تقييم بعض التأثيرات الوراثية- الخلوية لمستخلص الهكسان لنبات القطب *Tribulus terrestris* داخل وخارج الجسم الحي

Evaluation of Some Cytogenetic Effects of Hexane Extract from *Tribulus terrestris in vivo* and *in vitro*

رسل رضا ممدوح النقشلي *بتول علي شهاب *علي حسين ادحية
كلية العلوم للبنات/جامعة بغداد
*كلية العلوم/وحدة الابحاث البايولوجية

Russul Ridha Mamdouh Batool Ali Shahab* Ali Husain Ad'hiah*
Collage of Science for Women/ University of Baghdad
*Collage of Science/ Biological Researches Unit

الملخص

أجري البحث الحالي لتقييم بعض التاثيرات الوراثية الخلوية لمستخلص الهكسان لثمار نبات القطب *Tribulus terrestris* في ذكور الفأر الأبيض، من خلال دراسة معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم والطحال ومعامل تكوّن النوى الصغرى وتشوّهات رؤوس النطف. فضلا عن دراسة معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم البشرية للاشخاص الأصحاء. تضمن البحث ثلاث مراحل؛ شملت المرحلة الأولى تقييم التأثيرات الوراثية الخلوية الآنفة الذكر لثلاثِ جرع 5،10،20 ملغم/كغم من المستخلص النباتي، بينما أُجري في المرحلة الثانية تداخل مابين المستخلص وعقار مايتومايسين سي بعد اختيار الجرعة المثلى 5 ملغم/كغم ومن خلال نوعين من التداخل (قبل وبعد المعاملة)، أما المرحلة الثالثة فتضمنت دراسة معامل تكوّن النوى الصغرى في الاشخاص الأصحاء باستخدام ثلاثة تراكيز من المستخلص 5،10،20 مايكروغرام/مل كما أُجري التداخل مع عقار مايتومايسين سي والذي أظهر تأثيرات سلبية واضحة تمثلت بأنخفاض معامل الانقسام الخلوي وزيادة تكرار تكوّن النوى الصغرى (في الحي والزجاج) وإحداث تشوّهات لرؤوس النطف. وأظهرت نتائج المرحلة الاولى قابلية المستخلص النباتي على رفع معامل الانقسام الخلوي وخفض معامل تكوّن النوى الصغرى وعدم إحداث تشوّهات لرؤوس النطف وأظهرت الجرعة المثلى للمستخلص كفاءة عالية في حمايةِ المادة الوراثية من التأثير السلبي لعقار مايتومايسين سي وفي هذا الجانب كانت المعاملة بالمستخلص قبل العقار اكثر كفاءة من المعاملة بعد العقار. أظهرَ مستخلص الهكسان للنبات قابليته على خفضِ معدل تكوّن النوى الصغرى المتكونة بصورة تلقائية أو مستحثة بالعقار في دم الأشخاص الأصحاء.

الكلمات المفتاحية:التأثيرات الوراثية – الخلوية ، مستخلص الهكسان ، نبات القطب

Abstract

The present study was carried out to evaluate the cytogenetic effects of the hexane extract of the plant *Tribulus terrestris* fruits. The cytogenetic evaluations involved mitotic index of bone marrow and spleen cells in albino male mice, micronucleus formation and sperm-head abnormalities. The micronucleus evaluations were further explored in blood lymphocyte cultures of healthy donors through an *in vitro* study. The search was carried out through three stages. In the first, the cytogenetic effects of three doses 5,10 and 20 mg/kg) of the plant extract were evaluated, while in the second stage, interactions Pre- and Post-treatments between the ideal dose 5 mg/kg of the plant extract and the drug Mitomycin-C (MMC). In stage three, the micronucleus formation was evaluated in the lymphocyte cultures of healthy individuals after treatment with three concentrations (5, 10 and 20 µg/ml) of the plant extract, in addition to interactions with the drug MMC which revealed significant mutagenic actions as judged by the investigated parameters. Reduced mitotic index, and increased frequencies of micronucleus formation (*in vivo* and *in vitro*) and sperm-head abnormalities were observed. The first stage revealed that the plant extract reduced the spontaneous formation of micronuclei and sperm-head abnormalities. The ideal dose 5 mg/kg of the plant extract was effective in modulating the mutagenic effects of the drug MMC. In this regard, the pre-treatment was more effective than post-treatment. The stage three showed that the plant extract was effective in reducing the spontaneous, as well as, MMC induced formation of micronuclei in lymphocyte cultures.

Key words: Cytogenetic Effects, Hexane Extract, *Tribulus terrestris*

المقدمة

أثبتت الدراسات والبحوث العلمية المحلية الحديثة الفاعلية الدوائية للعديد من المركبات النباتية في خفضِ مستوى الطفرات الوراثية المستحثة بالمطفرات Mutagens والمسرطنات Carcinogens وزيادة فعالية الجهاز المناعي، فقد تمكن المستخلص المائي لنباتِ السعد *Cyperus rotundus* L. من تعديل التأثيرات الدمية والوراثية الخلوية للمايتومايسين سي من خلال رفعه لمعدل عدّ خلايا الدم البيض وخفض النسبة المئوية للتكوّن التلقائي للنوى الصغرى [1]، كما تحوي المملكة النباتية الكثير من المركبات الطبيعية التي تمتلك خصائص علاجية أو تطفيرية أو مضادة للتطفير، وقد اتسعت الدراسات التي ترمي إلى تسليط الضوء على المركباتِ الطبيعية التي تمتلك الصفة المضادة للتطفير(Anti-mutagenesis)، إن المستخلصات المائية والكحولية لنباتات حبة البركة والنومي بصرة والهيل تمتلك كفاءة تثبيطية عالية تجاه العقارين Methotrexat و Cyclophosphamide إذ إن هذه المستخلصات قللت من التأثيرات

السمية والوراثية للعقارين كما ظهرَ في تقليل نسبة النوى الصغرى وتقليل نسبة التشوهات الكروموسومية عند معاملة الفئران البيض بهذه المستخلصات قبل المطفر[2]، وفي هذا السياق فقد هدفت الدراسة الحالية إلى تقييم بعض التأثيرات الوراثية-الخلوية لنباتِ القطب المستخلص بالهكسان في ذكورِ الفأر الأبيض وخلايا لمفية بشرية، و دوره في تعديلِ التأثيرات المطفرة للعقار مايتومايسين- سي من خلال دراسة معامل الانقسام الخيطي (Mitotic index) لخلايا نقي العظم والطحال، معامل تكوّن النوى الصغرى (Micronuclei)لخلايا نقي العظم، تشوهات رؤوس النطف (Sperm head abnormalities).كما استأنفت التقييمات الوراثية-الخلوية من خلال معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع للخلايا اللمفية البشرية (Human lymphocyte cultures).

المواد وطرق العمل

تحضير المستخلص والجرع

وزنَ 50 غم من مسحوق ثمار النبات ثم وضعَ داخل كشتبان (Thumble) ووضعَ في جهاز السكسوليت Soxhlet الحاوي على 250 مل من مذيب الهكسان. شُغلَ الجهاز لمدة 4 ساعات لغرضِ الاستخلاص، وبعد ذلك رُشّحَ المستخلص و بُخرَ المستخلص الناتج باستخدام المبخر الدوار Rotary evaporator تحت حرارة 45م° وأُذيبَ في حجمٍ معين من زيت الزيتون وحُفظَ الناتج بحرارةِ -20م لحين استخدامه في التجاربِ بعد تحضير الجرع [3] إذ حُضّرت ثلاث جرع من مستخلص الهكسان لنباتِ القطب وهي 5، 10 ، 20 ملغم/كغم [4]، وكانت طريقة التجريع عن طريق الفم Orally، وطبقت خارج الجسم الحي في الزجاجِ *in vitro* باستخدام مزارع الدم البشرية وكانت التراكيز 5 ، 10 ، 20 مايكروغرام/مل بحسبِ ما اقترحهNeychev [5].

تصميم التجارب

المرحلة الاولى : قُسّمت حيوانات هذه المرحلة إلى ثلاثِ مجاميع وهي مجموعة السيطرة السالبة التي جرعت بزيت الزيتون 0.1 مل لمدة سبعة أيام متتالية وبمعدلِ جرعة واحدة يومياً ثم شُرّحت الحيوانات في اليوم الثامن بهدفِ إجراء التقييمات الوراثية الخلوية وكان عدد الحيوانات ثمانية فئران، والمجموعة الثانية جرعت بثلاثِ جرع من مستخلص الهكسان النباتي (5 ، 10 ، 20 ملغم/كغم) وعلى منوال نظام التجريع والتقييم الوراثي الخلوي للمجموعة الأولى وكان عدد الحيوانات 24 فأراً. اما المجموعة الثالثة فقد جرعت بجرعة واحدة من عقار مايتومايسين- سي (2 ملغم/كغم) وعلى منوال نظام التجريع والتقييم والوراثي الخلوي للمجموعة الاولى وكان عدد الحيوانات ثمانية فئران.

المرحلة الثانية : أُجريَ في هذه المرحلة نوعان من التداخل (إعطاء المستخلص قبل وبعد العقار) مابين الجرعة المثلى من مستخلص الهكسان 5 ملغم/كغم وعقار مايتومايسين- سي. جُرّعت الحيوانات في كلا الحالتين بالمستخلص النباتي 0.1 مل عن طريق الفم لمدةِ ستة أيام متتالية (جرعة واحدة/يوم) وجُرّعت بجرّعةِ واحدة 0.1 مل من مايتومايسين- سي ثم شُرّحت في اليوم الثامن لغرض إجراء التقييمات الوراثية الخلوية. كانت لكل المجموعة سيطرتها الخاصة بها التي استبدلَ فيها المستخلص النباتي بزيت الزيتون.

اختبار معامل الانقسام الخيطي Mitotic Index Assay : اعتمدت طريقة [6] مع بعض التحويرات في هذا الاختبار، اذ حقنَ الحيوان 0.25 مل من محلول الكولجيسين المحضّر آنياً في منطقةِ الغشاء البريتوني (Intraperitoneal) وبعد مرور ساعتين شُرّح الحيوان واستأصل عظم الفخذ (Femur) والطحال (Spleen) ووضعَ الأخير في محلول دارئ الفوسفات الفسلجي. قُطّعت نهايتي عظم الفخذ المرتبطة بمفصلي الحوض و الركبة ثم استخرجَ المحتوى الخلوي له في أنبوبة اختبار باستخدام محقنة طبية 5 مل من محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي حتى يصبح لونه أبيض، أما الطحال فثقبَ عدة مرات بمحقنة 1 مل ثم استخرجت خلاياه باستخدام محقنة طبية 5 مل من محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي ونقلَ معلق الخلايا إلى أنبوبة اختبار. نُبذت الخلايا في النابذة بسرعةِ 2000دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق. اهملَ الرائق واضيفَ للراسب 5 مل من محلول واطئ التوتر محلول كلوريد البوتاسيوم 0.075M الدافئ 37م° وعُلقت الخلايا جيداً ثم وضعَ الأنبوبان في حمام مائي بحرارة 37م° لمدة 30 دقيقة مع المزج كل خمس دقائق. نُبذت الخلايا بالنابذة 2000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق، وأهملَ الرائق وأضيفَ إلى الراسب 5 مل من محلول التثبيت البارد ووضعَ الأنبوبان في الثلاجةِ بحرارة 4م° لمدة 30 دقيقة. أُعيدت خطوة التثبيت مرتين وبعدها علقت الخلايا في 1-2مل من المحلول المثبت البارد. أسقطت بضع قطرات من محتويات الانبوبة على شريحة زجاجية نظيفة وباردة.لونت الشرائح بملون الكمزا لمدة 15 دقيقة ثم غُسلت بالماء المقطر وتركت لتجف.فُحصت الشرائح تحت المجهر الضوئي باستخدام العدسة الزيتية (×100) إذ فحصت 1000 خلية منقسمة وغير منقسمة واستخرجَ معامل الانقسام بحسبِ المعادلة الآتية:

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

(أ) فحص النوى الصغرى Micronucleus Assay : أُجريَ هذا الفحص بحسب طريقة Schmidt [7]، إذ استأصلَ عظم الفخذ للفأر وقُطعت نهايته ثم افرغَ محتواه الخلوي باستخدام 3 مل من البلازما البشرية المثبطة حرارياً (AB Blood group) في أنبوبة اختبار. نُبذت الخلايا بالنابذة بسرعة 1000 دورة /دقيقة لمدة 10 دقائق.أهملَ معظم الرائق وعلقَ راسب الخلايا بقليل منه ثم عُملت مسحة (Smear).جففت الشرائح في درجة حرارة المختبر ووضعت في إناء حاوي على الكحول المثيلي لغرضِ التثبيت لمدة دقيقتين.جففت الشرائح ثم لونت بملون كمزا لمدة 10 دقائق وبعد ذلك غسلت بالماء المقطر.فُحصت الشرائح بعد أن جفت تحت العدسة الزيتية (×100) وحُسبَ عدد الخلايا الحاوية على الأنوية الصغيرة من بين 1000 خلية من نوع الخلايا الدمية متعددة الحبيبات (Polychromatic erythrocytes).

(ج) تشوهات رؤوس النطف : قُسمت حيوانات هذه المجموعة إلى ثلاثِ مجاميع وكالآتي:

1- حيوانات معاملة بثلاثِ جرع من المستخلص النباتي (5 ، 10 ، 20ملغم/كغم) وكان عدد الحيوانات (36) فأراً.
2- حيوانات معاملة بزيتِ الزيتون وكانَ عدد الحيوانات (12) فأراً.
3- حيوانات معاملةبعقار مايتومايسين- سي وكان عدد الحيوانات (12) فأراً.

اعطيت هذه الحيوانات جرّعة واحدة من كل مادة عن طريق الفم في اليوم الأول ثم شرّحت الحيوانات في اليوم 35 لغرض فحص تشوّهات رؤوس النطف.اعتمدت طريقة [8]، اذ شُرحَ الحيوان واستخرجَ البربخ (Epididymis) ووضعَ في طبق حاوي 5 مل من محلول دارئ الفوسفات الفسيولوجي وقطّعَ إلى أجزاء صغيرة.وضعت قطرة من المحلول على شريحة وفرشت ، تركت لتجف ثم لونت الشرائح بملون الايوسين لمدة 3 دقائق وغُسلت بالماء المقطر. فُحصت الشرائح وحُسبت النسبة المئوية بحسب المعادلة الآتية:

معامل تشوّهات رؤوس النطف (%) = (عدد النطف المشوهة / العدد الكلي للنطف) × 100

المرحلة الثالثة :مزارع الدم البشريةHuman Blood Cultures صُممت هذه التجربة لدراسة تأثير ثلاثة تراكيز لمستخلص الهكسان وكذلك تأثير عقار مايتومايسين-سي في الخلايا اللمفية البشرية من خلال فحص تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم للأشخاص الأصحاء، إذ جُمعت عينات لأربع من الذكور وأربع من الإناث تراوحت أعمارهم بين 20-30 عاما.صممت التجارب في ضوء الآتي:

1- المزرعة الأولى : معاملة بالتركيز 5مايكروغرام/مل من مستخلص الهكسان للنبات.

2- المزرعة الثانية : معاملة بالتركيز 10 مايكروغرام/مل من مستخلص الهكسان للنبات.
3- المزرعة الثالثة : معاملة بالتركيز 20 مايكروغرام/مل من مستخلص الهكسان للنبات.
4- المزرعة الرابعة : معاملة بعقار مايتومايسين- سي بتركيز 1 مايكروغرام/مل (سيطرة موجبة).
5- المزرعة الخامسة : غير معاملة (سيطرة سالبة).
6- المزرعة السادسة : أُجريَ تداخل بين عقار مايتومايسين- سي والتركيز الأول للمستخلص النباتي (5مايكروغرام/مل).
7- المزرعة السابعة : أُجريَ تداخل بين عقار مايتومايسين- سي والتركيز الثاني للمستخلص النباتي (10 مايكروغرام/مل).
8- المزرعة الثامنة : أُجريَ تداخل بين عقار مايتومايسين- سي والتركيز الثالث للمستخلص النباتي (20 مايكروغرام/مل).

أما طريقة العمل فكانت بحسب طريقة [6] ،حيث أضيف 2 مل من الوسط الزرعي RPMI-1640 إلى كل أنبوبة اختبار من الأنابيب الثمانية مع اضافة 0.1-0.3 مل من مادة PHA و0.5 مل من الدم البشري. أضيفَ إلى الأنابيب (8،7،6،3،2،1) 0.1 مل من المستخلص النباتي وحُضنت الأنابيب في الحاضنة (37م˚). بعد مرور 24 ساعة من الحضن أضيفَ 0.1 مل من عقار مايتومايسين- سي إلى الأنابيب رقم [8,7,6,4] واستمرت عملية الحضن 72 ساعة. بعد اكتمال مدة الحضن نُبذت الخلايا بالنابذةِ (800 دورة /دقيقة) لمدة 5 دقائق. أهملَ الرائق وعلقت الخلايا المتبقية في 5 مل من كلوريد البوتاسيوم واطئ التوتر(0.1M) ثم حُضنت الأنابيب لمدة 30 دقيقة في حمامٍ مائي (37 م˚).نبذت الخلايا بالنابذة (800 دورة /دقيقة) لمدة 5 دقائق واهملَ الرائق وأضيف إلى الراسب قطرات من محلول التثبيت البارد 4م˚ إلى أن وصل الحجم إلى 5 مل ثم بعد ذلك حُفظّت الأنابيب في الثلاجةِ لمدة نصف ساعة، نبذت الخلايا (800 دورة /دقيقة) بعد ذلك أُعيدت عملية التثبيت مرتين.علّقت الخلايا في 1 مل من المحلولِ المثبت ثم عملت مسحة (Smear). لونت الشريحة بملون كمزا لمدة 15 دقيقةوفحصت بالمجهر الضوئي

التحليل الاحصائي :

تم تحليل النتائج إحصائياً وذلك باستخدام (ANOVA Table) لتحليل التباين وبعدها اختبرت معنوية الفروق بين المعدلات باستعمالِ اختبار (Duncan Multiple Range) واختبار أقل فرق معنوي (Less Significant differential) وذلك باستخدامِ البرنامج الإحصائي الجاهز[9] SPSS.

النتائج والمناقشة :

أ- معامل الانقسام الخلوي

معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم : أوضحت النتائج في جدول (1) إن معاملة ذكور الفأر الأبيض بعقار مايتومايسين سي أدت إلى انخفاضٍ غير معنوي في معدلِ معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم مقارنة بالسيطرة السالبة. وعند معاملة الفئران بمستخلص الهكسان للنبات أظهرت الجرعة الأولى ارتفاعاً غير معنوي في معدلِ المعامل، أما الجرعتان الثانية والثالثة فأظهرتا زيادةً في قيمةِ المعامل بلغت 3.02% و 3.90%، على التوالي وشكلت فرقاً معنوياً عند المقارنة بالسيطرة السالبة.

جدول(1): معدل معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم في ذكور الفأر الأبيض المجرعة بمستخلص الهكسان لنبات القطب

المجاميع		الجرعة (ملغم/كغم)	معدل معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم ± الخطأ القياسي (%) *	فعالية المعاملة (%)
السيطرة السالبة (زيت الزيتون)			ا 0.15 ± 2.40	
السيطرة الموجبة(مايتومايسين سي)		2	ا 0.17 ± 2.07	13.70 -
مستخلص الهكسان لنبات القطب	الجرعة الأولى	5	ا 0.11 ± 2.45	2.08+
	الجرعة الثانية	10	ب 0.22 ± 3.02	25.80+
	الجرعة الثالثة	20	ج 0.25 ± 3.90	63.30+

*الأحرف المختلفة: فرق معنوي(الاحتمالية ≤ 0.05) بين معدلات العمود الواحد.

معامل الانقسام الخلوي للطحال : أوضحت النتائج في جدول(2) إن معاملة ذكور الفأرالأبيض بعقارمايتومايسين سي أدت إلى انخفاضٍ معنوي في معدلِ معامل الانقسام الخلوي للطحال مقارنة بالسيطرةِ السالبة. وعند معاملة الفئران بمستخلص الهكسان للنبات أظهرت الجرع الثلاث زيادةً معنوية في قيمةِ المعامل

جدول (2): معدل معامل الانقسام الخلوي للطحال في ذكور الفأر الأبيض المجرعة بمستخلص الهكسان لنبات القطب

المجاميع		الجرعة (ملغم/كغم)	معدل معامل الانقسام الخلوي للطحال ± الخطأ القياسي(%)*	فعالية المعاملة (%)
السيطرة السالبة (زيت الزيتون)			ا 0.12 ± 1.67	
السيطرة الموجبة(مايتومايسين سي)		2	ب 0.04 ± 1.32	20.9 -
مستخلص الهكسان لنبات القطب	الجرعة الأولى	5	ج 0.06 ± 2.27	60.0+
	الجرعة الثانية	10	د 0.16 ± 2.87	71.8+
	الجرعة الثالثة	20	ز 0.15 ± 3.65	118.5+

*الأحرف المختلفة: فرق معنوي(الاحتمالية ≤ 0.05) بين معدلات العمود.

ب- معامل تكوّن النوى الصغرى :تشيرُ النتائج الموضحة في جدول (3) إلى إن معاملة ذكور الفأر الأبيض بعقار مايتومايسين سي أدت إلى زيادةٍ معنويةٍ في تكوّن النوى الصغرى (16.25 نواة صغيرة /1000 خلية) عند المقارنة بقيمة السيطرة السالبة (9.75 نواة صغيرة /1000 خلية). أما عند معاملة الفئران بمستخلص الهكسان للنبات فقد أظهرت الجرع جميعها انخفاضاً معنوياً في قيمةِ تكوّن النوى الصغرى (7.50 و5.75و 3.00نواة صغيرة /1000 خلية، على التوالي) عند المقارنة بالسيطرة السالبة.

جدول (3): معدل معامل تكوّن النوى الصغرى في ذكور الفأر الأبيض المجرعة بمستخلص الهكسان لنبات القطب

المجاميع		الجرعة (ملغم/كغم)	المعدل ± الخطأ القياسي (نواة صغيرة/1000خلية)*	فعالية المعاملة (%)
السيطرة السالبة (زيت الزيتون)			ا 0.62 ± 9.75	
السيطرة الموجبة(مايتومايسين سي)		2	ب 0.75 ± 16.25	66.6+
مستخلص الهكسان لنبات القطب	الجرعة الأولى	5	ج 0.86 ± 7.50	23.0-
	الجرعة الثانية	10	د 0.47 ± 5.75	41.0-
	الجرعة الثالثة	20	ز 0.40 ±3.00	69.0 -

***الأحرف المختلفة: فرق معنوي(الاحتمالية ≤ 0.05) بين معدلات العمود(Column).**

ج- تشوّهات رؤوس النطف

تشوّهات رؤوس النطف بعد مرور 35 يوماً : تشيرُ النتائجُ الموضحة في جدول (4) إلى أن معاملة ذكور الفأر الأبيض بعقار مايتومايسين سي أدت إلى زيادةٍ في معدلِ تشوهات رؤوس النطف (8.50%) عند مقارنتها بالسيطرةِ السالبة وكانت الزيادةُ معنويةً. أما عند معاملة الفئران بمستخلص الهكسان للنبات فقد أظهرت الجرعة الأولى انخفاضاً معنوياً في معدلِ التشوّهات.

جدول (4): معدل تشوّهات رؤوس النطف بعد مرور 35 يوماً في ذكور الفأر الأبيض المجرعة بمستخلص الهكسان لنباتِ القطب

المجاميع		الجرعة (ملغم/كغم)	المعدل ± الخطأ القياسي (%) *	فعالية المعاملة (%)
السيطرة السالبة (زيت الزيتون)			أ 0.40± 5.00	
السيطرة الموجبة(مايتومايسين سي)		2	ب 0.64 ± 8.50	70.1+
مستخلص الهكسان لنبات القطب	الجرعة الأولى	5	ج 0.40± 3.00	40.1-
	الجرعة الثانية	10	أ 0.47 .± 4.75	5.1-
	الجرعة الثالثة	20	أ 0.62 ± 5.75	15.1+

***الأحرف المختلفة: فرق معنوي(الاحتمالية ≤ 0.05) بين معدلات العمود**

التداخل بين المستخلص النباتي وعقار مايتومايسين سي: أُجري نوعان من التداخل (قبل - وبعد المعاملة) بين الجرعة المثلى للمستخلص النباتي وعقار مايتومايسين سي وذلك لتقييم دور المستخلص في الحدِ من تأثيرِ العقار في المعايير المناعية والوراثية. أُختيرت الجرعة المثلى (5ملغم/كغم) في ضوءِ نتائج المعايير المناعية والوراثية الآنفة الذكر التي كانت نتائجها متطابقة مابين الحيوانات المعاملة بهذه الجرعة وحيوانات السيطرة السالبة المجرعة بزيت الزيتون.

أ- معامل الانقسام الخلوي

معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم : أظهرت النتائجُ في جدول (5) ارتفاعَ قيمة معامل الانقسام الخلوي في الفئرانِ المجرّعة بالجرعةِ المثلى لنبات القطب (قبل المعاملة) مقارنةً بالسيطرة المناظرة لها (2.6% مقابل 2.1%) وكذلك الحال في (بعد المعاملة)(2.9% مقابل 2.3%) وكان الفرقُ معنوياً في كلتا المعاملتين (مقارنة عمودية). أما عند المقارنة افقياً فقد أظهرت السيطرة السالبة والجرعة المثلى (بعد المعاملة) ارتفاعاً في قيمةِ معامل الانقسام الخلوي مقارنةً بالسيطرةِ السالبة والجرعة المثلى (قبل المعاملة)وفي كلتا الحالتين كان الفرقُ غيرَ معنوي.

جدول(5): معدل معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم في ذكور الفأر الأبيض بعد التداخل (قبل وبعد المعاملة) بين الجرعة 5 ملغم/كغم من مستخلص الهكسان لنبات القطب وعقار مايتومايسين سي

المجاميع	معدل معامل الانقسام الخلوي لنقي العظم ± الخطأ القياسي(%)		الاحتمالية I ≥
	قبل المعاملة(زيت زيتون أو المستخلص + العقار)	بعد المعاملة(العقار + زيت زيتون أو المستخلص)	
السيطرة السالبة	0.06 ± 2.1	0.09 ± 2.3	غير معنوية
نبات القطب	0.06 ± 2.6	0.09 ± 2.9	غير معنوية
الاحتمالية II ≥	0.001	0.001	

الاحتمالية I: المقارنة أفقية ؛ الاحتمالية II: المقارنة عمودية

معامل الانقسام الخلوي للطحال : أظهرت النتائج الموضحة في جدول (6) ارتفاعَ قيمة معامل الانقسام الخلوي في الفئران المجرّعة بالجرعةِ المثلى لنباتِ القطب (قبل المعاملة) مقارنةً بالسيطرةِ المناظرة لها (1.8% مقابل 1.5%) وكذلك الحال في (المعاملة بعد) (1.9 مقابل 1.6%) وكان الفرقُ معنوياً في كلتا المعاملتين (مقارنة عمودية). أما عند المقارنة افقياً فقد أظهرت السيطرة السالبة والجرعة المثلى (بعد المعاملة) ارتفاعاً طفيفاً في قيمةِ معامل الانقسام الخلوي مقارنةً بالسيطرةِ السالبة والجرعة المثلى (قبل المعاملة) وفي كلتا الحالتين كان الفرقُ غيرَ معنوي.

جدول (6): معدل معامل الانقسام الخلوي للطحال في ذكور الفأر الأبيض بعد التداخل (قبل وبعد المعاملة) بين الجرعة 5 ملغم/كغم من مستخلص الهكسان لنبات القطب وعقار مايتومايسين سي

المجاميع	معدل معامل الانقسام الخلوي للطحال ± الخطأ القياسي (%)		الاحتمالية I ≥
	قبل المعاملة(زيت زيتون أو المستخلص + العقار)	بعد المعاملة(العقار + زيت زيتون أو المستخلص)	
السيطرة السالبة	0.06 ± 1.5	0.10 ± 1.6	غير معنوية
نبات القطب	0.08 ± 1.8	0.08 ± 1.9	غير معنوية
الاحتمالية II ≥	0.05	0.05	

الاحتمالية I: المقارنة أفقية ؛ الاحتمالية II: المقارنة عمودية.

ب- معامل تكوّن النوى الصغرى : أظهرت النتائج الموضحة في جدول (7) انخفاضَ قيمة معامل تكوّن النوى الصغرى في الفئران المجرّعة بالجرعةِ المثلى لنباتِ القطب (قبل المعاملة) مقارنةً بالسيطرةِ المناظرة لها (10.5 مقابل12.2 نواة صغيرة/1000 خلية) وكذلك الحال في (بعد المعاملة) (9.0مقابل13.0نواة صغيرة /1000 خلية) وكان الانخفاضُ معنوياً في (المعاملة بعد) (مقارنة عمودية). أما عند المقارنة افقياً فقد أظهرت قيمة السيطرة السالبة (بعد المعاملة) ارتفاعاً في قيمة معامل تكوّن النوى الصغرى للخلايا مقارنةً بقيمتهِ في (قبل المعاملة)، أما الجرّعة المثلى للنبات فأظهرت انخفاضاً في قيمةِالمعامل وكان الفرقُ غيرَ معنويفي كلتا الحالتين

جدول(7): معدل معامل تكوّن النوى الصغرى في ذكور الفأر الأبيض بعد التداخل(قبل وبعد المعاملة) بين الجرعة 5 ملغم/كغم من مستخلص الهكسان لنبات القطب وعقار مايتومايسين سي

المجاميع	معدل معامل تكون النوى الصغيرة ± الخطأ القياسي (نواة صغيرة /1000 خلية) *		الاحتمالية I ≥
	قبل المعاملة (زيت زيتون أو المستخلص + العقار)	بعد المعاملة (العقار + زيت زيتون أو المستخلص)	
السيطرة السالبة	0.7± 12.2	0.9± 13.0	غير معنوية
نبات القطب	0.6 ± 10.5	0.9 ± 9.0	غير معنوية
الاحتمالية II ≥	غير معنوية	0.01	

الاحتمالية I: المقارنة أفقية ؛ الاحتمالية II: المقارنة عمودية

معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم المحيطي: أظهرت النتائج الموضحة في جدول (8) إن معاملة مزارع الدم المحيطي بعقار مايتومايسين سي أدت إلى زيادةٍ في تكوّن النوى الصغربإذ بلغت (17.0 نواة صغيرة /1000 خلية) وكانت الزيادةُ معنويةً مقارنةً بالسيطرةِ السالبة (14.0نواة صغيرة /1000 خلية) في الذكور، أماالإناث فكانت(17.2نواة صغيرة /1000 خلية) مقارنةً بالسيطرةِ السالبة (15.5 نواة صغيرة /1000 خلية) ولم تُشكل فرقاً معنوياً. أما عند معاملة مزارع الدم المحيطي بالمستخلص النباتي فقد أظهرت التراكيز الثلاثة انخفاضاً في قيمةِ معامل تكوّن النوى الصغرى في الذكور (9.2 و7.7 و6.0 نواة صغيرة /1000 خلية، على التوالي) وفي الإناث(12.7 و11.2و 8.5نواة صغيرة /1000 خلية، على التوالي) وكان الفرقُ معنوياً في كلا الجنسين عند المقارنةِ بالسيطرة السالبة (14.0 و 15.5 نواة صغيرة /1000 خلية).

جدول(8): معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم المحيطي لذكور وإناث أفراد السيطرة بعد المعاملة بمستخلص الهكسان لنبات القطب

المجاميع		التركيز (مايكروغرام/مل)	المعدل ± الخطأ القياسي (نواة صغيرة /1000 خلية) * الذكور	الإناث	الاحتمالية ≥
السيطرة السالبة (محلول فسلجي)			أ 0.7 ±14.0	أ 0.6 ± 15.5	غير معنوية
السيطرةالموجبة(مايتومايسين سي)		1	ب 0.9 ±17.0	أ 1.1 ± 17.2	غير معنوية
مستخلص الهكسان لنبات القطب	التركيز الأول	5	ج 0.8± 9.2	ب 0.8 ± 12.7	0.01
	التركيز الثاني	10	ج 0.9± 7.7	ب 0.6± 11.2	0.01
	التركيز الثالث	20	د 0.9± 6.0	ج 0.6± 8.5	0.01

الاحتمالية: المقارنة أفقية

***الأحرف المختلفة: فرق معنوي(الاحتمالية ≥ 0.05) بين معدلات العمود**

تأثير التداخل في معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم المحيطي : أظهرت النتائج الموضحة في جدول (9) تأثير التداخل بين مستخلص الهكسان للنبات وعقار مايتومايسين سي في معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم المحيطي إذ أظهرَ التركيز الأولفي كل من الذكور والإناث انخفاضاً طفيفاً في معامل تكوّن النوى الصغرى بلغَ(13 للذكور و 14.7 للإناث نواة صغيرة /1000 خلية) ولم يشكلْ فرقاً معنوياً عند المقارنةبقيمةِ السيطرةالسالبة، أما التركيز الثانيوالثالث فقد بلغَ معامل تكوّن النوى الصغرى في الذكور (10و 9 نواة صغيرة /1000 خلية، على التوالي) وفي الإناث (11.5 و10.7نواة صغيرة /1000 خلية،على التوالي). وكان الفرقُ معنوياً في كل من الذكور والإناث مقارنةً بالسيطرة السالبة.

جدول (9): معامل تكوّن النوى الصغرى في مزارع الدم المحيطي لذكور وإناث أفراد السيطرة بعد التداخل مابين مستخلص الهكسان لنبات القطب وعقار مايتومايسين سي

المجاميع		التركيز (مايكروغرام/مل)	المعدل ± الخطأ القياسي (نواة صغيرة /1000 خلية) * الذكور	الإناث	الاحتمالية ≥
السيطرة السالبة (محلول فسلجي)			أ 0.7 ± 14	أ 0.6± 15.5	غير معنوية
السيطرة الموجبة (مايتومايسين سي)		1	ب 0.9± 17	أ 1.1± 17.2	غير معنوية
مستخلص الهكسان لنبات القطب	التركيز الأول	5	أ 0.8 ±13	أ 0.6± 14.7	غير معنوية
	التركيز الثاني	10	ج 0.6 ±10	ب 1 ± 11.5	غير معنوية
	التركيزالثالث	20	ج 0.6 ±9	ب 0.8± 10.7	غير معنوية

الاحتمالية: المقارنة أفقية

***الأحرف المختلفة: فرق معنوي (الاحتمالية ≥ 0.05) بين معدلات العمود**

بيّنت النتائج السابقة قدرة مستخلص نبات القطب على خفضِ معدل تكوّن النوى الصغرى في خلايا نقي العظم للفأر الأبيض، ويمكن إن يعزى هذا الانخفاض إلى بعض المركبات الفعّالة التي تدخلُ في تركيبِ النبات ومنها التربينات والستيرويدات التي تمتلكُ خصائص حياتية متنوعة ومنها Antioxidant activity والتي تمكنها من إضعافِ تطور الورم ومحاربة الألتهاب (Inflammation) كما تؤدي هذه الفعاّلية دوراً مهماً في تثبيطِ وكسح الجذور الحرة[10]. أما على مستوى الخلايا الجنسية، فقد أظهرت الجرعة الأولى (5 ملغم/كغم) انخفاضاً في معدل تشوّهات رؤوس النطف وان لم يرتقِ إلى فارقٍ معنوي، وربما يعودُ سبب ذلك إلى إمكانية مستخلص القطب في زيادةِ مستوى هرمون التيستوستيرون لتصل هذه الزيادة إلى 52% في دراسة أجراها [11]على القرود. وكما هو معروف يعد هذا الهرمون ضرورياً جداً في تنظيمِ الخطوات الأولى لعمليةِ نشوء الخلية النطفية وكذلك في إدامة عملية الانطاف بشكلٍ طبيعي [12].

من ناحية اخرى، أظهرَ عقار مايتومايسين سي تأثيرات سمية خلوية ووراثية في الخلايا الجسمية والجنسية تمت ملاحظتها في هذهِ الدراسة وتتفق هذه النتائج مع بعض ما توصلت إليه دراسات سابقة ، ففي تجربة أجريت على ذكور الجرذان أظهرَ العقار زيادة معنوية في تكوّن النوى الصغرى بخلايا نقي العظم بسبب حساسية حيوانات التجربة لعوامل Clastogenic [13] كما أظهرَ العقار التأثير نفسه في الخلايا النطفية للفأر خاصة الخلايا المولدة للنطف (Spermatogonia) فضلاً عن تحفيزه لعمليةِ الموت المبرمج في هذه الخلايا [14]. أما في خلايا الإنسان التي عُوملت *in vitro* بالعقار (500ng/ml) فقد ظهرت تغييرات عددية وتركيبية لكروموسومات الطور الاستوائي فضلاً عن زيادة تكوّن النوى الصغرى فيها [15]. وتتفقُ النتيجة الأخيرة مع نتائج الدراسة الحالية الخاصة بتأثير العقار في مزارع الدم البشرية.

لقد لوحظَ عند إجراء التداخل أن المستخلص النباتي نجحَ في تقليلِ الفعّالية التطفيرية لعقار مايتومايسين سي، إذ عمل على تقليلِ الأثر السمي لعقار مايتومايسن سي من خلال رفعهِ لمعامل الانقسام الخلوي في الطحال وتقليل تكوّن النوى الصغرى، فقد كانت النسبة المئوية لفعّالية الجرعة في المعاملةِ قبل أكثر من النسبة المئوية لفعّالية الجرعة في المعاملةِ بعد، ومن هذه النتائج نتوصل إلى نتيجة مفادها إن مستخلص نبات القطب يمتلكُ صفة مضادة للتطفير من النوع المباشر (Desmutagen) بالدرجةِ الأولى لقدرتهِ على الحدِ من التأثيراتِ السامة للمطفر إذ عملَ على منع وصول تأثير المطفر إلى داخل الخلية، كما يعدُ هذا المستخلص من المثبطاتِ الحيوية للمطفر

(Bioantimutagen) بالدرجةِ الثانية لكونهِ يعمل على إزالةِ الآثار السمية للمطفر بتحفيزه أنظمة إصلاح الخليةِ أو زيادة كفاءة تضاعف الدنا [16].

الاستنتاجات والتوصيات

لوحظ في هذه الدراسةعدم امتلاك نبات القطب (*Tribulus terrestris*) أي تأثيرات سمية و تطفيرية في الفأر المختبري عند الجرع الواطئة (5 ملغم/ كغم). وامتلاك النبات القدرة على تثبيط التأثيرات السمية الخلوية والتطفيرية للعقار مايتومايسين سي. لذا نوصي بدراسة تأثير مستخلص نبات القطب داخل الجسم الحي في السرطاناتِ المستحثة في حيوانات التجارب وخارج الجسم الحي باستعمال خطوط الخلايا للإنسان. وتنقية المركبات الفعالة الموجودة في النبات والتحري عن آليةِ تأثيرها الايجابي والسلبي في الجهاز المناعي والمادة الوراثية.

المصادر

1. Ad'hiah, A. H., Al-Halbosiy, M. M., and Al-Jumaily, R. M. Kh. (2007). Modulating the haemotological and cytogentic effects of Mitomycin-C by Aqueous extract of Nut Grass (*Cyperusrotundus* L.). J. of Biotechnology Research Center/Al-Nahrain University. No. 1:1815-1140.
2. حسن، مفيد قائد احمد. (2002). استخدام بعض المستخلصات النباتية لتثبيط الاثر السمي الوراثي لبعض العقاقير المضادة رسالة دكتوراه كلية العلوم / جامعة بابل.
3. Harborne, J. B. (1984). phytochemical methods.2ed (Ed.). Chapman and Hall. P.288.
4. Antonio, J., Uelmen, J. Rodriguez, R. and Earnest, C. (2000). The effects of Tribulusterrestris on body composition and exercise performance in resistance-trained males (abstract). Int J Sport NutrExerc Metab.10:208-215.
5. Neychev, V. K., Nikolova, E., Zhelev, N. and Mitev, V. I. (2007). Saponins from *Tribulusterrestris* L. Are Less Toxic for Normal Human Fibroblasts than for Many Cancer Lines: Influence on Apoptosis and Proliferation. Exp. Bio. and Med. 232:126-133.
6. Allen, J. W., Shuler, C. F., Mendes, R. W. and Latt, S. A. (1977). A simplified technique for *Invivo* analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromo-deoxuridine. Cytogenet. Cell. Genet.18:231-237.
7. Schmidt, W. (1976). The Cell Micronucleus Test for Cytogenes Analysis. In " Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection" Ed. A. Hollaender, Vol. 4 Plenum Press: New York.
8. Wyrobek, A. J. and Bruce, W. R. (1975). Chemical induction of spermalities in mice. Proc. Natl. Acad. Sci., 72: 4425-4429.
9. العقيلي، صالح رشيد والشايب، محمد سامر. (1998). استخدام البرنامج الإحصائي SSPS مطبوعات الجامعة. دار الشرق للطباعة. صفحة 358.
10. Gupta, M.و Mazumder, U. K., Kumar, T. S., Gomathi, P. and Kumar, R. S. (2004). Antioxidant and Hepatoprotective Effects of *Bauhinia racemosa* against Paracetamol and Carbon Tetra-chloride Induced Liver Damage in Rats. Iranian Journal of Pharmacology and Theraputics. 1735-2657/04/31-12-20
11. Gauthman, K., Gansean, A.P. and Prasad, R.N. (2003). Sexual effects of puncture vine *Tribulust errestris* extract (Protodioscin): an evaluation using a rat model. J. Altern Complement Med. 9: 257 – 65.
12. Bearden, H. J. and Fuquay, J. W. (1992). Applied Animal Reproduction. 3rded . Prentice Hall . England Cliffs Newjerssy. p: 19-32, 67-77.
13. Shahrim, Z., Puteri, J. Noor, M. Baharuddin, Nora 'AshikinYahya, Hussin Muhammad, Rohana A. Bakar and Zakiah Ismail. (2006). The *in vivo* rodent micronucleus assay of Kacip Fatimah *Labisia pumila* extract Tropical Biomedicine. 23: 214–219.
14. Nakagawa, S. and Mori, C. (2003). Detection of mitomycin C-induced testicular toxicity by micronucleus assay in mice. Reproductive Medicine and Biology. Vol. 2 : 2 - 69.
15. Fauth, E., Scherthan, H. and Zankl. (2000). Chromosome painting reveals specific patterns of chromosome occurrence in mitomycin C- and diethylstilboestrol-induced micronuclei. Mutagenesis.Vol. 15: 459-467.
16. Kuroda, Y. and Hara, Y. (1999). Antimutagenic and anticarcinogenic activity of tea polyphenols. Mut. Res. 436:69-97.