تثبيط الاثر السمي الوراثي للميثوتركسيت في الخلايا اللمفاوية (خارج الجسم الحي) باستخدام المستخلص المائي لإكليل الجبل (الروزماري) *Rosmari nusofficinalis*

The inhibition of genotoxicity effect of Methotrexate(MTX) in human lymphocyte *in vitro* using aqueous extract of *Rosmari nusofficinalis*

علي عبد الكاظم عبد العباس | محمد عبد الوهاب شاكر الاعظمي | براء قاسم العوادي
وزارة العلوم و التكنولوجيا
*Ali A. Abdul Abass | Mohammad A. Al-A'adhmi | Baraa Q. Al-Awadi
Ministry of Science technology

الملخص

تم دراسة تثبيط الفعل التطفيري للميثوتركسيت على الخلايا اللمفاوية في الانسان خارج الجسم الحي *in vitro* باستخدام المستخلص المائي لعشبة اكليل الجبل وبالاعتماد على التحليلات الخلوية الوراثية كاختبار معامل الانقسام الخلوي واختبار التغيرات الكروموسومية باستخدام تركيزين من الميثوتركسيت وقد اظهرت نتائج هذه الدراسة ان لمستخلص اكليل الجبل القابلية على تثبيط الاثر السمي للميثوتركسيت. اذ ظهر ان تعريض الخلايا للمستخلص قبل تعريضها للميثوتركسيت للمعاملةT1 ذو كفاءة تثبيطية اعلى مقارنة بالحالة التي يكون فيها تعريض الخلايا للميثوتركسيت مع المستخلص معا المعاملة T2 او تعريض الخلايا للميثوتركسيت ثم للمستخلص المعاملة T3 لذا يعد مستخلص اكليل الجبل عاملا مضادا للتطفير خارج الخلية بالمرتبة الاولى ويوصف كعامل مضاد للتطفير داخل الخلية بالمرتبة الثانية.

الكلمات المفتاحية: ميثوتركسيت، اكليل الجبل، الاثر السمي الوراثي، الفعل التطفيري

Abstract

***In vitro* experiments were designed to investigate the role of aqueous extract of *Rosmari nusofficinalis*in the inhibition of genotoxic effect of methotrexate (MTX) in human lymphocyte. Mitotic index MI, chromosomal Aberation CA used us cytogenetic tests to detect the inhibition of genotoxic effect of Methotrexate using two concentration. The results showed that the aqueous extract of *Rosmari nusofficinalis* inhibited the genotoxic effect of Methotrexate in human lymphocyte. As well as the exposure of cells to aqueous extract before expose to Methotrexate T1 had a high inhibitory efficiency comparing with the combined exposureto the extract & Methotrexate together T2 and the exposure to the Methotrexate before extract. According to our obtained results it could be the aqueous extract of *Rosmari nusofficinalis* considereds as a antimutagene agent (Desmutagen) in first place and as a antimutagene agent (Bioantimutagene) in second place.**

Key words:Methotrexate, *Rosmari nusofficinalis*, Genotoxicity, Chromosomal Aberration.

المقدمة

معظم الادوية المضادة للسرطان ذات تاثيرات جانبية عديدة اهمها قابليتها السمية الوراثية[1] و منها الميثوتركسيت Methotrexate MTX الذي يستعمل لمعالجة الاورام السرطانية المبكرة ويمتلك تاثيرات سمية وراثية وقابلية على استحثاث التغيرات الكروموسومية في خلايا الحيوان و الانسان[2]، وتعزى سبب التاثيرات السمية الوراثية لهذا العقار الى مقدرته على التداخل مع المادة الوراثية و ينتج ثاثيره من خلال التاثير في عملية انقسام الخلية بتاثيره في تثبيط فعالية انزيم DihdrofolateReductase (DHFR) الذي يعد العامل الرئيسي في نمو و انقسام الخلايا اللمفاوية للإنسان [3] كما انه يؤدي الى منع عملية الاصلاح في جزيئة الدنا وحدوث التغيرات فيها [4]. ولأهمية الموضوع اجريت هذه الدراسة لتثبيط الاثرالسمي الوراثي للميثوتركسيت في الخلايا اللمفاوية لدم الإنسان خارج الجسم الحي باستخدام المستخلص المائي لاكليل الجبل الروزماري Rosemary او حصى البان وهو من الفصيلة الشفوية Labiatae، النبات عبارة عن شجيرات صغيرة دائمة الخضرة، يصل طولها الى90 سم اوراقها خضراء باهتة ابرية متقابلة كثيفة طولها 2-3 سم و ازهارها بنفسجية اللون موطنها حوض البحر المتوسط مثل الجبل الاخضر في ليبيا [5] يستخدم النبات طبيا كمضاد للبكتريا antibacterial ومضاد للتطفير antimutagenic وكعامل واقي من المواد الكيميائية [6] chemopreventive agent. وفي هذا البحث استخدمت فحوصات الوراثة الخلوية المشتملة على حساب معامل الانقسام الخلوي MIMitotic index واختبار التغيرات الكروموسومية CA باستخدام تراكيز مختلفة من الميثوتركسيت.

المواد وطرائق العمل

1- **جمع عينات الدم**: تم جمع عينات الدم المحيطي من 6 أشخاص اصحاء غير موظفين ولا يتعاطون المشروبات الكحولية

2- **تحضير تراكيز الميثوتركسيت و المستخلص العشبي**

اولا : تراكيز الميثوتركسيت : تم تحضير المحلول الخزين لعقار الميثوتركسيت Methotrexate stock solution وذلك بتعليق محتويات انبوبة واحدة من العقار المنتج من قبل شركة Osaka اليابانية ذات وزن 50 ملغم في 50 مل من الماء المقطر المعقم للحصول على تركيز من العقار يعادل 1 ملغم /مل والذي حضرت منه التراكيز التالية المستخدمة في التجربة:

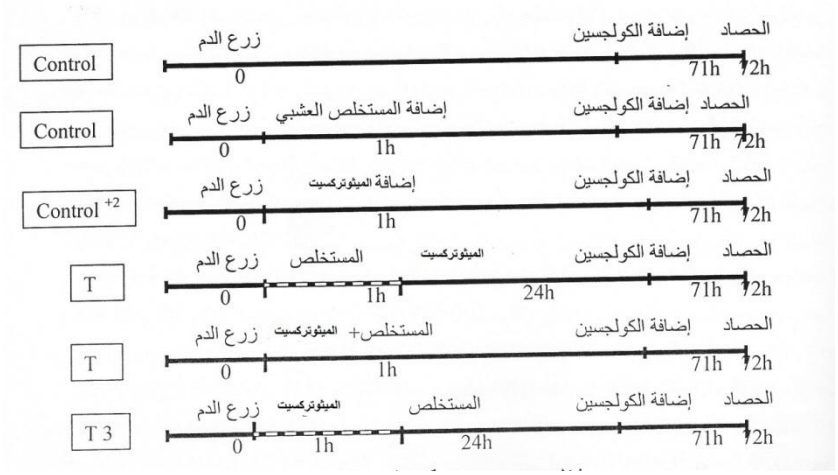
- 10 مايكروغرام / مل .
- 50مايكروغرام / مل .

ثانيا : تراكيز المستخلص العشبي: اتبعت طريقة Sakai [7] في تحضير المستخلص المائي لإكليل الجبل وذلك بوزن 10 غرام من المسحوق النباتي في دورق زجاجي، وتم اضافة 100مل من الماء المقطر بنسبة1 : 10 وزن الى حجم بعدها ترك لمدة 24ساعة في حمام مائي هزاز وبدرجة حرارة 50 م، رشح النقيع خلال اوراق ترشيح Whattman 1 وطرد بسرعة 2000 دورة في الدقيقة لمدة 10دقائق، اهمل الراسب وعقم الراشح خلال اوراق ترشيح ذات ثقوب بقطر 0.22Mm ثم حفظ المستخلص في قناني زجاجية بدرجة -20م لحين الاستعمال.

3- زرع الخلايا اللمفاوية : زرعت نماذج الدم وفق طريقة Benn &Perle (1992) [8] في وسطRBMI 1640 تم اجراء عملية زرع الدم تحت ظروف معقمة جدا داخل الكابينة المعقمة وتمت زراعة الدم كالاتي: خصصت النماذج المزروعة في هذه المجموعة لدراسة التغيرات الكروموسومية حيث زرعت نماذج الدم بـ 6 مكررات لكل نموذج باضافة 0.3 مل من الدم لكل شخص الى كل انابيب زجاجية معقمة تحتوي على 4 مل من الوسط الزرعي RPMI1640 المحضر مسبقا و الحاوي على الكلوتامين وكاربونات الصوديوم الهايدروجينية و المضادات الحيوية سربتومايسين/ البنسلين ثم اضيف لكل انبوب 1 مل من مصل اجنة العجول FCS و 0.3 مل من مادة محفز الانقسام الحيوي PHA. اغلقت الانابيب باحكام ومزجت محتويات كل انبوب جيدا وثبتت المعلومات الخاصة بها، حضنت الانابيب بدرجة حرارة 37م ولمدة 71 ساعة وتم رج الانابيب بهدوء مرة واحدة على الاقل كل 24 ساعة خلال فترة الحضن.

اسلوب المعاملة: نتبع الاسلوب التالي لاجراء المعاملات:

1. اضيفت تراكيز الميثوتركسيت بعد عملية زرع الخلايا بساعة واحدة وبعد مرور 24 ساعة تمت اضافة المستخلص العشبي.
2. اشيفت التراكيز المختلفة من الميثوتركسيت مع تراكيز المستخلص العشبي مجتمعة بعد عملية زرع الخلايا بساعة واحدة .
3. اضيفت تراكيز المستخلص العشبي بعد عملية زرع الخلايا بساعة واحدة وبعد مرور 24 ساعةمن الزرع والحضن تمت اضافة التراكيز المختلفة للميثوتركسيت والشكل رقم 1 يمثل منهجية التجربة.



شكل (1): يبين منهجية التجربة

تحضير الكروموسومات Preparation of chromosome

لايقاف الانقسام الخلوي في الطور الاستوائي اضيف 10 ملغم / مل من الكولجسين في الساعة 71 من الحضن لكل انبوب زرع رجت جيداً وبهدوء ثم اعيدت إلى الحاضنة لاكمال مدة الحضن إلى 72ساعة وبدرجة حرارة 37م. ثم اجريت عملية الحصاد والتثبيت للحصول على الخلايا باجراء عملية النبذ المركزي بسرعة 2000 دورة/دقيقة ولمدة عشرة دقائق، أهمل الراشح واخذ راسب الخلايا ثم اضيف إلى الخلايا 5مل من محلول كلوريد البوتاسيوم 0.075 KCl مولاري محلول واطئ التوتر Hypotonic وحضنت في درجة حرارة 37 م لمدة 20 دقيقة ثم عوملت الخلايا بعد نبذها مركزياً بالمثيان انياً 3 : 1 ميثانول: حامض الخليك الثلجي حيث غسلت بهِ ثلاث قطرت الخلايا على شرائح زجاجية.

*** حساب معامل الانقسام Mitotic index (MI) :** يحسب من خلال النسبة المئوية بين عدد الخلايا اللمفاوية المنقسمة إلى عدد الخلايا اللمفاوية الكلي المنقسمة وغير المنقسمة حيث يتم فحص 1000 خلية وتطبق المعادلة التالية :

$$\text{معامل الانقسام MI\%} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسم}}{\text{عدد الخلايا الكلي}} \times 100$$

*** حساب التغيرات الكروموسومية:** لحساب التغيرات الكروموسومية CAتصبغ الشرائح الزجاجية المجففة الحاوية على عالق الخلايا بدرجة حرارة الغرفة بصبغة كمزا 8% لمدة 2 دقيقة ثم فحصت 100 خلية مارة في الطور الاستوائي من الانقسام الخلوي اختيرت عشوائياً واستخدمت العدسة الزيتية للمجهر الضوئي لغرض الفحص وحساب المعدل [9].

أجري التحليل الاحصائي باستخدام SPSS، وكذلك إختبار Duncan لمعرفة معنوية الفروق بين المتوسطات.

النتائج والمناقشة

تعد الاختبارات الوراثية الخلوية من الاختبارات المعتمدة في الكشف عن تأثير الملوثات البيئية المختلفة على المادة الوراثية وكذلك الكشف عن المواد التي لها القابلية على تثبيط الاثر السمي الوراثي للمطفرات [10] ومن الاختبارات المعتمدة في هذا المجال والتي اعتمدت في هذه الدراسة اختبار معامل الانقسام الخلوي واختبار حث التغيرات الكروموسومية من اجل تقييم قابلية المستخلص المائي لعشبة اكليل الجبل في تثبيط الاثر السمي الوراثي للميثوتركسيت وكانت النتائج كما مبين في كل من الجدول (1،2).

جدول (1): يبين مؤشر معامل الانقسام الخلوي والتغيرات الكروموسومية في الخلايا المعاملة بالمستخلص النباتي الميثوتركسيت بتركيز 10 مايكروغرام/مل

	المعاملات	MI	كسر Break	حلقي Ring	التغيرات الكروموسومية (CA) / خلية بدون مركز Acentric	ثنائي المركز Dicentric	المجموع
	سيطرة سالبة 1	9.12	0.06	-	-	-	0.06
	سيطرة سالبة 2 (المستخلص العشبي)	9.00	0.08	-	-	-	0.08
	سيطرة موجبة (الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل)	4.25	3.42	0.10	0.12	-	3.64
T1	مستخلص ثم (الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل)	7.68	1.88	0.03	0.04	-	1.95
T2	مستخلص + (الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل)	5.39	2.16	0.05	0.06	-	2.27
T3	(الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل) ثم المستخلص	5.36	2.36	0.06	0.08	-	2.50

جدول (2): يبين مؤشر معامل الانقسام الخلوي والتغيرات الكروموسومية في الخلايا المعاملة بالمستخلص النباتي والميثوتركسيت بتركيز 50 مايكروغرام / مل

	المعاملات	MI	كسر Break	حلقي Ring	التغيرات الكروموسومية (CA) / خلية بدون مركز Acentric	ثنائي المركز Dicentric	المجموع
	سيطرة سالبة 1	9.12	0.06	-	-	-	0.06
	سيطرة سالبة 2(المستخلص العشبي)	9.00	0.08	-	-	-	0.08
	سيطرة موجبة (الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل)	2.66	4.23	0.11	0.13	0.08	4.55
T1	مستخلص ثم (الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل)	6.04	2.36	0.06	0.08	0.05	2.55
T2	مستخلص + (الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل)	4.44	3.36	0.06	0.08	0.05	3.55
T3	(الميثوتركسيت 10مايكروغرام /مل) ثم المستخلص	4.16	3.42	0.06	0.10	0.06	3.64

1. **معامل الانقسام الخلوي:** يلاحظ من جدول (1،2) ان قيم معامل الانقسام الخلوي قد انخفضت معنويا نتيجة لتعريض الخلايا للتراكيز المختلفة من الميثوتركسيت حيث يلاحظ ان قيم الانقسام الخلوي لمجموعة السيطرة كانت 9.12% وقد اصبحت 4.25%، 2.66% عند معاملة الخلايا بالتراكيز 10،50مايكرغرام/مل من الميثوتركسيت على التوالي وهذا الانخفاض يعطي مؤشراً ان الميثوتركسيت يحدث ضرر في ميكانيكية النظام المسؤول عن السيطرة على عملية الانقسام الخلوي من خلال تأثيره بثبيط فعالية انزيم DHFR DihdrofolateReductase الذي يعد العامل الرئيسي في نمو وانقسام الخلايا [3،19]. من جانب اخر نلاحظ ان المستخلص المائي لاكليل الجبل القابلية على تثبيط الاثر السمي الوراثي للميثوتركسيت وتمثل ذلك بزيادة نسب الانخفاض لمؤشر الانقسام الخلوي نتيجة لتعريض الخلايا للميثوتركسيت، وتشير النتائج إلى ان معاملة الخلايا اولا بالمستخلص ثم تعريضها للميثوتركسيت المعاملة T1 يوفر حماية للخلايا من التأثير الضار للميثوتركسيت وبفرق معنوي عن معاملة الخلايا للميثوتركسيت والمستخلص في آن واحد المعاملة T2 أو معاملة الخلايا اولا بالميثوتركسيت ثم المستخلص المعاملة T3وهذه النتائج توافق ما اشار اليه Oluwatuyi وزملائه [6] حول امتلاك عشبة اكليل الجبل القابلية على الوقاية من تأثيرات العوامل الكيمياوية الضارة.

2. **مؤشر التغيرات الكروموسومية:** من ملاحظة النتائج في جدول (1،2) التي تبين ارتفاع نسبة التغيرات الكروموسومية وبشكل معنوي $p < 0>01$ نتيجة لتعريض الخلايا لتراكيز مختلفة من الميثوتركسيت وازدات هذه النسبة بزيادة التركيز حيث سجلت نسبة الكسور الكروموسومية بشكل واضح وكذلك سجلت تغيرات كروموسومية من نوع الكروموسوم الحلقي والكروموسومات ثنائية المركز والقطع الكروموسومية عديمة المركز وهذا يدل على تأثير الميثوتركسيت على طبيعة البروتين الموجود في الكروموسومات او التأثير في جزيئة الدنا وفقاً لما اشار اليهِ Lioyd& Beck [19] حول تفسيره لتأثير المواد الكيمياوية على المادة الوراثية. ومن خلال النتائج نلاحظ ان معاملة الخلايا بالمستخلص المائي لاكليل الجبل وفر حماية للخلايا من تأثير الميثوتركسيت وتمثل هذا بخفض معدل التغيرات الكروموسومية من 3.64% ،4.55% في الخلايا المعاملة 10، 50مايكروغرام/مل على التوالي إلى 1.95،2.55% بالنسبة للمعاملة T1 وانخفضت التغيرات إلى 2.27،3.55% بالنسبة للمعاملة T2 في حين كان الانخفاض في معدل التغيرات الكروموسومية للمعاملة T3 بمعدل 2.50، 3.64% في الخلايا المعاملة 10،50 مايكروغرام/مل على التوالي وهذا يشير بشكل واضح إلى آلية عمل مستخلص اكليل الجبل بوصفهِ عامل واقي من تأثير العوامل الكيميائية على المادة الوراثية.

الاستنتاج والتوصيات

مما تقدم نستنتج ان لمستخلص اكليل الجبل القابلية على تثبيط الاثر السمي للميثوتركسيت. ان تعريض الخلايا للمستخلص قبل تعريضها للميثوتركسيت للمعاملة T1 ذو كفاءة تثبيطية اعلى مقارنة بالحالة التي يكون فيها تعريض الخلايا للميثوتركسيت مع المستخلص معاً للمعاملة T2 أو تعريض الخلايا للميثوترتكسيت ثم للمستخلص المعاملة T3 لذا يعد مستخلص اكليل الجبل عاملا مضادا للتطفير خارج الخلية أولا ويوصف كعامل مضاد للتطفير داخل الخلية ثانيا. ونوصي بإجراء دراسات مستفيضة تهدف إلى فصل وتنقية المكونات الفعالة لعشبة اكليل الجبل والوقوف على ميكانيكية فعله التثبيطي وكذلك نوصي ايضاً بدراسة قابليته التثبيطية تجاه مواد أخرى هي بتماس مباشر مع الصحة العامة للانسان.

المصادر

1. Shubber, F.K. Auda, H.M. Jaffer, Z.M.T. and Abdul-Rahman, M. (1999). Phenotypic expression of three genetic markers in human lymphoblastoid cells, GM-7254 treated with MMC. Nucleus. 42: 122-130.
2. Jaffer, Z.M.T. Shubber, E.K. and Amash, H.S. (2001). Cytogenetic analysisi of Chinese hamster lung fibroblasts, V-79, spontaneously resistant to MTX. Nucleus. 44: 28-31.
3. Huennekens, F.M. (1994). The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. Adv. Enzyme. Regul. 34: 397-419.
4. Borchers, A.H., Kennedy, K.A. and Straw, J.A. (1990). Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in Chinese hamaster ovary cells following exposure to ultraviolet irradiation or ethyl methane sulfonate. Cancer Res. 50:1768-1789.
5. السيد، عبد الباسط محمد. (2012). الموسوعة الام للعلاج بالنباتات والاعشاب الطبية. الطبعة الرابعة. دار الفا للطبع والنشر. مصر.
6. Oluwatuyi, M., Kaatza, G.W. and Gibbons, S. (2004). Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmari nusofficinalis*. Phytochem.65: 3249- 3254.
7. Sakai, Y., Nagase, H., Ose, Y. Sato, T. Yamada, A. Hibi, M. And Yamad, F. (1986). Antimutagenecity of extract from crude drugs in Chinese Medicine. Mutat. Res.**174**: 1-4.
8. Benn, P. And Perle, A. (1992). Chromosome staining & banding technique. In " HumanCytogenetics" D. Rooney & B. Czpulkowski (Eds.). Oxford University Press: Uk.
9. Freshney, R. Ian. (2000). Culture of animal cells: A manual of basic Technique 4th ed. New York: Wiley- Liss.
10. McGregor, D.B., Rice, J.M. and Venitt, S. (eds.). (1999). The use of short-& medium- term test for carcinogenic & data genetic effects in Carcinogenic hazard evaluation printed in france. pp: 203-251.
11. Beck, F. And Lioyd, J.B. (1978). The cell in medical science, Vol. IV, Academic press. 357-404