دراسة تأثير بعض مستخلصات عرق السوس (*Glycyrrhiza glabra*) الخلوية الوراثية
في خلايا الدم اللمفاوية للنعاج العواسية وخلايا سلي اجنتها

Study of some Cytogenetic effect of licorice extracts (*Glycyrrhiza glabra*) on blood lymphocytes of Awassi ewes and embryos

عباس حسين نايف ال سعيد إسماعيل كاظم شبر صفاء عباس عبد سعد محمد ندا*

وزارة العلوم والتكنولوجيا
*مركز بحوث التقنيات الاحيائية/جامعة النهرين

A. H. N. Aal-Saeid Shubber, E. K Abid, S. A Neda, S. M.*

Ministry of Science and Technology /Agriculture directorate

* Biotechnology Research Center/AL-Nahrain University

المستخلص

أجريت التحليلات الخلوية الوراثية لنماذج الدم المأخوذة من نعاج عواسية (محلية) 0.5 مل لكل نموذج ، حضنت في وسط زرعي TC-199 مع Brdu لمدة 72 ساعة فيما عملت التحليلات الخلوية الوراثية لنماذج خلايا سائل السلي للجنة المأخوذة من مجاميع نعاج التجربة (n=30) بطريقة فتح البطن للنعاج الحوامل (12 – 13) اسبوع . كان هدف الدراسة لبيان التأثيرات السمية لمستخلص عرق السوس في كروموسومات خلايا الدم اللمفاوية للأمهات والجنة بعد المعاملة . بينت التحليلات الخلوية الوراثية عدم احداث تغير عددي او تركيبى كروموسومي للأمهات واجنتها المعاملة بمستخلص عرق السوس وتحت ظروف التجربة .

Abstract

The effect of licorice extract *Glycyrrhiza glabra* on somatic cells chromosomes from 30 Awassi ewes (local breed) before and after pregnancy to improve soil fertility through the use of chromosome analysis of lymph blood cells and on their embryos from amniotic cells chromosome which drain by laparotomy of the maternal and fetal. That is the aim of this study. The blood taken from ewes treatment [0.5ml] for each sample incubate in media Tc-199 with Brdu for 72 hours worked in Cytogenetic analysis of the models Rd cells of embryos derived from the total ewes experience a way to open the abdomen of the pregnant ewes (12-13) weeks to demonstrate the effects of licorice extract chromosomes in blood lymphatic cells of mothers and fetuses after treatment. Cytogenetic analysis revealed that licorice extract could not induce numerical nor structural abnormalities in chromosomes from ewes blood lymphocytes, after treatment or on their embryos from amniotic cells chromosomes which drain by laparotomy under their experimental designs.

المقدمة

ان للاضافات العلفية Nutritional supplements دوراً مهماً ومؤثراً في الانتاج والتناسل ، واستخدمت بنطاق واسع في العديد من البلدان بالرغم من وجود بعض الاعراض الجانبية التي تحدد من استخدام قسماً منها [2،1] ومن هذه الاضافات المستخدمة مستخلصات عرق السوس التي استخدمت اضافات علفية للأغنام والماشية ومنشطات نمو وتحسين الكفاءة التناسلية كونه من النباتات ذات الفاعلية الاسترويدية (steroid like action) وقيمتها الغذائية العالية لأحتوائه على الكسرايزين والفلافونيدات [4] ويستعمل نبات عرق السوس كمضاد للفايروسات و البكتيريا ومضاد للتلفير anti-mutagenic ومضاد للتسرطن anti-carcinogenic ومضاد للألتهاب [5, 6] ولأهمية المستخلصات النباتية فقد أرتأينا دراسة التأثير السمي على الكروموسومات للأمهات والأجنة في الخلايا اللمفاوية للدم و خلايا سائل السلي حيث تم استخدام سائل السلي في العديد من الدراسات لبيان

الانحرافات الكروموسومية وتعيين جنس الجنين ودراسة بعض الظواهر الكيموحيائية والأنزيمية بطريقة سحب سوائل السلي (amniocentesis) والتي تستخدم بصورة واسعة ما قبل الولادة في الإنسان وأعتبرت كخزعة جنينية [7].

لقد كان هدف هذه الدراسة هو الكشف عن التأثيرات السمية الوراثية أن وجدت لمستخلص عرق السوس في النعاج المعاملة به لغرض تحسين خصوبتها من خلال استخدام التحليلات الكروموسومية لخلايا دم الأم والأجنة من سائل السلي .

المواد وطرائق العمل

1. أجريت هذه الدراسة في حقل الانتاج الحيواني التابع لدائرة البحوث الزراعية \وزارة العلوم والتكنولوجيا في بغداد على 30 نعجة عواسية محلية خضعت لنفس الظروف التغذوية والادارية والبرامج الصحية .

2. مستخلص عرق السوس : تم الحصول على هذه المادة بطريقة الاستخلاص الساخن بعد تقطيع وسحق جذور السوس الجافة والنظيفة من الاتربة والاطيان على هيئة مسحوق خشن توضع داخل أفران حديدية خاصة يندفع اليها الهواء الساخن بدرجة حرارة (130 – 140) م ، ومن خلال حرارة الهواء الساخن تخرج عصارة الجذور الطبيعية وهي على هيئة مادة لزجة ، تجمع وتنقى بمشبات (غرايل) خاصة وتترك لتتجمد وتتصلب على هيئة مادة بنية داكنة اللون تحوي الصفات الطبيعية للسوس من الرائحة والطعم المميز ، تطحن هذه المادة على هيئة مسحوق ناعم وسهل الذوبان بالماء (مصنع السوس في العزيزية /العراق) .

3. قسمت نعاج التجربة الى ثلاث مجاميع (سوس 300 ، PMSG 500 وصفر) على التوالي . اذ عوملت نعاج التجربة م1 بمستخلص عرق السوس وبجرعة 300 ملغم / كغم وزن جسم وبجرع اسبوعية منفردة ولمدة (6) اسابيع . وهذه كانت مدة الدفع الغذائي (Flushing) قبل ادخال الاكباش التي استخدمت للتسفيد الطبيعي يوم رفع الاسفنجيات المهبلية التي تم توحيد الشق فيها والحاوية على 50 ملغم هرمون بروجستيرون MAP خلات مدروكسي البروجستيرون ولمدة 12 يوما ، وتم ادخال الاكباش يوم رفع الاسفنجيات ، اما المجموعة الثانية فقد عوملت بهرمون PMSG وبجرعة 500 وحدة بالحقن العضلي يوم رفع الاسفنجيات المهبلية ايضاً ، فيما عوملت المجموعة الثالثة سيطرة بمحلول ملحي فسلجي فقط .

4. سحب 5 مل دم من الوريد الوداجي للامهات كافة يوم بدء التجربة (قبل المعاملة) لبيان ماهية الكروموسومات وبعض الصفات الدمية وبالأخص الفحص العددي والتفريقي لخلايا الدم وايضا يوم اجراء عمليات فتح البطن (Laparotomy) لبيان تأثيرات المعاملة في دم الامهات والاجنة بعد سحب سائل السلي الجنيني وبعمر 12 – 13 اسبوع ، اعتمد لتحضير الكروموسومات من خلايا الدم اللفافية طريقة [10] بينما اعتمدنا لتحضير الكروموسومات من خلايا سائل السلي طريقة محورة عن [18] في الأبقار و [11] في الإنسان وملخص الطريقة :

5. أضيف 0.5 مل من الدم المعامل بالهيبارين لأنبوبة الزرع الى وريد الوسط الزراعي RPMI الحاوي على مادة bromodeoxyuridine – Brdu انتاج Fluka بنسبة 10 مايكروغرام/مل لتعليم جزيئة DNA ويحوي كذلك على مصل دم العجل بنسبة 10% ومادة PHA (phytohaemagglutinin) بنسبة 20 مايكروغرام/مل وحضنت المزراع تحت درجة 37 م لمدة 72 ساعة ، عوملت المزراع بالكولجسين 20 مايكروغرام/ مل لمدة 3 ساعات ومن ثم حضرت منها الخلايا لفحص المنقسمة والكروموسومات .

6. استخدمت طريقة [19] لفحص معامل التبادل الكروماتيدي الشقيقي (SCE sister chromatide exchange) والفحص الكروموسومي العددي والتركيبى ، أما معامل الانقسام الخلوي (MI mitotic index) فقد احتسب نسبة عدد الخلايا المنقسمة في 1000 خلية نامية ، واحتسب معامل الارومة I B (blastogenic index) . نسبة عدد خلايا الارومة الى 1000 خلية مزروعة [14] .

7. حلت نتائج البيانات وفق التصميم العشوائي التام (CRD) ولتحليل النتائج استخدم النظام الجاهز [12] ولاختبار معنوية الفروق بين المعدلات استخدم اختبار دنكن [13] .

النتائج :

لقد اوضحت النتائج في جدول (1) عدم وجود فروقات معنوية في العدد الكلي أو التفريقي لخلايا الدم البيضاء في المعاملات كافة وهي ضمن الحدود القياسية وهو مؤشر صحي جيد لحالة الحيوانات المعاملة . فيما أظهرت النتائج في الجدولين (2،3) عدم وجود اختلافات في معاملات الانقسام الخلوي ، ومعامل الأرومة للأمهات قبل وبعد المعاملة وللأبناء لكافة المجاميع وعدم وجود تأثير معنوي ($P < 0.05$) للمعاملة بعرق السوس على أعداد الكروموسومات وأعداد الخلايا المنقسمة وأظهرت دراسة جدول (4) عدم وجود تأثير معنوي لمستخلص عرق السوس 300 ملغم على معدلات التبادل الكروماتيدي وعلى أشكال وصور الكروموسومات لخلايا الدم اللعابية وخلايا سلي الأجنة ولم تشاهد أية اضطرابات تركيبية كقطع أو كسر أو التحام أو انقلاب ، وكان عدد الكروموسومات لكافة المجاميع قبل وبعد المعاملة وللأجنة بعد المعاملة 54 وهو العدد الأساس للنجاح العواسية العراقية .

جدول (1) : يبين نتائج فحص الدم العددي والتفريقي لخلايا الدم البيضاء

المجموعة / المعاملة	عدد النعاج	المتعادلة	المفافية	وحيدة النواة	القاعدية	الحامضية	العدد الكلي لخلايا الدم البيضاء
سوس 300	10	1750	^a 3500	^a 350	^a 350	^a 250	^a 6200
PMSG 500	10	^a 1700	^a 3200	^a 300	^a 450	^a 350	^a 6000
سيطرة	10	^a 1800	^a 3600	^a 450	^a 350	^a 150	^a 6350

ملاحظة : الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية على مستوى احتمال ($p < 0.05$) ضمن العمود الواحد

جدول (2) : يبين معدلات الانقسام الخلوي للأمهات قبل وبعد المعاملة وكذلك للأبناء (Amniocentesis)

المجموعة / المعاملة	عدد النعاج	معدل معامل الانقسام الخلوي %	الامهات قبل التجربة	الامهات بعد التجربة	الأبناء
		Mean ± se	Mean ± se	Mean ± se	Mean ± se
سوس 300	10	^a 8 ± 0,84	^a 9 ± 0,82	^a 1 ± 1,0	
PMSG 500	10	^a 8 ± 0,82	^a 8 ± 0,84	^a 1 ± 0,8	
سيطرة	10	^a 9 ± 0,78	^a 8 ± 0,74	^a 1 ± 0,8	

Mean = المعدل الحسابي. الخطأ القياسي = standard error se

ملاحظة : الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية على مستوى احتمال ($p < 0.05$) ضمن العمود الواحد .

جدول (3) : يبين معدل معامل الأرومة Blastogenic Index (BI) * للأمهات قبل وبعد التجربة وللأبناء أيضا .

المجموعة/المعاملة	معدل معامل الأرومة قبل التجربة	معدل معامل الأرومة بعد التجربة	معدل معامل الأرومة للأبناء
	Mean ± se	Mean ± se	Mean ± se
سوس 300	^a 1.49±0.08	^{aa} 1.63±0.09	^{aa} 1.58±0.08
PMSG 500	^a 1.48±0.07	^a 1.49±0.08	^{aa} 1.52±0.08
سيطرة	^{aa} 1.43±0.08	^a 1.43±0.08	^a 1.48±0.07

*ملاحظة :

عدد خلايا الأرومة

1000 خلية

*معدل معامل الأرومة B.I

*الأحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية لمعدل معامل الأرومة على مستوى احتمال ($p < 0.05$)

جدول (4) : يبين معدلات التبادل الكروماتيدي الشقيقي SCE للأمهات قبل وبعد التجربة وللأبناء

المجموعة / المعاملة	SCE قبل التجربة	SCE بعد التجربة	SCE الأبناء
	Mean ± se	Mean ± se	Mean ± se
السوس 300	^a 0.1988 ± 0.0589	^a 0.1794±0.0639	^a 0.1920±0.0612
PMSG 500	^a 0.1773±0.0752	^a 0.1472±0.0441	^a 0.1520±0.0590
سيطرة	^a 0.1783±0.0573	^a 0.1793±0.0553	^a 0.1652±0.0474

ملاحظة : الحروف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية للتبادل الكروماتيدي SCE على مستوى احتمال ($p < 0.01$)

المناقشة :

لم تؤد المعاملة بمستخلص عرق السوس وبالجرعة 300 ملغم / كغم وزن جسم حي في النعاج العواسية الى احداث تغييرات باعداد الكروموسومات (زيادة او نقصان) . واي اضطرابات تركيبية (من النماذج الماخوذة خلايا الدم اللمفاوية) للأمهات أو في الأبناء أذ كانت أعداد الكروموسومات للنعاج والأجنه 54 كروموسوماً . ولم يحصل فرق معنوي بمعاملات الانقسام الخلوي أو تبادل الكروماتيدي الشقيقي اذ ان الانخفاض بمعامل الانقسام الخلوي والارومة يعد مؤشراً عن التأثيرات السمية الخلوية [4 1] ولم يحصل فرق معنوي في تبادل الكروماتيدي الشقيقي أذ انه يعتبر من الطرق الحساسة لكشف التخریب الوراثي (DNA damage) وليان التأثيرات البايولوجية والكيميائية والبيئية [17] حيث يعتقد ان حامض الجلتراتيك والكاربينكسولون اللذين يحتويهما عرق السوس يثبطان التخاطب بين الخلايا عبر الاتصالات الممرية بينهما (Gap - junctions) ومنع نقل المواد الضاره بين الخلايا [15] . وحماية ضد بعض انواع المطفرات الكروموسومية من خلال كبح الجذور الحرة للاوكسجين الفعال [3, 8, 9] ولكن قد تسبب بعض المواد اضطرابات بالكروموسومات والنوع الكروموسومي اذ قد تحدث زيادة او نقصان باعدادها او قد تحدث كسراً او التئاماً لقطع الكروموسومات وتداخلا مع بناء واصلاح ال-DNA [7] وهذا لايطابق دراستنا الحالية.

كما وان هذه المواد [الفلافونيدات] تساعد بالبناء النسيجي وخصوصاً المبايض بطبقة الخلايا الحبيبية (Granulosa cells) بتحفيزها عوامل نمو البشرة Epidermal growth factors [16] .
لم تطابق دراستنا هذه ما ذكره [7, 17] بتأثيرات النباتات الأستروجينية بالأعضاء التناسلية وخصوصية النعاج والأبقار وما ذكره [1] بحصول اضطرابات تناسلية وأحداث اورام سرطانية .

المصادر

1. Asdel ,S.A.(1949) Nutrition and the treatment of sterility in dairy cattle.j.Dairy .Sci
2. Burt0n,J.L,and Wells.(2002).The effect of phytoestrogens on the female genital tract.J.Clin.Path.2002;55:401 – 407
3. الخياط ، بشرى محمد أمين (1999)./دراسة القابلية للتطهير وامضادة للتطهير لبعض النباتات الطبية العراقية رسالة دكتوراه /كلية التربية أين الهيتم -بغداد
4. Langer, R.E.(1998) .Herb of the month Licorice (G.glabra) snow bound herbals , [http :\\www.sbherbals .com .pp;2](http://www.sbherbals.com.pp;2).
5. Shibata, S. (1994) . Antitumer – promoting and anti-inflammatory activities of the licorice principles and their modified . ACS . Symposium series . USA . 547:308-320.
6. Davidson , J . I ; M . Bunmgarten and E. H; Harley (1986). Reversible inhibition of inter cellular functional communication by glycyrrhetic acid . Bioch . Biophys . Res . Comm. 134 : 29 – 39 .
7. Fox ,M. and A. Garber .(2001) .Genetic evaluation and teratology ,In Essential of obstetrics and gynecology Ed. Nevolle ,F .H and J .g . Moore .3r d.ed .W.B. Saunders Company .Philadelphia .PP 128-138 .
8. العبيدي .ندى مسلم علي .(2002)بعض التأثيرات المناعية لجذور نبات السوس في الفئران البيض ,رسالة ماجستير /كلية التربية أين الهيتم - بغداد.
9. Vaya . J . ; Belinky , P . A . and Aviram , M . (1997) . Anti-oxidant constituents from licorice roots : Isolation , structure elucidation and antioxidant capacity toulard LDL oxidation Free, Radica . Bio. Med. 23: 302 – 313 .
10. Hungerford , A.D.(1965) .Leukocytes cultured form small inoculate of whole blood and the preparation of Metaphase chromosome ,by treatment with hypotonic KCl.Stain , Tech , 40,6: 333-337 .

11. Ghosh , P . K. and Reita Ghosh . (1986) . Sister chromatid Exchange in human amnion cells . The nucleus , 29 (1,2) : 45 – 47 .
12. SAS . Institute , (1994) State Guide for personal computer (11) th ed . SAS . Inc. Cary . NC .
13. Steel , R. G. and Torrie , J . H . (1980) . Principles and procedures of statistics . Mc Grow . Hill book Co. inc . New York .
14. Shubber, E. K . and Salih , M . A. (1987). Cytogenetic studies on blood lymphocytes from patient with Schist soma mansion . Japan . J . Med . Sci . Biol . 40 : 137 .
15. الكبيسي ، روى عدنان فرج عاشور . (2002) دراسة الفاعلية التثبيطية لمستخلصات عرق السوس في تأثير الاشعاع في الفئران المختبرية /رسالة ماجستير ، معهد الهندسة الوراثية –جامعة بغداد .
16. Hadley , Mace (2000). Growth hormones in : Endocrinology. (5) th ed . Ed . paul , F. Corey. prentice – Half , Inc . upper Saddle River , USA pp. 277-307.
17. Martinez, A. ; Cambero , L . ; Ikken , Y , ; Martin , M . L . : Haza , A , L . and Morales m p . (1998). Protective effect of broccoli, Onion , Carrot and Licorice extract against cytotoxicity , J . Agric , Food . Chem. 46 , 2 285 – 289
18. Parvathi, K.B and A.T. Bongso .1980 .Amniocentesis for prenatal eletction of sex and Cytogenetic defects in cattle ,in Current therapy in theriogenology .Ed. Morrow .D.A. Eds W.B. Saunders company .philadeiphia.PP 1185-1188.
19. Guandy , S.;vorga,L.and Bender, M.A.(1984).Sister chromatid exchange in human lymphocytes exposed to ionizing radiation in vivo and in vitro . Radiate .Res. 100:47-54.