبل وبعد ومع الـ (CP) ادى الى رفع قيم الـ MI الى 25.66 , 30.66 , 34.33 على التوالي . واشارت الدراسات الكروموسومية لنقي العظم الى ان الـ (CP) (20ملجم/كم) يسبب زيادة في مستويات التشوهات الكروموسومية , وهذه تتضمن زيادة ونقصان في العدد الكروموسومي , الكروموسوم الحلقي ,الكسور الكروموسوميه والكروماتيديه وفي منطقة السنترومير ,وتشوهات اخرى.ولكن اعطاء مستخلص الشاي الاخضر قبل او مع المطفرادى وبشكل واضح الى التقليل من تلك التشوهات الكروموسوميه مقارنه بالسيطره الموجبه. لقد خلصت نتائج الدراسه الحاليه بان لمستخلص الشاي الاخضر فعاليه مضاده للتطفير عندما يعطى بجرعة 1جم/كجم قبل او مع الـ (CP).

مفاتيح الكلمات:مستخلص الشاي الاخضر,السايكلوفوسفومايد,تشوهات كروموسوميه.

Abstract

The drug cyclophosphamid CP has harmful genetic effects when used with higher doses. For this reason, this study was carried out to determine these harmful effects, and try to reduce these effects by using the metabolic extract of green tea. The extract was characterized using TLC .The results indicate that the extract contained various compounds. Rats were treated with different doses of CP and DNA extracted from WBC and analyses with DNA electrophoresis. The results showed that there was a direct relationship between the dose of CP and level of DNA lysis. The results also showed that giving the green tea extract before the CP is the best way in reducing the effects of CP on DNA. These results may indicate that the extract works as antimutagenic agent, while when given with the CP , the extract may works as desmutagenic agent. The MI results showed that treating the rats with CP alone reduced MI (23.33), when compared with the negative control (39.33) .
When the extract was given before the CP, MI was (34.33), while the MI was (30.66) and (25.66) when the extract was given with and after the CP, respectively.

Chromosomal studied in bone marrow cell of rats indicate that the CP at 20 mg / Kg causes increase in the level of chromosomal aberrations. These aberrations increase and decrease in the number of chromosomes, ring chromosome, brakes in the chromosomes and chromatiedes and in the centromere region, and other aberrations. However when the green tea extract was given before or with the CP the level of chromosomal aberrations was reduced in comparison with the positive control.

From the results of present study, we conclude that the green tea extract had antimutagenic effect when given at the dose of 1 g / Kg before and with the CP.

Key words: Green tea extract, Cyclophosphamid, Chromosomal aberrations.

المقدمة

يعتبر الشاي الاخضر مصدرا غنيا بالفينولات المتعدده (Polyphenols) وخصوصا الفلافينويدات (Flavonoids) وهي مجموعة من المركبات الفينوليه التي تمثل النكهه للشاي ويحتوي على 30% من الفلافينويدات في مادته الصلبه بينما يحتوي اقل من 5% من الخلاصه الصلبه الذائبه في الماء على اشباه الفلافانول[1]. ان الـ Catechins هي الفلافينويدات الفعاله بدرجه عاليه والموجوده في هذا النبات حيث تحتوي الاوراق على اربعة انواع رئيسيه من الـ Catechins كمركبات عديمه اللون ذائبه في الماء وهي(Epigallocatechin) وECG (Epicatechingallate) و EC (Epicatechin) و EGCG (Epigallocatechingallate) و EGC وتتاكسد معظم هذه المركبات المتواجده في الشاي الاخضر خلال عملية تصنيع الشاي الاسود بواسطة انزيم polyphenoloxidase وتتحول الى مركات برتقالية او بنية من TF (Theflavin) وTR(Thiarabigins) بينما يتم ازالة نشاط هذا الانزيم بواسطة الحرارة خلال عملية تصنيع الشاي الاخضر وهذا يفسر سبب الاختلاف بين الشاي الاخضر والاسود [2] .

يمتلك الشاي الاخضر مواد ذات فعالية عالية مضادة للاكسدة مقارنة مع بعض المواد الاخرى حيث اشار [3] الى ان EGCG الموجود بالشاي الاخضر من اكثرمضادات الاكسدة فعالية في منع التاكسد للدهون الناتج عن H2O2 او ايون الحديد على خلايا مخ الجربوع بالمقارنة مع مضادي الاكسدة Trolox و Melatonin . وفي دراسة تضمنت مقارنة بين فعالية الشاي الاخضر ونبات القنطريون (*Centaurim erythraea*) كمضاد للاكسدة قام بها[4] ضد كل من جذور الهيدروكسيل (Hydroxyl radicals) وحامض هايبوكلوريك Hypochlorous acid , بينت النتائج ان كل من منقوع نبات القنطريون والشاي الاخضر قد اظهرا خصائص مضادة للاكسدة على جذور الهيدروكسيل , بينما اظهر الشاي الاخضر فعالية اقوى على الحامض مقارنة بنبات القنطريون ولايعمل الشاي الاخضر على منع التاكسد فقط بل انه يعمل على التاثير على تكوين نواتج التاكسد للمركبات التي تحتوي على الدهون المشبعة . كما اشار بذلك [5] عند دراستهم كبد ومصل الدم والمخ للفار , اذ سمح في هذه الدراسة للفئران بالاستعمال الحر لخلاصة الشاي الاخضر المذابة في الماء لمدة 5 اسابيع , وقد احدثت المكونات الحيوية النشطة لخلاصة الشاي الاخضر في كبد ومخ الفئران انخفاضا شديدا في النواتج المختلفة لاكسدة الدهون من: MDA,(4hydroxynonenal) ,(Malondialdehyde) و (Lipidhydroperoxidase LOOH) 4-HNE .

ان الفعالية المضادة للتاكسد لـ EGCG للشاي الاخضر جعلته فعالا كعامل وقائي عصبي في علاج الامراض المسببة للانحلال العصبي (Neurodegenerative diseases) , وفي دراسة اجريت في الصين اثبتت قيمة التاثيرات الوقائية العصبية لـEGCG للشاي الاخضر على النموذج الخلوي PC12Cells لمرضى مرض باركنسون,وبينت النتائج في هذه الدراسه ان EGCG له تاثير مانع ضد الموت الخلوي الناتج عن الـ6-OHDA (6 Hydroxy dopamine) في خلايا PC12 وقد قللت مظاهر الموت الخلوي لـPC12 من مقدار تحلل الـDNA [6].

يعتبر عقار السايكلوفوسفومايد من مثبطات النمو ويستخدم في حالات زرع الاعضاء وذلك كمثبط للمناعه ويستخدم بصوره واسعه كعامل مضاد

للسرطان عن اعطائه بجرع معينه ، حيث يتطلب هذا العقار تنشيط ايضي بدائي إلى 4- hydroxyl Cyclophosphamide) 4-OH-CP) لتظهر فعاليته [7]. هـــذا ويـــؤدي السايكلوفوسفومايد الى عدد من التاثيرات الوراثيــه والفسلجيه حيث يحث على تولد سرطان الدم بالإنسان [8] . وتوصل [9] الى ان تعريض الفئران الحوامل لجرعات مشوهه خلقيا من العقار في اليوم الحادي عشر من الحمل يؤدي لكسر اشرطة الـDNA في الاجنه اثناء تطور الجنين ,ويؤثر العقار في الخلايا الجنسيه حيث يعمل على ربط اشرطه الـDNA بنوعين هما DNA-DNA inter strand cross – link و DNA-DNA intra strand cross – link في الخلايا الجنسيه لمبيض الجرذ [10] . وكذلك يحث العقار على التبادل الكروماتيدي الشقيقي, فقلد اشار[11] الى دور متياضات العقار (OH-CP -4) و (PAM) في زياده تكرار التبادل الكروماتيدي الشقيقي في الخلايا اللمفاويه للإنسان.

إن أهداف الدراسه الحاليه هي :

1. دراسـة تـاثير مطفـر الــCP فـي كروموسـومات خلايـا نقـي العظـم وفـي DNA خلايـا الـدم البيضـاء للجرذان .

2. محاولـه الحـد مـن تلـك التـأثيرات الضـاره لهـذا المطفر بأستخدام مستخلص الشـاي الاخضـر بـأجراء ثلاثة تداخلات قبل ومع وبعد المطفر لمعرفة ما اذا كان لهذا النبات تأثير وقائي او علاجي محتمل .

المواد وطرائق العمل

المواد

النبات المستخدم :

استخدم الشاي (*Camellia sinensis L.*) المجهز على شكل اوراق مجففة مجزاة من الشركة الصينية والـذي يحمـل العلامـة التجاريـة sporting نـوع Gunpoder .

حيوانات التجارب:

استخدمت في هذه التجربـة 15 جرذ أبيض (White albino rats) بعمـر 6 اسـابيع وتركـت على الاقل اسبوعين للتكيف مع ظروف المختبر قبل اجراء التجارب عليها .

طرائق العمل

حضر مستخلص الشاي الاخضر من الاوراق الجافة حسب طريقة [12] . وركز باستخدام المبخر الدوار (Rotary evaporator) ووضع في الحاضنة على درجة 50 م° للحصول على المستخلص الجاف .

توصيف مستخلص نبـات الشـاي الأخضر بواسطة كرمتوغرافيا الطبقـــة الرقيقـــة TLC

(Thin liquid chromatography)

نشطت صفائح السيليكا جيل (E. Merk, Germany, Darmstadt, 0.25ml, F254, 20X20) بوضعها في الفرن لمدة ساعة كاملة عند درجة حرارة 105 م° وتم وضع مايقارب 100 مايكروليتر من المستخلص في قاعدة الصفيحة (كـــررت عملية وضع العينة 3 مرات بفاصل يقارب 5 دقائق) واستخدم مزيج (ميثانول : ايثايل استيت : ماء مقطـــر , 20 : 60 : 20 v/v/v) كطور سائل لعملية الفصل واجريت عملية الفحص تحت الضوء المرئي والاشعة فوق البنفسجية [13] , حيث تم تحديد الـ Rf (Retradation Factor) للحزم المتكونة بالاضافة الى اللون وعدد تلك الحزم .

تحديد الجرعة المثالية للسايكلوفوسفومايد (CP) والشاي الاخضر (GT) :

تم استخدام التركيز الامثل للـ CP وهو الذي يمتلك اعلى قوة تطفيرية او سمية بحيث يتناسب مـع وزن الجـرذ والمتمثـل بـ20 ملجم/كجـم مـن وزن الجسـم [14] اما تركيز الـGT المثالي الذي يعمل على تعديل معامل الانقسام وتقريبه من مستوى معامل الانقسام في مجموعة السيطرة السالبة فقد كان 1 جم/كجم من وزن الجسم حسب [15].

اختبار تحلل DNA (DNA fragmentation):

اجري هذا الاختبار حسب طريقة Nie وجماعته[6] مـع اجـراء بعض التحويرات وبالاعتمـاد علـى الــ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضـاء للجـرذان تحت التجارب. فقد تـم تجريـب 7 جـرع متدرجـة مـن الـــ CP (5-10-15-20-25-30-35 ملجم/كلجـــم) لملاحظة مستوى تحلل الـ DNA مقارنة بالسيطرة السالبة . ثم اجري اختبار اخر تم فيه اعطاء الجرعـة 1 جم / كجم مـن المستخلص الميثـانولي للــ (GT) وتم التداخل مابين هذه الجرعة والـCP بجرعـة 20 ملجم / كلجم من وزن الحيوان حيث اعطى الـ CP قبل ومع وبعد المستخلص في ثلاثة تداخلات .

الاختبارات الخلوية لخلايا نقي عظم الجرذان :

اسـتخدم التركيـز الامثـل للــ CP والمتمثـل ب 20 ملجـم / كلجـم مـن وزن الحسـم ، امـا تركيـز الــ GT فكـان 1 جـم / كجـم مـن وزن الجسـم واختبـرت فـي ثلاثة تداخلات كالاتي :

التداخل الاول :

وفيه اعطي الـ CP بالتركيز الامثل 1جم /كجم قبل الـ CP بـ 24 ساعة بجرعـة واحدة وبعدها اعطـي الــ CP بـالتركيز الامثـل 20 ملجـم/ كجـم لمـدة 24 ساعة ثم قتلت الحيوانات (بعد 48 ساعة).

التداخل الثاني :

وفيـه اعطـي الــ GT مـع الــ CP فـي نفس الوقـت بـالتركيز الامثل لكـل منهمـا لمـدة 24 سـاعة فقـط ثـم القتل للحيوانات.

التداخل الثالث :

وفبـه اعطـي الــ CP لمـدة 24 سـاعة ثـم اعطـي الــ GT بعدها لمدة 24 ساعة اخرى ثم قتلت الحيوانـات بعـد 48 سـاعة . هـذا ويراعـى مجموعتي السيطرة

السالبة (جرذان غير معاملة بالـ CP والـ GT) والموجبة المتمثلة باعطاء الـ CP بالتركيز الامثل وبجرعة واحدة لمدة 24 ساعة فقط .

استخلاص الـ DNA من الدم : DNA extraction from blood

لاستخلاص الـ DNA من الدم اتبعت طريقة [16] ، إذ تم تقدير الـ DNA المحضر طبقا للمعادلة التالية :

(O.D.260)X(Dilution factor)X(50 mg/ml)=mg/ml

الترحيل الكهربائي للـ DNA على هلام الاجاروز : Agarose gel electrophoresis of DNA

اتبعت طريقة [17] .

تحضير كروموسومات نقي العظم :

لتحضير كروموسومات خلايا نقي العظم اتبعت طريقة [18] حيث يحقن الحيوان قبل القتل بثلاث ساعات بـ 0.25 مل من الكولجسين بتركيز (0.1 ملجـ ... onialy ... الكروموـ ... معامل ا...

معامل الا...

التحليل ...

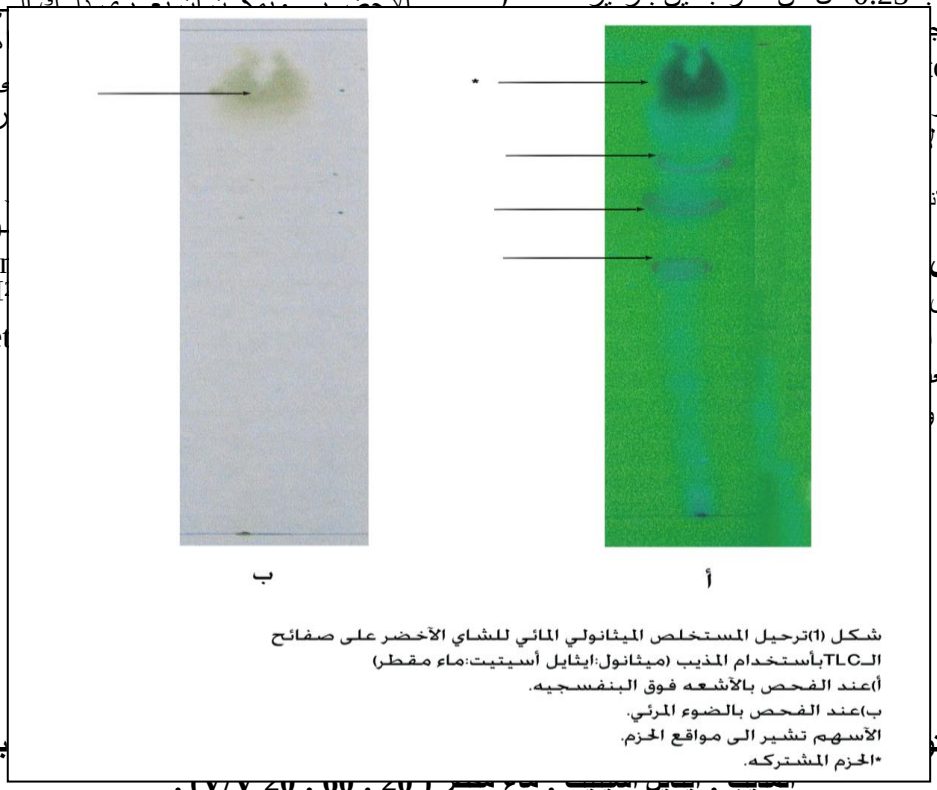
تم تحليل ... الحزمة ... فرق معـ ... والخطا ...

النتائج والمناقشة :

توصيف المستخلص الميثانولي للشاي الاخضر باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)

يبين الشكل (1) نمط ترحيل TLC للمستخلص الميثانولي للشاي الاخضر عند فحصه بالضوء المرئي والاشعة فوق البنفسجية التي تم تلخيصها في الجدول (1) الذي يبين خصائص الحزم من ناحية الـ Rf واللون وعدد الحزم الظاهرة , حيث يلاحظ ظهور حزمة واحدة عند الفحص بالضوء المرئي الـ (Rf = 0.91) واربع حزم عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية الـ (Rf = 0.50, 0.65, 0.76, 0.91) اذ تشترك الحزمة التي ظهرت عند الفحص بالضوء المرئي بالظهور عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية. حيث تبين هذه النتيجة وجود اكثر من مكون في المستخلص الميثانولي المائي للشاي الاخضر ... ويمكن ان يعزى ذلك الى احتواء ... همها الـ ... ى ان هذه ... راق و هذا ... ان هذا [1] ... يدات في ... ن5%من ... quercetin ... فقد بين [...] ... Met ... فضلا

شكل (1)ترحيل المستخلص الميثانولي المائي للشاي الأخضر على صفائح الـTLCبأستخدام المذيب (ميثانول:ايثايل أسيتيت:ماء مقطر)
أ)عند الفحص بالأشعه فوق البنفسجيه.
ب)عند الفحص بالضوء المرئي.
الأسهم تشير الى مواقع الحزم.
*الحزم المشتركه.



جدول (1) تـ... باستخدام ... المذيب : ايثايل اسيتيت : ماء مقطر (20 : 60 : 20 v/v) .

طريقة الفحص	خصائص الحزم		
	Rf	اللون	العدد
الضوء العادي	*0.91	بني مخضر	1
الاشعة فوق البنفسجية	0.050	ازرق فاتح	4
	0.65	اسود فاتح	
	0.76	ازرق	
	*0.91	اسود مخضر	

* الحزم المشتركة.

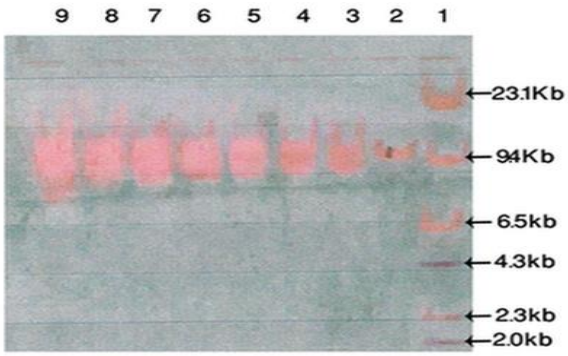
الاختبارات البايولوجية الجزيئية والوراثية الخلوية :

تحلل الـ DNA لخلايا الدم البيضاء للجرذان المعاملة بجرعة تدريجية من الـ CP :

يبين الشكل (2) مستوى تحلل الـDNA (50 ميكروجرام) المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان المعاملة بجرع تدريجية من الـ CP . لقد تم تلخيص نتائج هذا الشكل في الجدول (2) . اذ يلاحظ ان هناك علاقة طردية بين جرعة الـ CP ومستوى تحلل الـ DNA بحيث كان مستوى التحلل عند مقارنته مع السيطرة السالبة هو (0.4, 0.9 , 0.2, 1.6, 1.9, 2.3, 2.0) لكل من الجرع (5 ملجم/ كجم , 10 ملجم/ كجم , 15 ملجم / كجم , 20 ملجم/ كجم , 25 ملجم/ كجم , 30 ملجم/ كجم , 35 ملجم/ كجم) على التوالي. ويلاحظ ايضا بان عقار الـCP يؤدي الى تحلل في الـDNA بحيث ادت جميع الجرع الى ظهور مسح بأحجام جزيئية متباينة , بحيث يزداد تحلل الـDNA بأتجاه احجام جزيئية اصغر كلما زادت جرعة الـ CP تراوحت من (9.4 – 7.3) في حين اعطت السيطرة السالبة حزمة واحدة بحدود 9.8 Kbp .وقد يرجع سبب تحلل الـDNA الى ما ذكره [9] في ان تعريض الفئران الحوامل لجرعات مشوهة خلقيا من العقار يؤدي الى كسر اشرطة الـDNA اثناء تطور الاجنة ,هذاوقد اشير ايضا الى حدوث كسور اشرطة الـDNA في الخلايا اللمفاوية للاشخاص المصابين بسرطان الدم المزمن و كذلك الفئران المصابة بهذا المرض وخلايا نقي العظم للفئران الطبيعية اذا ما تعرضت لفترات طويلة نسبيا لهذا العقار [21] .

جدول (2) تأثير جرعات تدريجية من الـ CP في الـ DNA (50 ميكروجرام) المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان .

رقم المجال في الشكل (2)	جرعة الـ CP	الحجم الجزيئي التقريبي (Kbp)	مستوى التحلل بالمقارنة مع السيطرة السالبة
1	DNA الفيروس λ (15 ميكروجرام) المقطوع بأنزيم *Hin* dIII	6 حزم (23.1 , 9.4 ,6.5 , 4.3 , 2.3 , 2.0)	—
2	سيطرة سالبة	حزمة 9.8	0
3	5 ملجم / كجم	مسحة 9.8 – 9.4	0.4
4	10 ملجم / كجم	مسحة 9.8 – 8.9	0.9
5	15 ملجم / كجم	مسحة 9.8 – 8.6	1.2
6	20 ملجم / كجم	مسحة 9.8 – 8.2	1.6
7	25 ملجم / كجم	مسحة 9.8 – 7.9	1.9
8	30 ملجم / كجم	مسحة 9.8 – 7.5	2.3



شكل(2)مستوى تحلل الـ DNA (100ميكروليتر)(0.5ميكرو جرام/ميكرو ليتر)المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان المعاملة بجرع تدريجيه من الـCP.

1_DNAالفيروس λ المقطوع بانزيم *Hin dIII*والمستخدم كدليل حجمي .
2_سيطره سالبه (بدون معاملة).
3_معاملة بجرعة 5ملجم/كجم من الـCP.
4_معاملة بجرعة 10ملجم/كجم من الـCP.
5_معاملة بجرعة15ملجم/كجم من الـCP.
6_معاملة بجرعة20ملجم/كجم من الـCP.
7_معاملة بجرعة 25ملجم/كجم من الـCP.
8_معاملة بجرعة30ملجم/كجم من الـCP.
9_معاملة بجرعة 35ملجم/كجم من الـCP.

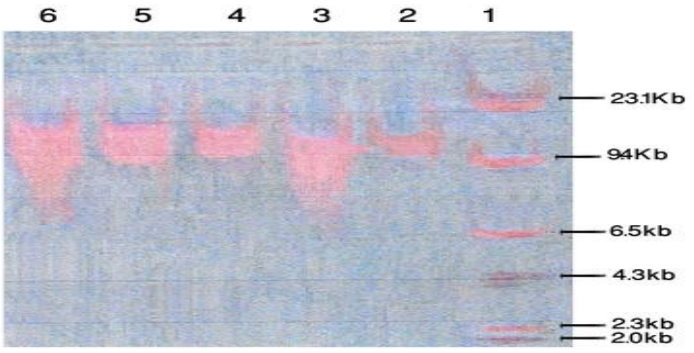
تحلل الـDNA لخلايا الدم البيضاء للجرذان لثلاثة تداخلات من مستخلص الـ GT 1 جم/ كجم والـCP 20 ملجم / كجم :

يبين الشكل (3) تحلل الـDNA (50 ميكروجرام) مستوى تحلل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء. لقد تم تلخيص نتائج هذا الشكل في الجدول (3) , اذ يلاحظ بأن المعاملة بجرعة 20 ملجم / كجم من الـCP ادت الى تحلل واضح في الـDNA بحيث اعطى مسحة تراوحت بين 9.8 – 8.2 Kbp , ومستوى تحلل بحدود 1.6 Kbp . اما عند اجراء التداخلات الثلاث فقد لوحظ بأن التداخل الاول ادى الى انخفاض مستوى التحلل الى 0.3 Kbp وادى التداخل الثاني الى انخفاض مستوى التحلل الى 0.6 Kbp , في حين لوحظ ان مستوى التحلل في التداخل الثالث كان مساويا الى السيطرة الموجبة (1.6 Kbp) . ان هذه النتيجة تدل على ان التداخل الاول هو الافضل في التقليل من مستوى التحطم في الـDNA ويليه في ذلك التداخل الثاني بينما لم يؤد التداخل الثالث الى اي تغيرات ايجابية ملموسة في منع تحطم الـDNA . وبالحصول على مثل هذه النتيجة يمكن تصنيف الشاي الاخضر كعامل مضاد للطفرة داخل الخلية (Antimutagenic) بالمرتبة الاولى ,فعند استخدام المستخلص قبل المطفر قد يعمل على غلق المواقع الحساسه في الـDNA عن طريق الاتصال بها ومنع المطفرمن الارتباط معها, ثم كعامل مضاد للطفره خارج الخليه (Desmutagenic) بالمرتبه الثانيه,اذ ان استخدام المستخلص مع المطفر مباشرة قد يعمل على منع الخليه من اخذ المطفر ومشتقاته من المتأيضات عن طريق تكوين معقدات معها وبالتالي طردها من الجسم ,او قد يعمل على قطع التفاعل الذي يتم من خلاله التنشيط التأيضي [23, 22]. ويبدو ان الفعاليه المضاده للأكسدة لهذا النبات جعلته قادرا من الحد من تحلل الـDNA, فقد اشار [6] الى ان الفعاليه المضاده للأكسده لمركبات EGCGللشاي الاخضر قادره على الحد من تحلل الـDNAالمتسبب عن 6-Hydroxydopamine . وفي دراسه لتنشيط الفعاليه التطفيريه للأشعه السينيه بأستخدام مستخلص هذ ا الشاي وجد [24] بان هناك فعالية جيده للمستخلص في الحد من تحلل الـDNA.

جدول (3) تأثير مستخلص الشاي الاخضر بجرعة 1 جم / مع الـ CP بجرعة 20 ملجم /كجم في الـ DNA (50 ميكروجرام) المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان .

رقم المجال في الشكل (3)	التداخل	الحجم الجزيئي التقريبي (Kbp)	مستوى التحلل بالمقارنة مع السيطرة السالبة (Kbp)
1	DNA الفيروسλ (15 ميكروجرام) المقطوع بأنزيم *Hin* dIII	6 حزم (23.1, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3 , 2.0)	-
2	سيطرة سالبة (بدون معاملة)	حزمة 9.8	0
3	سييطرة موجبة (معاملة بالـ CP فقط)	مسحة 9.8 – 8.2	1.6
4	تداخل اول (الـ GT ثم الـ CP)	مسحة 9.8 – 9.5	0.3
5	تداخل ثاني (الـGT ثم الـ CP)	مسحة 9.8 – 9.2	0.6
6	تداخل ثالث (الـ CP ثم الـ GT)	مسحة 9.8 – 8.2	1.6

دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي العظم



النتائج اعلاه تتفق مع ما توصلت اليه دراسات
سميه
عامل
Mعند
يدات
تحفيز
الكبد
اسطه
4-H
لنشط
ضاده
منع
سابين

شكل (3) مستوى تحلل الـ DNA(50 ميكروجرام) المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان لثلاثة تداخلات من مستخلص الـGT اجم/كجم والـCP 20ملجم/كجم.

1_DNAالفيروس λالمقطوع بأنزيم *Hin dIII* والمستخدم كدليل حجمي
2_سيطره سالبه (بدون معامله).
3_سيطره موجبه (معامله بالـCPفقط).
4_تداخل اول (الـGTثم الـCP) .
5_تداخل ثاني(الـGTمع الـCP) .
6_تداخل ثالث(الـCPثم الـGT).

س

تداخل ثاني	3	0.84	30.66 ± 1.47

تداخل ثالث	**3**	**1.76**	**25.66 ± 3.05**

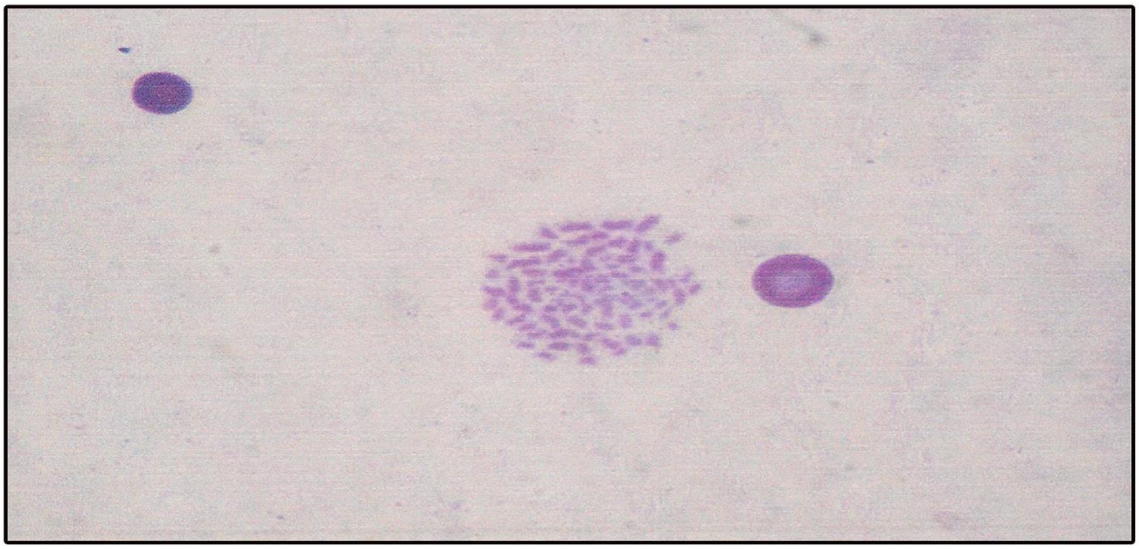
$\bar{X}$: المتوسط
SD: الانحراف القياسي
SE: الخطأ القياسي

دراسه الاختلالات الكروموسوميه في خلايا نقي العظم للجرذان :

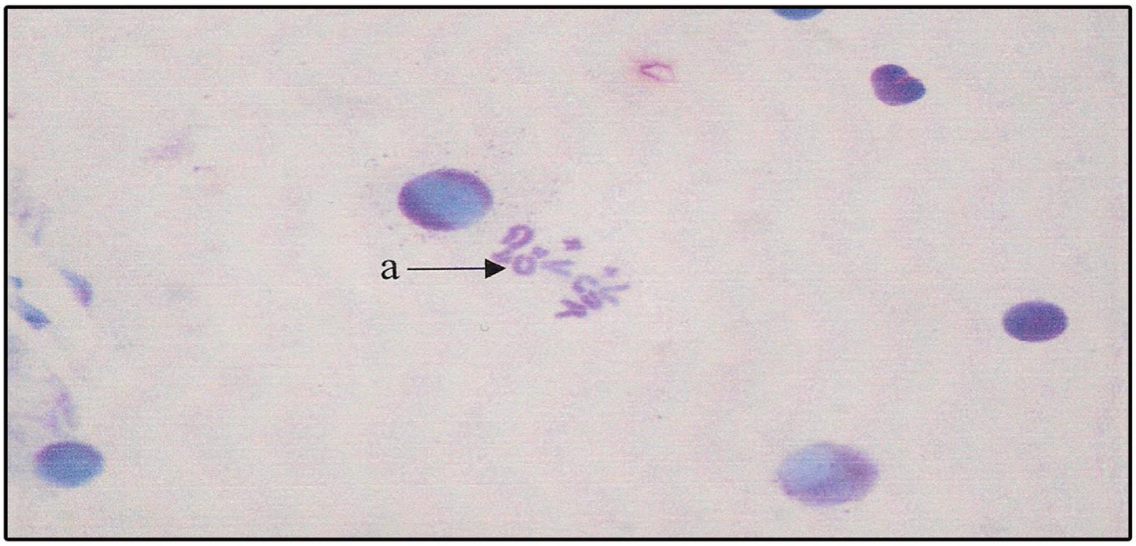
يشمل الجدول(5)على بعض الاختلالات الكروموسوميه في خلايا نقي العظم للجرذان المعاملة بجرعة 1جم/كجم من الـGT وجرعه 20ملجم/كجم من الـCP في ثلاثة تداخلات (الاشكال 4 – 13) حيث تمثل اعلى معدل لمجموع الاختلالات في التداخلات الثلاثه بالكسر في منطقه السنترومير (196.6) ثم قطع كروموسوميه (142.3),ثم الالتصاقات (98.2),ثم كروموسوم حلقي (68.2) ثم قله العدد (65.6) ثم كروموسومات متحلله (39.9) ثم اشكال غير منتظمة (36.2) ثم كسر كروماتيدي (20.9) ثم فرط العدد (6.9) ثم كسر كروموسومي (7.6) .ان النتائج الحاليه تتفق بشكل عام مع دراسه موازيه حول تاثير الـCP في الكروموسومات لخلايا اللبائن من خلال حثه لحدوث تشوهات كروموسوميه عديده في خلايا النسيج الراسي لاجنه الفئران [9] وكذلك التبادل الكروماتيدي الشقيقي في خلايا كبد الجرذان [26] وفي نقي العظم للفئران [27] . اما عند قدره المستخلص في تقليل نسبه تلك التشوهات فمن الممكن تعليلها في ضوء الاليه المشار اليها سابقا حول تاثيراته الوقائيه في الحد من تحلل الDNA . كما ان تلك النتيجه تتحقق ايضا ما توصل اليه [28] حول قدرة مستخلصات الشاي الاخضر على خفض معدلات التشوهات الكروموسوميه في الفئران والناتجة عن معاملتها بجرع مطفره من المايتومايسين –C. هذا وقد اشار [24 ,29] الى ان الـEpicatechinsوهو مركب فعال مضاد للاكسده يتوفر في الشاي الاخضر وله القدره على منع حدوث التلف الكروموسومي والتطفير الحادث بسبب المواد والعوامل المطفره والمسرطنه.

جدول (5) معدلات الاختلالات الكروموسومية في نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 1 جم / كجم من الـGT وجرعة 20 ملجم / كجم من الـ CP في ثلاثة تداخلات .

المجموعات	فرط العدد	قلة العدد	كروموسوم حلقي	كسر كروموسومي	كسر كروماتيدي	كسر في منطقة السنترومير	التصاقات	قطع كروموسومية	اشكال غير منتظمة	كروموسومات متحللة	المجموع
سيطرة سالبة	1.6	13.3	16.3	6	8	12.3	7.3	11	5.6	9.3	90.7
سيطرة موجبة	9.6	24.3	44.6	10	15.6	81.6	54.3	76.6	32	17	365.6
تداخل اول	2	27.3	9.6	3	4	56	35.3	26	6.3	13.3	182.8
تداخل ثاني	1.6	13	34.3	3	7.3	66.6	20.3	42	13.3	9.3	210.7
تداخل ثالث	6	25.3	24.3	1.6	9.6	74	42.6	74.3	16.6	17.3	291.6
مجموع الاختلالات في التداخلات	9.6	65.6	68.2	7.6	20.9	196.6	98.2	142.3	36.2	39.3	

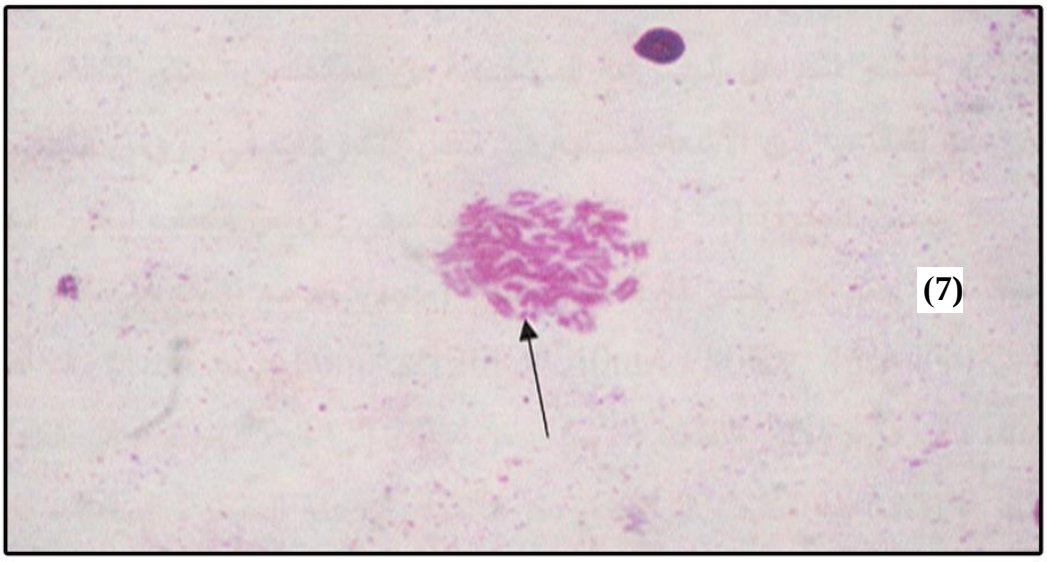


شكل (4)فرط عدد المجموعة الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالـGTثم الـCP(تداخل اول)(1600X,صبغة جمزا)

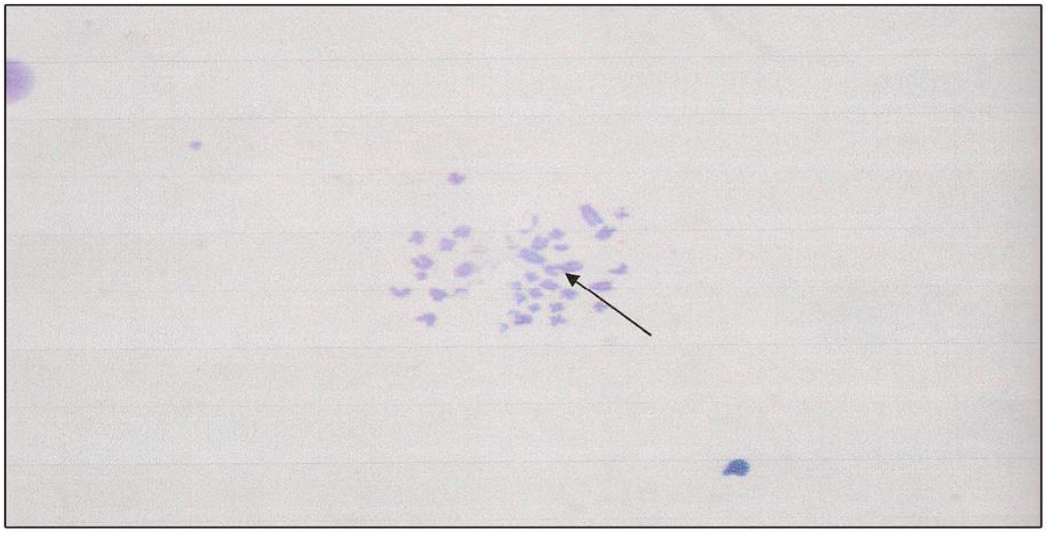


شكل (5)قلة عدد المجموعة الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالـGTمع الـCP(تداخل ثاني) (1600X,صبغة جمزا)

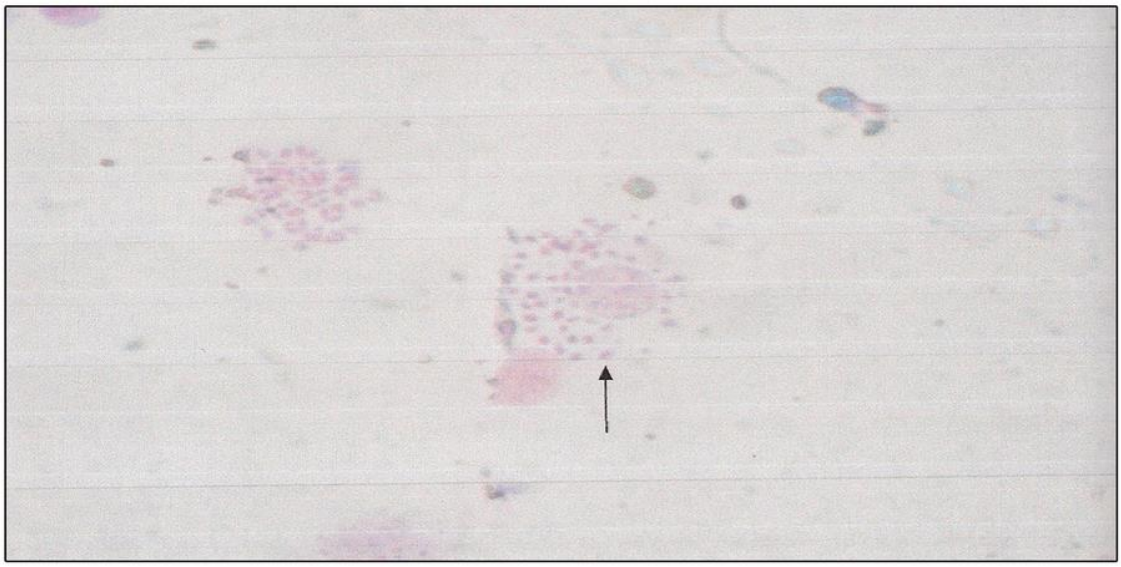
شكل (5) قلة عدد المجموعة الكروموسومية ، مع وجود كروموسوم حلقي (a) لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالـGT مع الـCP (تداخل ثاني) (1600X، صبغة جمزا)



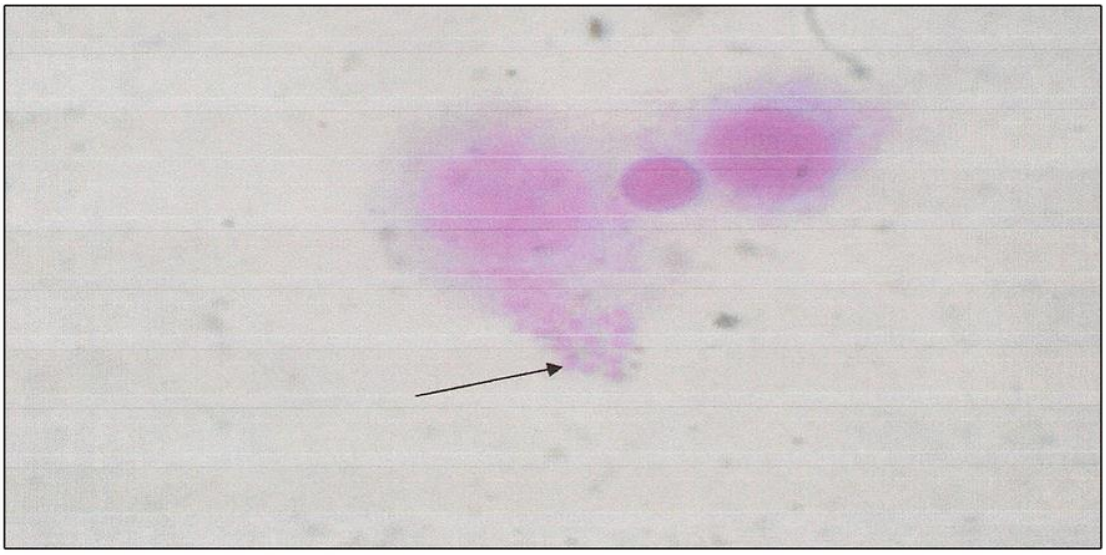
شكل (8)كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعامله بالـCPثم الـGT(تداخل ثالث)(X1600,صبغة جمزا)



شكل (9)كسر كروماتيدي في احدى كروموسومات الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعامله بالـCPثم الـGT(تداخل ثالث) (1600X,صبغة جمزا)



شكل(12)قطع كروموسوميه في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعامله بالـCPثم الـGT (تداخل ثالث) (1600X,صبغه جمزا)



شكل(13)كروموسومات متحللة في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالـGTثم الـCP(تداخل اول)(1600X, صبغة جمزا).

References

1. Dinae, L., Mckay, P. and Jeffrey, B., ***J. American Collage of Nutrition.***, 2002, **20**, 1.
2. Yang, C. and Landau, J., ***J. Nutr.***, 2000, **130**, 2409.
3. Lee, S. R., Im, K. J., Suh, S. I. and Jung, J. G., ***Phytother Res.***, 2003, **17(3)**, 206.
4. Valentao, P., Fernandes, E., Carvalho, F., Andrade, P. B., Seabra, R. M. and Bastos, M. L., ***Phytomedicine.***, 2003, **10 (6-7)**, 517.
5. Skrzydlewska, E., Roszkowska, A. Makiela, M. and Skrzydlewski, Z., ***Rocz. Akad. Med. Bialymst***., 2001, **46**, 240.
6. Nie, G., Cao, Y. and Zhao, B., ***Redox Rep.***, 2002, **7(3)**, 171.
7. Kwon, C., Maddison, K., Lacastro, L. and Broch, R., ***Cancer Res.***, 1987, **47(6)**, 503.
8. Harris, C., ***Cancer j., Nat. cacer Inst***., 1979, **63**, 275.
9. Pillans, P., Ponz, S. and Parker, M., ***Carcinogenesis,*** 1989, **10 (1)**, 83.
10. Ataya, K.,Valeriot, F.and Ramahi ,A., ***Cancer. Res.***, 1989, **49**, 1660.
11. Wilmer, J., Erexson, G. and Kligerman, A., ***Cancer Res***., 1986, **46(1)**, 203.
12. Sato, T., Onse, Y., Nagase, H. and Kito, H., ***Mut. Res.***, 1990, **241**, 283.
13. Vekiari, S. A., Orcopoulo, V. and Thomopoulos, C. D., ***JAOCS.***, 1993, **70 (5)**, 483.
14. Shubber, E. K., (1981). The genetic hazard of ten antiparasitic drugs compared to radiation. Ph. D. Thesis, Harvard Univ., cambridge, U. S. A : 289 pp.
15. He, P., Noda, Y. and Sugiyama, K., ***Journal of Nutrition***, 2001, **131**, 1560.
16. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis. T., (1989). Molecular cloning a laboratory manual. Cold

Spring Harbor Labora- tory, Cold Spring Harbor, N.Y.

17. Prifer, V., ***Spring- erverlage,*** Berlin, 1984, 26.
18. Evans, E. P., Breckon, G. and Ford, C. E., (1964). An airdrying method for meiotic preparation from mammalian testes Cytogenetics, **3** , 284.
19. Vinson, J., Dabbagh, Y., Serry, M. and Jang, J., ***Crit Rev Food ci. Nutr***., 1997, **37,** 761.
20. Kakuda, T., ***Biol. Pharm Bull.***, 2002, **25(12)**,1513.
21. Deneve, W., Valeriote, F., Edelstein, M., Everett, C. and Bischoff, M. ***Cancer Res.***, 1989, **49 (7)**, 1660.
22. Kada, T., Inoue, T., Ohta, T. and Shirasu, Y., ***Basic Life sciences, plenum***, New York, 1985, **39**, 181.
23. Deflora, S. and Ramel, C., ***Myt. Res.***, 1988, **202**, 285.
24. Al-Jbale, A. M., (2007). Inhibition of mutagenic effect of X-ray by green tea extract. M.Sc. thesis, University of Omar Al- Mukhtar, Libya.
25. Littlefield, L., Colyer, S. and Dufrain, R., ***Mut. Res***., 1980, **67** , 191.
26. Eckl, P., Strom, S., Michalopoulos, G. and Jirtte, R., ***Carcinogenes***, 1987, **8 (8)**, 1077.
27. Kram, D., Schneider, E. L., Senula, G. G. and Naknishi, Y., ***Mut. Res.,*** 1979, **60**, 339.
28. Nakamure, T., Nakazawa, T., Onizuka, S., Satoh, S., Chiba, A., Sekihashi, K., Miura, A., Yasugahira, N. and sasaki, Y., ***Mut. Res***., 1997, **388 (1)**, 7.
29. Cheng, S., Ding,L., Zhen,Y., Lin,P.,Zhu,Y.,Chen,Y. and Hu,X., ***Chin, Med. Sci.J.***, 1991, **6(4)**, 233.