

## Study of anti mutagenic and anti oxidant activity of clove plant extract in male white rats

دراسة النشاط المضاد للتطهير والأكسدة لمستخلص نبات القرنفل في ذكور الجرذان البيض\*

السعدي ، رضية نجم عبد \*\* ; السعدي ، علي حمود \*\*\* و حشروش ، ستار جاسم \*\*\*\*

\*بحث مقدم من لدن الباحث الاول

\*\*كلية العلوم ،جامعة كربلاء

\*\*\*كلية العلوم ،جامعة بابل

\*\*\*\*كلية التربية، جامعة كربلاء

### الخلاصة

صممت الدراسة الحالية للكشف عن الفعالية المضادة للأكسدة والتطهير للمستخلص الميثانولي المائي لنبات القرنفل (*Syzygium aromaticum* (clove). فقد تم توصيف المستخلص النباتي باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC إذ بينت النتائج وجود أكثر من مكون للمستخلص وعند فحص الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين لوحظ امتلاك المستخلص فعالية مضادة للأكسدة ظهرت في عدة حزم ، وقد حددت الفعالية المضادة للأكسدة لهذه الحزم من خلال احتفاظها باللون الأصفر. هذا وعند معاملة الجرذان بجرعة 2ملغم/كغم من عقار MMC لوحظ انه ادى الى زيادة مستوى تحلل ال-DNA ، كما ادى اعطاء مستخلص القرنفل بتركيز 500 ملغم/كغم مع وبعد المطفر الى خفض مستوى التحلل، مايدل على ان المستخلص يعمل كمضاد للطفرة خارج الخلية بالدرجة الاولى ومضاد للطفرة داخل الخلية بالدرجة الثانية عند إعطائه قبل المطفر. كما تم اختبار معاملة المستخلص مع المطفر لمدد زمنية مختلفة وهي أسبوع واحد وأسبوعان وثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع وخمسة أسابيع وذلك لمعرفة التأثيرات التراكمية للمستخلص في التقليل من أو منع فعل العقار ، اذ لوحظ انخفاض مستوى التحلل خلال الاسابيع المتتالية ليصل الى السيطرة السالبة في الاسبوع الخامس. كذلك لوحظ ان معاملة الجرذان بالعقار ادى الى خفض معامل الانقسام MI 1.16 مقارنة بالسيطرة السالبة 3.2 . في حين ان اعطاء المستخلص مع وبعد المطفر ادى الى رفع قيم MI الى 2.43 ، 2.13 على التوالي بينما لم تشكل المعاملة قبل 1.68 فرقا معنوياً مع السيطرة الموجبة، وعند استمرار التجريب لخمسة اسابيع بالمستخلص مع المطفر لوحظ ارتفاع قيم MI وصولاً الى السيطرة السالبة في الاسبوع الخامس. كما اشارت الدراسة الكروموسومية لنقي العظم الاحمر الى ارتفاع معدل التشوهات عند المعاملة بالمطفر . ولكن اعطاء المستخلص مع وبعد المطفر ادى الى خفض معدل التشوهات ، بينما المعاملة بالمستخلص قبل المطفر لم تعط فرقا معنوياً مع السيطرة الموجبة ، اما التجريب المستمر فقد ادى الى خفض التشوهات الى حد السيطرة السالبة .لقد دلت نتائج الدراسة الحالية ان لمستخلص القرنفل فعالية مضادة للأكسدة والتطهير داخل وخارج الجسم.

### Abstract

This study was designed to test the antioxidant and antimutagenic activity of methanolic water extract of clove. The extract has been described by using thin layer chromatography TLC, the results which showed the presence of more than one component of this extract and when examining the activity of antioxidant by beta carotene spray process , It was observed appearance of the antioxidant activity in several bands .

The antioxidant activity was determined for these bands through the retention of the color yellow, which indicates the existence of effective antioxidant in some components of clove extract. When rats treated with 2 mg/kg of MMC lead to increased the level of DNA fragmentation and the interference treatment of extract at 500 mg/kg (with) and (after) the mutagen performed decrease the level of fragmentation, These results may indicate that the extract works as desmutagenic agent, while when given before the MMC, the extract may work as antimutagenic agent. So the result of the oral gavage of mixing the extract with mutagen for five weeks reducing the level of the crash in the DNA compared with negative control. The results of MI of the interference treatment with extract (with) and (after) the mutagen performed a best result in the raising of median MI to 2.43 , 2.13 respectively compared with the positive control 1.16, while the extract before the treatment with mutagen did not

posses any significant differences 1.68 compared with positive control .The result of the oral gavage of mixing the extract with mutagen for five weeks had been showed, in the first week led to raise the median MI. The result of chromosomal abnormality CA of mice stem cell possessed a high significant difference in the positive control 26.0 compared with the negative control 5.33, while in the interference between the extract and mutagen the result showed a decrease in the median of abnormality to both treatment (with) and (after), while the treatment ( before) did not posses any significant difference compared with positive control . Also the results of median chromosomal abnormality of the interference treatment (with) to five weeks showed a decrease in the median of CA. The results of this study refer to that the clove extract have antioxidant and antimutagenic activity In vivo and In vitro.

## المقدمة

لقد أثبتت البحوث الحديثة امتلاك المركبات الفعالة في النبات الفعل المضاد للطفرة الناتجة من الكثير من العوامل الملوثة الداخلية والخارجية والتي تحت على تكوين أنواع مختلفة من الأضرار الوراثية والضعف المناعي والذي يسبب بدوره أمراض عديدة في الإنسان والحيوان والنبات وتعمل هذه المركبات الفعالة بشكل مفرد أو تآزري إذ أنها قسمت إلى قسمين تبعاً للآلية التي تعمل بها فالقسم الأول مضاد للطفرة المباشرة Desmutagens أي التي تثبط التنشيط الأيضي للمطفر أو منعه أو أحد متاثيراته من الوصول إلى الـ DNA وإحداث ضرر فيه ، القسم الآخر مضاد للطفرات الحيوية Bioantimutagens والتي تعمل على منع تثبيت الطفرة بزيادة كفاءة أنظمة الإصلاح DNA repair systems في الخلية [1]. ونبات القرنفل ( Syzygium aromaticum ) ينتمي إلى العائلة الأسيية Myrtaceae ، و هو من الأشجار دائمة الخضرة والتي تنمو إلى مديات عالية تتراوح من 10-20 متر وتمتلك أوراق بيضوية كبيرة وأزهار قرمزية اللون في مجاميع متعددة لعناقيد طرفية ، تكون البراعم الزهرية في البداية شاحبة اللون ، تصبح خضراء تدريجياً وعندما تنضج تكون ذات لون احمر مشع [2]. وقد استخلصت العديد من المركبات الفعالة من هذا النبات كالتانينات tannins والتربينيدات الثلاثية triterpenoids [3]. كما وجد [4] ان لمستخلص القرنفل عدة مركبات فعالة تمتلك تأثير مضاد للاكسدة antioxidant ومضاد للورم antitumor اضافة الى كونه مركب مضاد للتسرطن [5]. وقد اظهر اليوجينول وهو المركب الرئيس في القرنفل قابلية على توليد الجذور الحرة ROS (Reactive Oxygen Species) وهي انواع الاوكسجين الفعالة في خط خلايا اللوكيميا HL-60 والتي تؤدي إلى زيادة نفاذية الماييتوكوندرية وبالتالي ظهور الموت الخلوي المبرمج Apoptosis [6]. وعلى النقيض من ذلك فقد افاد [7] ان مركب اليوجينول يقلل من تولد انواع الاوكسجين الفعالة ROS داخل الخلايا الطبيعية وبذلك فانه يقلل من الفعل التطفيري لها. كما لاحظ [8] ان القرنفل يعمل على خفض مستويات إنزيمات الكبد في المصل وتعود هذه الفعالية إلى وجود مضادات الأكسدة في القرنفل كما أنه يحتوي على مركبات فينولية تعمل ككاسحات للجذور الحرة . وقد هدفت الدراسة الحالية الى الكشف عن الفعالية المضادة للتطفير والاكسدة لمستخلص نبات القرنفل لذا تضمنت.

1. توصيف المستخلص الميثانولي المائي بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC .
2. فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص بطريقة الرش بالبيتاكاروتين .
3. دراسة تأثير الجرعة المطفرة لعقار الماييتومايسين و التأثير الوقائي أو العلاجي المحتمل للمستخلص في كروموسومات خلايا نقي العظم الاحمر والـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيض.

## المواد وطرائق العمل

### المواد:

#### 1.النبات المستخدم:

استخدم في هذه الدراسة البراعم الزهرية الجافة dried flower buds لنبات القرنفل المتوفرة في السوق المحلية لدى العطارين وبائع الأعشاب الطبية وقد صنف النبات استناداً إلى [9].

#### 2.حيوانات التجارب:

استخدمت في هذه التجربة 33 جرد أبيض White albinos' rats بعمر 8 اسابيع وتركزت على الاقل اسبوعين للتكيف مع ظروف المختبر قبل اجراء التجارب عليها.

## طرائق العمل:

1.تحضير المستخلص: حضر مستخلص القرنفل من البراعم الزهرية الجافة وحسب طريقة [10] وركز باستخدام المبخر الدوار (Rotary evaporator) ووضع في الحاضنة على درجة 50 م للحصول على المستخلص الجاف، حفظ في مكان جاف لحين الاستعمال.

#### 2.توصيف المستخلص بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:

نشطت صفائح السيليكا جيل بوضعها في الفرن لمدة ساعة تقريباً عند درجة حرارة 105 م وتم وضع مايقارب (50 - 100) مايكروليتر من مزيج المستخلص ومحلل الطور السائل المستخدم في التجربة واستخدم مزيج (خلات الاثيل : هكسان 3:1)

- (V/V/V) [11] كطور سائل لعملية الفصل، وأجريت عملية الفحص تحت الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية، إذ تم تحديد عامل الإعاقة ( $R_f$ ) (Retardation Factor) للحزم المتكونة إضافة إلى ألوان تلك الحزم وعددها [12].
3. اختبار الفعالية المضادة للأوكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين:  
أجري اختبار الفعالية المضادة للأوكسدة باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين على صفائح TLC والمشار إليها من قبل [13] إذ مثلت الحزم التي احتفظت باللون الأصفر مكونات مضادة للأوكسدة وتتناسب كثافتها اللونية مع الفعالية المضادة للأوكسدة.
4. تحديد الجرعة المثالية للمايتومايسين (MMC) والقرنفل:  
تم استخدام التركيز الأمثل للـ MMC والذي يمتلك قدرة تطهيرية ويناسب مع وزن الجرذ والممثل بـ 2 ملغم/كغم من وزن الجسم [14]، أما تركيز المستخلص النباتي المثالي فقد كان 500 ملغم/كغم من وزن الجسم [15].
5. تصميم التجارب:  
استخدم التركيز الأمثل للمطفر والممثل بـ 2 ملغم/كغم من وزن الجسم مع المستخلص بتركيز 500 ملغم/كغم من وزن الجسم وعلى شكل ثلاثة تداخلات، تم تجريع الحيوانات فمويًا للمستخلص والمطفر. السيطرة السالبة: تم تجريع 3 جرذان ماء مقطر فقط وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة. التداخل الأول: تم تجريع 3 جرذان بالمستخلص قبل المطفر بـ 24 ساعة وقتلت بعد 48 ساعة. التداخل الثاني: تم تجريع 3 جرذان بالمستخلص مع المطفر وقتلت بعد 24 ساعة. التداخل الثالث: تم تجريع 3 جرذان بالمستخلص بعد المطفر بـ 24 ساعة وقتلت بعد 48 ساعة. كما تم اختبار المعاملة بالتداخل الثاني لمدد مختلفة، إذ تم قتل 3 جرذان كل أسبوع ولمدة خمسة أسابيع كما تم تجريع 3 جرذان بالمطفر لمدة أسبوع واحد واعتبرت سيطرة موجبة. وقد أجري على كل مجموعة اختبار تحليل الـ DNA واختبار معامل الانقسام واختبار التشوهات الكروموسومية.
6. اختبار تحليل الـ DNA :  
تم استخلاص الـ DNA حسب التعليمات المرفقة من شركة Promega، ثم أجريت عملية الترحيل الكهربائي للـ DNA حسب طريقة [16].
7. تحضير كروموسومات نقي العظم :  
لتحضير كروموسومات نقي العظم اتبعت طريقة [17]، إذ حقنت الحيوانات بـ 0.25 مل من الكولجسين بتركيز (0.1 ملغم/مل) في التجويف الخليي قبل القتل بثلاث ساعات ثم تم حساب الاختلافات الكروموسومية لكل 1000 خلية، أما معامل الانقسام MI فتم حسابه لكل 1000 خلية وحسب المعادلة التالية:  
معامل الانقسام (%) = (عدد الخلايا المنقسمة ÷ العدد الكلي للخلايا) × 100
8. التحليل الإحصائي:  
تم التحليل الإحصائي باستعمال البرنامج SAS (2001) بتصميم عشوائي كامل (CRD)، كما تم استعمال اختبار دانكن متعدد المدى Duncan's Multiple Range Test على مستوى احتمال 1% [18].

## النتائج والمناقشة

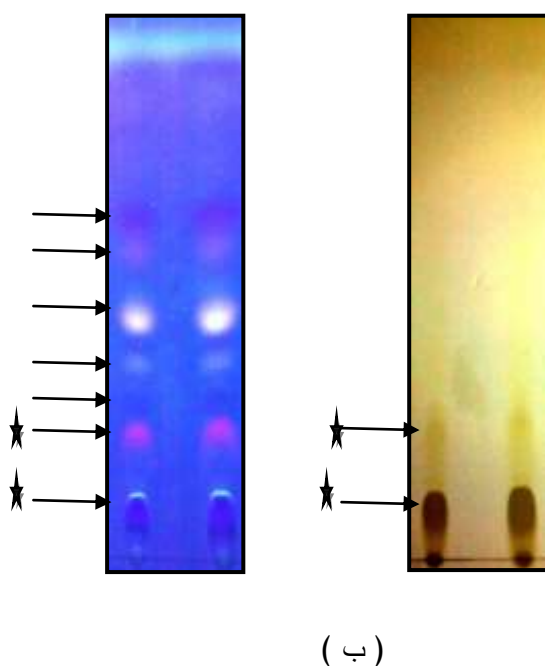
**توصيف المستخلص الميثانولي للقرنفل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:**  
يبين الشكل (1) نمط ترحيل TLC للمستخلص عند فحصه بالضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية التي تم تلخيصها في الجدول (1) الذي يبين خصائص الحزم من ناحية الـ  $R_f$  واللون وعدد الحزم الظاهرة، حيث يلاحظ ظهور حزمتين عند الفحص بالضوء المرئي للطور السائل (هكسان : خلاص الأثيل 3 : 1 V/V) وكان  $R_f = 0.123$  و  $0.217$  (7) حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية وتراوحت قيم الـ  $R_f$  لها بين  $0.123 - 0.833$ ، وتشير هذه النتائج إلى وجود أكثر من مكون مختلف في المستخلص الميثانولي للقرنفل ويمكن أن يعزى ذلك إلى احتواء المستخلص على أكثر من مركبواهما الفلافونيدات، إذ أشار [19] أن اختبار phytochemical لمستخلص القرنفل قد كشف عن وجود الفلافونيدات والراتنجات والكلايكوسيدات والقلويدات والصابونيات والتانينات. كذلك وجد [20] أن القرنفل يحتوي على مركبات عديدة كالتانينات والفلافونيدات والستيرولات والكلايكوسيدات. وقد ذكر [21] أن المكونات الرئيسة لزيت القرنفل هي phenylpropanoides مثل مركب carvacol و thymol و eugenol و cinnamaldehyde.

جدول (1) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي للمرنفل باستخدام الطور السائل ( هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v ).

| العدد | خصائص الحزم |                | طريقة الفحص                 |
|-------|-------------|----------------|-----------------------------|
|       | اللون       | R <sub>f</sub> |                             |
| 2     | بنّي        | *0.123         | الضوء الاعتيادي<br>(المرئي) |
|       | اصفر        | *0.217         |                             |
| 7     | ازرق فاتح   | *0.123         | الأشعة فوق البنفسجية        |
|       | وردي غامق   | *0.217         |                             |
|       | نيلي        | 0.355          |                             |
|       | ازرق فاتح   | 0.442          |                             |
|       | ابيض        | 0.565          |                             |
|       | وردي فاتح   | 0.739          |                             |
|       | بنفسجي      | 0.833          |                             |

• الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية

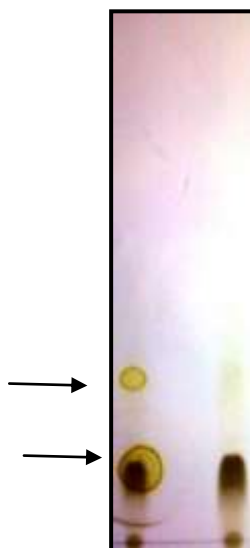
المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية



شكل (1) يوضح ترحيل المستخلص الميثانولي للمرنفل على صفائح TLC باستخدام الطور السائل ( هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v ). تشير الاسهم الى الحزم المفصولة. أ- عند الفحص بالضوء المرئي. ب- عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية. ★ الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية.

اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين:

يبين شكل (2) نتائج فحص الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص القرنفل باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين والموضحة في جدول (2) وقد أظهرت النتائج وجود فعالية جيدة للمستخلص مضادة للأكسدة في حزمتين  $R_f = 0.12$  و  $0.21$  وذلك لاحتفاظها باللون الأصفر كدليل على كونها مضادات أكسدة فقد أشار [22] الى ان القرنفل يمتلك فعالية مضادة للأكسدة خارج الجسم *In vitro* . كما انه يقلل او يخفض من جهد التأكسد oxidative stress داخل الجسم *In vivo* [23]. وقد تعود الفعالية المضادة للأكسدة للقرنفل الى محتواه من الـ phytochemicals والتي تزيد من مقدار او فعالية الانزيمات المضادة للأكسدة [24]. او قد تعود الى محتواه من العناصر الاثرية والتي تعتبر من المتطلبات الضرورية لفعالية الانزيمات المضادة للأكسدة [25].



شكل (2) فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v)

(أ) قبل الرش (ب) بعد الرش

• الاسهم تشير الى الحزم ذات الفعالية المضادة للأكسدة (التي احتفظت باللون الاصفر).

جدول (2) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v).

| الحزمة $R_f$ | نتيجة الفحص |
|--------------|-------------|
| 0.123        | +           |
| 0.217        | +           |
| 0.355        | -           |
| 0.442        | -           |
| 0.565        | -           |
| 0.739        | -           |
| 0.833        | -           |

+ : وجود فعالية مضادة للأكسدة (الحزم التي احتفظت باللون الاصفر)  
- : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة

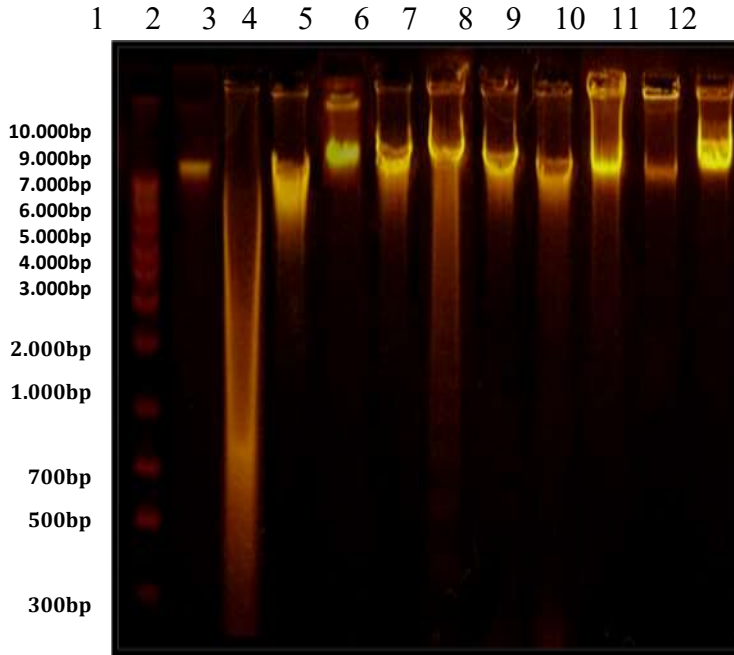
## الاختبارات البايولوجية الجزيئية والوراثية الخلوية:

### اختبار تحليل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء :

يبين الشكل (3) مستوى تحليل الـ DNA المستخلص من دم الجرذان المعاملة بالمستخلص و بثلاثة تداخلات (قبل، مع ، بعد) المطفر وبالجرع المنتخبة، كما يبين مستوى تحليل الـ DNA لدم الجرذان المعاملة بالتداخل (مع) ولخمس اسابيع، وقد تم تلخيص النتائج في جدول (3)، اذ لوحظ ان الجرذان المعاملة بـ MMC اظهرت مستوى عالي من التحلل للـ DNA بمسحة تراوحت من 10000-300 زوج قاعدي وبحجم جزيئي 9700 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة السالبة بحجم جزيئي 10000 زوج قاعدي اذ لم يظهر اي تحليل ويرجع السبب الى ان عقار المايتومايسين له فعل المباشر على الـ DNA والذي يحدث بطريقتين هي اما الكلة الحامض النووي منقوص الاوكسجين الـ alkylated DNA (والتي تؤدي الى حدوث ارتباطات عبورية cross links)، أو توليد الجذور الحرة مثل superoxide و hydroxy radicals (والتي تؤدي الى كسور في شريط الـ DNA) [26]. اما عند اجراء التداخل بين المستخلص والعقار اظهر الـ DNA مستوى تحليل منخفض وللمعاملات الثلاث (قبل) و (مع) و (بعد) اذ اعطت حزم بحجم جزيئي 6000 ، 2000 ، 4000 زوج قاعدي على التوالي بالمقارنة مع السيطرة الموجبة كما كانت المعاملة (بعد) هي الافضل في خفض مستوى التحلل. وعند استمرار التجريب بالمعاملة (مع) اظهرت النتائج انخفاض مستوى تحليل الـ DNA، فالاسبوع الاول اعطى مسحة بحجم جزيئي 4000 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة الموجبة التي اعطت مسحة بحجم جزيئي 9000 زوج قاعدي ، اما الاسبوع الثاني والثالث والرابع والخامس فقد اعطت مسحات بحجم جزيئي 5000 ، 5000 ، 2000 ، 1000 زوج قاعدي على التوالي هذا يدل على ان للمستخلص النباتي قدرة على تثبيط فعل المطفر والتي تعود الى احتواء المستخلص على المركبات الكيميائية النباتية، فبعض المركبات مثل الفلافونيدات و التانينات معروفة بفعلها المضاد للتطفير من خلال تفعيلها لآليات مختلفة و عديدة لصالح الجسم فمثلا "يعتقد ان الفلافونيدات المستخلصة من نبات الميرمية والزعر و النعناع الفلفلي لها القدرة على تثبيط الفعالية التطفيرية لمركب Trp-p-2 من خلال عرقلة مسار التنشيط الايضى للمركب اضافة الى فعلها المضاد للاكسدة في ازالة الجذور الحرة المتولدة من تأييض المطفرات ، اما التانينات فيعتقد انها المسؤولة عن عملية الاصلاح بالقص (Excision repair) من خلال تفاعلها مع جزيئة الـ DNA مباشرة" او من خلال تنشيطها لانزيمات الاصلاح [27]. كما وجد [28] ان نبات *Phyllanthus orbicularis* الغني بمركبات الكلايكوسيدات والصابونيات والكومارينات مضاد للاكسدة والتطفير اذ انه يحفز انظمة الاصلاح لشريط الـ DNA ويؤدي الى غلق المواقع الحساسة للجزيئات الخلوية لحمايتها من التاكسد بالجذور الحرة. وقد وجد ان لبعض النباتات ومركباتها كفاءه مضادة للتطفير الذاتي الناتج بسبب حصول تحوير في انزيم DNA-polymerase ومن هذه النباتات الشاي الاخضر [29].

جدول (3) يبين مستوى تحليل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان بعد المعاملة بالـ MMC و المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل، مع، بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.

| رقم المجال في الشكل 3 | التداخل                 | bp الحجم الجزيئي التقريبي (base pair) | مستوى التحلل مقارنة بالسيطرة السالبة bp |
|-----------------------|-------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------|
| 1                     | DNA ladder              | 10000                                 | -                                       |
| 2                     | السيطرة السالبة         | 10000-10000                           | 0                                       |
| 3                     | السيطرة الموجبة         | 300-10000                             | 9700                                    |
| 4                     | المستخلص قبل المطفر     | 4000-10000                            | 6000                                    |
| 5                     | المستخلص مع المطفر      | 8000-10000                            | 2000                                    |
| 6                     | المستخلص بعد المطفر     | 6000-10000                            | 4000                                    |
| 7                     | MMC اسبوع واحد          | 1000-10000                            | 9000                                    |
| 8                     | التداخل (مع) اسبوع اول  | 6000-10000                            | 4000                                    |
| 9                     | التداخل (مع) اسبوع ثاني | 5000-10000                            | 5000                                    |
| 10                    | التداخل (مع) اسبوع ثالث | 5000-10000                            | 5000                                    |
| 11                    | التداخل (مع) اسبوع رابع | 8000-10000                            | 2000                                    |
| 12                    | التداخل (مع) اسبوع خامس | 9000-10000                            | 1000                                    |



- شكل (3) يبين نمط الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان المعاملة بالـ MMC والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل، مع، بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.
1. DNA ladder المستخدم كدليل حجمي .
  2. DNA دم الجرذان المعاملة بالماء المقطر (السيطرة السالبة).
  3. DNA دم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من عقار MMC ( السيطرة الموجبة).
  4. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص قبل المطفر .
  5. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر .
  6. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص بعد المطفر .
  7. DNA دم الجرذان المعاملة بالمطفر MMC لمدة اسبوع واحد.
  8. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع اول.
  9. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع ثاني.
  10. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع ثالث.
  11. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع رابع .
  12. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع خامس.

#### اختبار معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان:

يوضح الجدول (4) انخفاض قيمة معامل الانقسام MI لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من عقار MMC إلى 1.16 مقارنة مع السيطرة السالبة 3.2 وبفرق معنوي عالي، وهذا يدل بوضوح على التأثيرات السمية الوراثية و التطفيرية للعقار من خلال قدرته على خفض معامل الانقسام وتتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للعقار على خلايا اللبائن من خلال تثبيطه لمعامل الانقسام لخلايا نقي عظم الفئران عند استخدامه بجرعة 4 ملغم / كغم [30]. ويعود سبب هذه التأثيرات الى فعالية العقار في القضاء على الخلايا لتداخله مع المادة الوراثية الـ DNA لانه يعترض عملية التضاعف DNA Replication وتثبيط الانقسام الخلوي من خلال ارتباطه التساهمي بقاعدة الكوانين بنفس شريط الـ DNA او بين شريطي الـ DNA ، لذا فان هذا الارتباط لـ MMC بالـ DNA هو المسؤول عن التقليل من النمو والانقسام الخلوي [31]. وعند اجراء التداخل بين المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بجرعة 500 ملغم/كغم مع الجرعة المعتمدة لـ MMC وعلى شكل ثلاث معاملات وهي المستخلص (قبل، مع، بعد) المطفر لتحقيق هدف الدراسة في معرفة الآلية التي تعمل بها مثبطات المواد المطفرة من خلال اختلاف المعاملة بين المطفر والمثبط ، لوحظ ارتفاع معدل معامل الانقسام ، اذ نجد ان المعاملة بالمستخلص (مع)، (بعد) المطفر كانت الافضل في رفع قيم MI الى 2.43، 2.13 على التوالي وبفرق معنوي عالي عن السيطرة الموجبة اما قيمة MI للمعاملة (قبل) فقد ارتفع الى 1.68 وبفرق معنوي بسيط عن السيطرة الموجبة، وتعود هذه الفعالية الى قدرة المركبات الفعالة النباتية على تحفيز الخلايا الجذعية على الانقسام لكي تعوض النقص الحاصل في الخلايا الدموية في

مجرى الدم نتيجة التأخر في عملية الانقسام او موت بعض الخلايا نتيجة المعاملة بالعقار [32]. وعموما فالمواد المثبطة التي تكون فعالة مع او قبل المطفر تعمل كمثبطات مباشرة Desmutagens من خلال تثبيط عمل المطفر كيميائيا وذلك بتكوين معقد مع المادة المطفرة او احد متاثيراتها وبذلك يمنع وصوله الى الخلية او ربما تتفاعل المادة المضادة مع المواقع المستهدفة بفعل المطفر من خلال عملها بوصفها مادة غالقة Blocking agent تمنع المطفر من الوصول الى المواقع المستهدفة في الـ DNA او التفاعل معها مما يؤدي الى منع تاثيرات المطفر، او من خلال تثبيط عمل المطفر انزيميا وذلك بتثبيط انزيمات التنشيط الايضى للمطفرات وبصورة غير مباشرة او من خلال زيادة انزيمات ازالة السمية المتواجدة بصورة طبيعية في الجسم [33]. اما المثبطات التي تكون فعالة بعد اعطاء المطفر فتسمى مثبطات حيوية Bio-antimutagens اذ تعمل على اصلاح التلف بعد حدوثه من خلال زيادة دقة عملية تضاعف الـ DNA وزيادة انظمة اصلاح عن طريق زيادة اصلاح الخالي من الخطا والتقليل من اصلاح القابل للخطا [34].

وقد اوضحت نتائج المعاملة بالمستخلص مع المطفر ولمدة خمسة اسابيع كما في جدول (5) ان التأثير التراكمي للمستخلص قد رفع قيمة MI تدريجيا اذ كانت قيمته في الاسبوع الاول والثاني والثالث من التجريع 1.93، 2.03، 2.16 على التوالي وبفرق معنوي بسيط مقارنة مع السيطرة الموجبة 1.02 او بالمقارنة فيما بينها اما الاسبوع الرابع والخامس فقد ارتفع MI الى 2.73، 2.7 على التوالي وصولا الى السيطرة السالبة 3.2 وبدون فرق معنوي، مما يعني ان التجريع المستمر للمستخلص قد قلل او منع تاثير المطفر على معدل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الجرذان، وقد يعود السبب الى احتواء المستخلص على المركبات الفلافونيدية. فقد وجدت [35] زيادة في معدل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالفلافونيدات المستخلصة من نباتات الكجرات و اكليل الجبل و الميرامية. ويعود تاثير الفلافونيدات المستخلصة في رفع معامل الانقسام لكون لها قابلية تحفيزية للخلايا على الانقسام الخلوي من خلال التأثير على نفاذية غشاء خلايا الدم البيضاء فتحفزها على الانقسام الخلوي بشكل غير مباشر او بشكل مباشر من خلال حثه على تحديد النشاط والحيوية للخلايا المفاوية او حثه لعملية تضاعف الـ DNA [36].

جدول (4) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي للتداخلات الثلاثة .

| المعاملة            | M $\pm$ SE            |
|---------------------|-----------------------|
| السيطرة السالبة     | 3.2 $\pm$ 0.11<br>A   |
| السيطرة الموجبة     | 1.16 $\pm$ 0.01<br>D  |
| المستخلص مع المطفر  | 2.43 $\pm$ 0.01<br>AB |
| المستخلص بعد المطفر | 2.13 $\pm$ 0.01<br>BC |
| المستخلص قبل المطفر | 1.68 $\pm$ 0.24<br>CD |

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
  - الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية > 0.01 .
- M: المتوسط  
SE: الخطأ القياس

جدول (5) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص ولمدد مختلفة .

| المعاملة                          | M± SE           |
|-----------------------------------|-----------------|
| السيطرة السالبة                   | 3.2±0.1<br>A    |
| السيطرة الموجبة<br>(مطر اسبوع)    | 0.96 ±0.09<br>C |
| المستخلص مع المطر<br>(اسبوع اول)  | 1.93±0.01<br>B  |
| المستخلص مع المطر<br>(اسبوع ثاني) | 2.03±0.0<br>B   |
| المستخلص مع المطر<br>(اسبوع ثالث) | 2.16±0.03<br>B  |
| المستخلص مع المطر<br>(اسبوع رابع) | 2.73±0.01<br>A  |
| المستخلص مع المطر<br>(اسبوع خامس) | 2.7 ±0.21<br>A  |

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
- الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $0.01 >$  .
- M: المتوسط
- SE: الخطأ القياسي

#### أختبار التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان.

يشمل الجدول (6) بعض التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من MMC، اذ بلغت 26.0 مقارنة مع السيطرة السالبة 5.33 وبفرق عالي المعنوية مما يدل على التأثير السمي الوراثي للعقار في احداث التشوهات الكروموسومية . وتتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة والتي أشارت إلى التأثيرات السمية والتطهيرية للمطر مايتومايسين C في خلايا الفئران من خلال حثه التغيرات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفئران [37]. وعلى الخلف من المواد المسرطنة التي تنتج الانحرافات الكروموسومية عن طريق التداخل مع آليات التكاثف، بحث MMC هذه الانحرافات عن طريق شطر اشربة الـ DNA، وقد لوحظ ان حدوث الكسور الكروماتينية وكسور منطقة السنترومير ربما تعود الى الفعالية الانتقائية للعقار لمناطق Heterochromatin [38].

وعند اجراء التداخل بين المستخلص بجرعة 500 ملغم/كغم والمطر بالجرعة المعتمدة، لوحظ انخفاض معدل التشوهات الكروموسومية من كسر كروماتيدي وكروموسومي وكروموسوم حلقي وفرط وقلة مجموعة كروموسومية في جميع المعاملات بالمستخلص مع وبعد وقبل المطر، اذ بلغت 14.0، 14.0، 19.66 على التوالي وبفرق معنوي عن السيطرة الموجبة، مما يثبت قابلية المستخلص على خفض تأثير العقار واعتباره ضمن المثبطات المباشرة بالدرجة الاولى (اي التي تعمل على تثبيط التنشيط الايضي للمطر او حدوث تداخل كيميائي مباشر بين المطر ومضاد التطهير) وضمن المثبطات الحيوية بالدرجة الثانية (اي تعمل على تنشيط عمليات اصلاح الطفرة).

كما ان التجريع المستمر للمستخلص مع العقار قد ادى الى خفض معدل التشوهات الكروموسومية كما في جدول (7)، اذ لوحظ ان التجريع لمدة اسبوع واحد للمعاملة (مع) قد خفض معدل التشوهات الى 14.66 مقارنة مع السيطرة الموجبة 24.33 وبفرق معنوي بسيط اما التجريع للاسبوع الثاني والثالث والرابع قد خفض معدل التشوهات الى 12.0، 12.33، 12.66 على التوالي ولكن بدون فروق معنوية بالمقارنة فيما بينها او مع الاسبوع الاول اما المعاملة للاسبوع الخامس فقد ادت الى خفض معدل التشوهات 9.0 وبدون فرق معنوي بالمقارنة مع السيطرة السالبة 5.33، ما يدل على ان استمرار اخذ المستخلص ادى الى الحد من تأثير العقار في احداث التشوهات الكروموسومية. وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل اليه [39] إلى أن مستخلص نبات *Ginseng* له القدرة على تثبيط المطر مايتومايسين C الذي يمتلك تأثير تطهيري في رفع معدل التغيرات الكروموسومية والتبادل الكروماتيدي الشقيقي لخلايا نقي العظم للفأر الأبيض والهامستر. ويتفق ذلك ايضا مع ما ذكره [40] حول قدرة الشاي الاخضر على خفض معدل الاختلالات الكروموسومية وذلك من خلال اجراء اختبار النوى الدقيقة (Micronucleus assay) في خلايا CHO

وخلايا الفئران المستحثة بحقن تلك الحيوانات بالمطفر MMC داخل البريتون ، حيث لوحظ انخفاض تكرار النوى الدقيقة بشكل واضح عند معاملة الحيوان بالمستخلص بحجم 1مل قبل حقنه بالمطفر بحوالي ست ساعات.

جدول (5) متوسط التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي في ثلاثة تداخلات.

| التشوهات<br>المعاملة | كسر<br>كروماتيدي<br>M+ SE | كسر<br>كروموسومي<br>M+ SE | كروموسوم<br>حلقي<br>M+ SE | فرط مجموعة<br>كروموسومية<br>M+ SE | قلة مجموعة<br>كروموسومية<br>M+ SE | مجموع<br>التشوهات<br>M+ SE |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------|
| السيطرة السالبة      | 1.0± 0<br>B               | 0.33±0.33<br>B            | ± 0.57<br>2.0<br>B        | 1.0±1.0<br>A                      | 1.0 ± 0.5<br>B                    | 5.33±1.4<br>C              |
| السيطرة الموجبة      | 8.0 ± 2.08<br>A           | 4.33 ± 0.3<br>A           | ± 0.8<br>6.33<br>AB       | 2.0± 1.0<br>A                     | 5.33± 0.88<br>A                   | 26.0± 1.0<br>A             |
| المستخلص مع المطفر   | 2.6 ± 1.33<br>B           | 1.0± 0.5<br>B             | 7.0± 3.2<br>AB            | 0.66± 0.3<br>A                    | 2.66± 1.7<br>AB                   | 14.0± 3.2<br>B             |
| المستخلص بعد المطفر  | 2.0± 1.1<br>B             | 1.33± 0.6<br>B            | 7.0± 3.6<br>AB            | 0.33± 0.33<br>A                   | 0.33± 0.66<br>AB                  | 14.0± 3.05<br>B            |
| المستخلص قبل المطفر  | 2.0± 1.1<br>B             | 1.0± 0.5<br>B             | 11.6± 0.8<br>A            | 2.0± 0.5<br>A                     | 3.0± 1.5<br>AB                    | 19.66± 1.7<br>AB           |

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
  - الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $0.01 >$  .
- M: المتوسط  
SE: الخطأ القياسي

جدول (6) متوسط التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي ولمدد مختلفة.

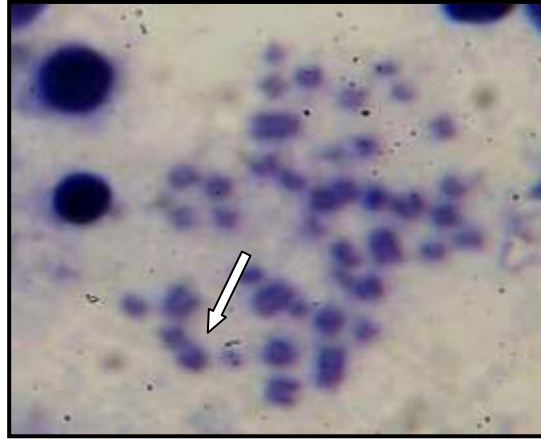
| التشوهات                       | كسر كروماتيدي  | كسر كروموسومي  | كروموسوم حلقي       | فرط مجموعة كروموسومية | قلة مجموعة كروموسومية | مجموع التشوهات       |
|--------------------------------|----------------|----------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| المعاملة                       | M± SE          | M± SE          | M± SE               | M± SE                 | M± SE                 | M± SE                |
| السيطرة السالبة                | 1.0± 0.0<br>B  | 0.33±0.33<br>B | 2.0±0.57<br>B       | 0.66±0.66<br>A        | 1.0±0.57<br>B         | 5.33±1.45<br>D       |
| السيطرة الموجبة (مطر اسبوع)    | 8.33±2.02<br>A | 3.66±0.33<br>A | 6.0±1.0<br>AB       | 2.0±1.15<br>A         | 4.33±0.33<br>A        | 24.33±1.8<br>5<br>A  |
| المستخلص مع المطر (اسبوع اول)  | 3.66±2.1<br>B  | 0.33±0.33<br>B | 7.33±1.8<br>A       | 1.33±0.33<br>A        | 4.66±0.88<br>A        | 14.66±1.2<br>B       |
| المستخلص مع المطر (اسبوع ثاني) | 0.33±0.33<br>B | 1.0±0.57<br>B  | 7.33±2.1<br>8<br>A  | 0.33±0.33<br>A        | 3.0±1.0<br>AB         | 12.0±2.64<br>BC      |
| المستخلص مع المطر (اسبوع ثالث) | 1.0±0.57<br>B  | 0.66±0.33<br>B | 4.33±1.2<br>AB      | 1.33±0.33<br>A        | 5.0±0.57<br>A         | 12.33±1.2<br>BC      |
| المستخلص مع المطر (اسبوع رابع) | 0.0±0.0<br>B   | 0.66±0.33<br>B | 6.33±1.7<br>6<br>AB | 0.66±0.66<br>A        | 5.0±1.5<br>A          | 12.66±0.6<br>6<br>BC |
| المستخلص مع المطر (اسبوع خامس) | 0.0±0.0<br>B   | 0.0±0.0<br>B   | 4.0±0.57<br>AB      | 1.33±0.66<br>A        | 3.66±3.66<br>AB       | 9.0±0.57<br>CD       |

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
- الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية  $0.01 >$ .

M: المتوسط  
SE: الخطأ القياسي



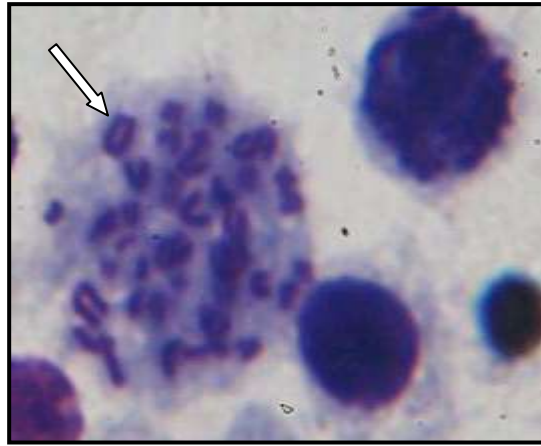
كسر كروماتيدي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمأيتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X صبغة كمزا) .



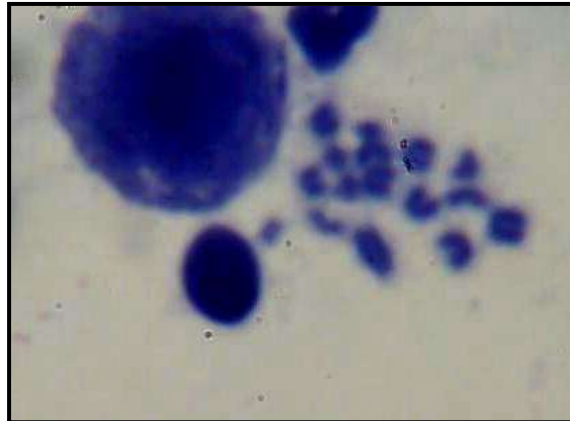
كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمأيتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة كمزا)



فرط المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمأيتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة كمزا) .



كروموسوم حلقي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمأيتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة كمزا) .



قلة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمأيتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة كمزا) .

## References

- [1] Samejima, K. ; Kanazawa, K. ; Ashida, H. & Danno, G. I.(1995). Luteolin : a strong antimutagen against dietary carcinogen Trp- p-2 , in peppermint, sage and thyme. J.Agric. food. chem.,43(2): 410-414.
- [2] Kim , H. M.; Lee, E. H.; Hong, S. H.; Song, H. J.; Shin , M. K. ; S. H. & Shin, T.Y. (1998).Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. J. Ethnopharmacol. , 60: 125-131.
- [3] Umehara ,K.; Takagi ,R.; Kuroyanaki, M.; Ueno, A.; Taki , T. & Chen, Y.J. (1992). Studies on differentiation-inducing activities of tri terpens. J. Chem. Pharm. Bull., 40 (2) : 401-405.
- [4] Lee, K. G. & Shibamoto, T. (2001). Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. Food Chem., 74:443–448.
- [5] Dorai,T. & Aggarwal, B.B.(2004). Role of chemopreventive agents in cancer therapy. Cancer Lett., 215: 129-140.
- [6] Chae-Bin, Y.; Ki-Tae, H. & Kyu-Seok, C. (2005). Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Cancer Lett.,225(1):41-52.
- [7] Nagababu, E. ; Rifkind, J. ; Boindala, S. & Nakka, L. (2010). Assessment of antioxidant activity of eugenol *In vitro* and *In vivo*. Methods Mol. Biol., 610:165-180.
- [8] Abdel-Wahhab, M.A. & Aly, S.E.(2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. J. Appl. Toxicol., 25:218-23.
- [9] Bin Mdderos, M. R. (2008). Production and characterization of extraction oil from natural spices: A comparison study with functional group content of *Zea may* and *Elaeis guineensis jaco*. oil .Bachelor Thesis, Malaysia Pahang, Univ.
- [10] Sato, T.; Onse, Y.; Nagase, H. & Kito, H. (1990). Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against (benzo (a) yrene) in the *Samonella* assay .J. Mut. Res ., 241:283-290 .
- [11] Carrasco, H. A.; Espinoza, L.C.; Cardile, V. ; Gallardo, C.; Cardona, W.; Lombardo, L.; Catalan, K. M.; Cuellar, M.F. & Russo, A.(2008).Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cels(part I). J. Braz. Chem. Soc., 19(3) : 543-548.
- [12] Vekiari, S. A.; Orcopoulo, V. & Thomopoulos, C.D. (1993). Oregano flavonoids as lipid antioxidants. J. AOCS., 70 (5) : 483-487.
- [13] Pratt, D . E . & Miller, E. E.(1984). A flavonoid antioxidant in spanish peanuts . J. AOCS., 61(6) : 1064 – 1071.
- [14] Vancleve, J.F.; Salim, B. & Zavos, P.M.(1987) .The effexy of Mitomycin-C on daily sperm production potential and other spermatogenic parameters in mice. Drug Chem. Toxicol., 10:275-290.(Abstract on line).
- [15] Tajuddin ; Ahmed, S. ; Latif , A. & Qasmi, I. A.(2004). Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behavior of normal male rats .J. BMC. Comp. Alt. Med., 4:1-7.
- [16] Prifer, V.(1984). Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. In : Advanced molecular genetics. Spring- er verlage, Berlin , Pp.26-37.
- [17] Tolliver, D. K. & Robbins, L. W. (1991). Techniques in karyology: The bone marrow extraction method in tested studies for laboratory teaching. J.ABLE.,12:69-74 .
- [18] Steel, R.G.D. & Torrie, J.H.(1980).Principles and Procedures of Statistics. 2<sup>nd</sup> edn. Mc. Graw-Hill Book Co., Inc., New York, NY.
- [19] Tanko, Y. ;Mohammed, A. ;Okasha, M. A. ;Umar, A. H. & Magaji,R. A.(2008).Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Syzygium aromaticum* flower bud in wister rats and mice. Afr. J. Trad. CAM, 5(2): 209-212.
- [20] Jirovetz, L.(2010). Medicinal value of clove. J. Herbication. [www.herbication.com](http://www.herbication.com)

- [21] Chaieb, K.; Hajlaoui, H. & Zmantar, T.(2007).The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytother. Res.*, **21**(6):501-506.
- [22] Oya, T.; Osawa, T.; Kawakishi, S.(1997). Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **61**:263-266.
- [23] Cotran, R.S.; Kumar, V. & Collins, T. R.(2000). Pathologic basis of disease. 6th edn. Pennsylvania: Saunders.
- [24] Rock, C.L.; Jacob, R.A. & Bowen ,P.E.(1996). Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients vitamin C, vitamin E , and the carotenoids .J. Am. Diet Assoc.,**96**:693-702.
- [25] Lampe, J.W.(1999). Health effects of vegetables and fruit : assessing mechanisms of action in human experimental studies. *Amer. J. Clin. Nutr.*,**70**(3):475-490.
- [26] Kang, Y.H.; Lee, K.A.; Ryu, C.J. & Lee, H.G. (2006). Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. *Cancer Lett.*, **237**: 33-44.
- [27] Kuroda, y. ; Jain, A. ; Tezuka, H. & Kada, T. (1992). Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mut. Res.*, **267** : 201-209.
- [28] Alonso, A.; Jorge,L.F.; Angel, S. & Montserrat, L.(2010).Antimutagenic effect of *Phyllanthus orbicularis* against  $\gamma$ -radiation. *Lat. Am. J. Pharm.* ,**29**:148-152.
- [29] Kada, T. ; Inoue, T. ; ohta, T. & Shiraus, Y. (1985). Antimutagens and their modes of action. In : Shankel, D. M. ; Hartman. P. , Antimutagenesis and Anticarcinogenesis mechanisms. Basic Life Sciences, Plenum, New York, (39) : 181-196.
- [30] Pooder, S.; Chattopadhyay, A. & Bhattacharya, S.(2008).In vivo suppression fluoride of chromosomes aberration induced by mitomycin–C in mouse bone marrow cells . *J. Fluoride . Res .*, **41** (1): 40-43 .
- [31] Warren, A. J. ;Maccubbin, A. E. & Hamilton, J. W.(1998).Detection of Mitomycin-C DNA adducts *In vitro* by P<sup>33</sup>-postlabelling : Time course for formation and removal of adduct and biochemical modulation .*Cancer Res.*, **58**: 453-461.
- [32] Travis, E. L. (1995). Primer of medical radiobiology. Year Book Medical Puplicher. U.S.A.
- [33] Kuroda, Y. & Hara, Y. (1999). Antimutagenicity of tea polyphenols. *Mut. Res.*, **436**:69-97.
- [34] Bronzetti, G.(1997). The role of antimutagenesis and anticarcinogenesis. *J. Environ. Patho. Toxicol. Oncol.*, **16**: 259-262.
- [35] الطائي، شذى علي شفيق. (2005).تأثير فلافونيدات بعض الانواع النباتية في الفعل التطفيري لعقار الميثوتركسين (MTX) وسم افلا B1 اطروحة دكتوراة ، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.
- [36] Elves, M. W. & Wikinson , J. F. (1962). *Nature*. **194**: 1257. Egner, P. A. ; Wang , J. B. ;Zhu, Y. R.; Zhang, B.Ch.; Zhang, Q. N. ;Qian, G. S. ; Yuan-Kuar, Sh. ;Gange, S.J. and Jacobson, L.P. (2001). Chlorophyllin intervention reduces Aflatoxin-DNA adduct in individuals at high risk for liver cancer. *Sci.*, **98**(25):14601-14606.
- [37] Abou-Tarboush, F. M. ; El-Ashmaoui, H. M. & Dafter Dar, M.Y.(1999). Cytogenetic effects of Mitomycin – C on fetal and adult mouse cells *In vivo* . *J. Egyp. Med. Sci.*, **20** (2) : 463-474.
- [38] Natrajan, A.T. & Raposa, T.(1975). Heterochromatin and chromosome aberrations: A comparative study of three mouse cell lines with karyotype and heterochromatin distribution. *Heredita*, **80**:83-90.
- [39] Umnova, N.; Michrina, T.; Smirnova, N.; Aleksandrova, T. & Proshenko, G. (1991). Study of antimutagenic properties of bio-ginseng in mammalian cells *In vitro* and *In vivo* *Bull .J. Eksp. Biol. Med.*, **111** (5) : 507-509.
- [40] Nakamura, T.; Nakazawa, T.; Onizuka, S.; Satoh, S.;Chiba, A.; Sekihashi, K.; Miura, A.;Yasugahira, N. & Sasaki, Y.(1997).Antimutagenicity of tochu tea (anaqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves ). *Mut. Res.*, **388**(1):7-20.