قابلية الفينولات المتعددة المستخلصة من الشاي الاخضر *Camellia sinensis* في التأثير على السمية الوراثية للكاتيكول في خلايا نقي عظم الفئران (داخل الجسم الحي)

The ability of polyphenols extracted from green tea *Camellia sinensis* in influence of genetic cytotoxicity of catechol on mice bone marrow cells *(in vivo)*

محفوظة عباس عمران غازي منعم عزيز ناهي يوسف ياسين*

قسم التقنيات الاحيائية – كلية العلوم / جامعة بغداد
*المركز العراقي لبحوث السرطان والوراثة الطبية / الجامعة المستنصرية

Mahfoodha Abbas Umran Ghazi Munim Aziz
Nahi Yousif Yaseen*

Biotechnology Dept./ Collage of science / Baghdad University
*Iraqi center of cancer research and medical genetic/ Al-Mustansiriyha University

المستخلص

إستخلصت الفينولات المتعددة من الشاي الأخضر مائياً وفصلت التربينات بإستعمال الكحول المثيلي ، وقد تم الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات الناتجة بوساطة الطرائق الكيميائية التقليدية ، إذ مثلت الفينولات المتعددة (F1) 27.6 % ، والتربينات (F2) 3.0 % من الوزن الجاف . وبلغت حصيلة الكاتيكينات في جزء الفينولات المتعددة 67.2 % من مكوناته بإستعمال كروموتوغرافيا السائل الفائق الكفاءة . اظهرت النتائج ان التجريع الفموي المفرد للفئران بكلا تركيزي الكاتيكول (156و 234 ملغم/كغم) سبب انخفاضا في نسب Mitotic index (MI) و Blastogenic index (BI) مع ارتفاع في نسب Micronucleus (MN) لخلايا نقي العظم، ولم ينتج من معاملة الحيوانات بالكاتيكينات(كشراب وحيد طيلة مدد الدراسة) بتركيز 0.05% بمفردها فروقا معنوية في نسب BI وارتفاعا معنويا في MI مع ظهور انخفاض في نسب MN ، وتحسنت المؤشرات الوراثية المتمثلة BI ، و MN نحوالافضل في المعاملات المتداخلة بين الكاتيكينات والكاتيكول مقارنة مع المعاملة المفردة للكاتيكول ، بينما سجل انخفاضا معنويا في نسب MI وارتفاعا معنويا في نسب MN في الحيوانات المعاملة بالميثوتركسيت بالقياس مع السيطرة السالبة وبتقدم مدد التجريع من 2-6 أسابيع .

Abstract:

Aqueous and methanolic of polyphenols and trepenoids extractions were obtained from green tea leaves. Process of confirmation were performed with conventional qualitative chemical tests,polyphenols(F1)and trepenoids(F2) represented 27.6% and 3.0% from dry weight of leaves recepectively .Catechins recovery was 67.2% from the original polyphenols (F_1) contents by HPLC. Results showed that, a single oral administration for mice of both catechol

concentrations (156 and 234 mg/kg) caused decreasing mitotic index (MI), blastogenic index (BI) and increasing micronucleus frequency (MN) in bone marrow, catechins treatment due to non significant changes in BI, significant increasing in MI and decreasing in MN, while the combination treatments (catechins and catechol) improved the cytogenetic parameters (BI, MN) in comparison with single treatments of catechol. In fact a clear effect in mitotic activity was reveal such as decreasing in MI and significant increasing in MN after Methotrexate (MTX) treatment dependent on the periods of administration (2-6 weeks), and/or in comparison with negative control.

المقدمة :

يعد الشاي *Camellia sinensis* من بين النباتات المفيدة والذي يتناوله الانسان بوصفه شراباً بالمرتبة الثانية بعد الماء . اذ يحضر بثلاثة اشكال رئيسة هي : الشاي الاخضر ، والاسود ، والمخمر جزئياً (Oolong) . يصنع الشاي الاخضر بتجفيف الاوراق الطرية (المقطوفة الخضراء) وتثبيط فعالية انزيم البولي فينول اوكسيديز Polyphenol oxidase (PPO) للحفاظ على المكونات الفينولية للاوراق [1] التي تكون – 42 % 30 من الوزن الجاف للاوراق ، حيث يشكلEpigallocatechin gallate (EGCG) الجزء الاكثر اهمية بوصفه مضاداً للاكسدة من بين الفينولات المتعددة الاخرى والمتمثلة Epigallocatechin (EGC) وEpicatechin gallate (ECG) و Epicatechin (EC) التي تعرف هذه المركبات بالكاتيكينات [2] Catechins . كما وتوصف الكاتيكينات بكونها مضادة للسرطان والاورام [3] .

يعد تعرض العاملين في المهن الصناعية النفطية للبنزين سبباً لامراض سرطانية للانسجة المولدة للدم ، اذ يكون التعرض المزمن له مسرطن في الجرذ والفئران [4] ومؤدياً إلى حدوث اضرار (الليوكيميا) في دم الانسان[5] . إذ يظهر البنزين تاثيراته السمية بفعل متايضاته المتكونة داخل الجسم الحي بوساطة السايتوكروم P 450 – والتحولات التلقائية والانزيمية لتلك المتايضات لتكوين الفينول والكاتيكول والهيدروكوينون[6]. حيث تتراكم هذه المتايضات في نقي العظم بوصفها مؤكسدات (Oxidants) ومواد اساس للبيروكسيديزات ينتج عنها انواع الاوكسجين المتفاعل Reactive oxygen species (ROS) ذات تاثيرات سمية لنظام توليد الدم وكجزيئات جاذبة للالكترونات (Electrophils) تتفاعل مع الجزيئات الكبرى مثل الدنا (DNA) والبروتينات [7]. إذ تتأتى السمية المتسببة عن الكاتيكول الذي يكون احد متايضات Catechol estrogens و Catecholamine (داخلية المنشأ) ، فضلاً عن الكوينونات quinines المتكونة عن الاكسدة الانزيمية للكاتيكول بفعل انزيم Catechol-O-methyltransferase (COMT) ، والدوبامين بفعل البيروكسيديزات و tyrosinases داخل الجسم الحي التي تحث مايكروسومات الكبد للتفاعل مع الدنا وازالة البيورينات [7] .

لذا اقترحت هذه الدراسة التي تهدف الى تحديد تاثير الفينولات المتعددة المستخلصة من الشاي الاخضر في السمية الوراثية المتسببة عن الكاتيكول داخل الجسم الحي (الفئران) وتاثيراتهما المتداخلة في بعض المؤشرات الوراثية الخلوية لخلايا نقي العظم .

المواد وطرائق العمل

الشاي الاخضر

تم الحصول على اوراق الشاي الصيني الاخضر الجاف والخال من اي نكهه اضافية والمحفوظ في حاويات معدنية مطلية من الداخل (مغلونة) بتعبئة وزن 200 غرام من الاسواق المحلية – بغداد والمورد من شركة Twinings الانكليزية .

إستخلاص المركبات الفعالة Extraction of active compounds

استخلصت المركبات الفعالة الرئيسة من أوراق الشاي الأخضر تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل [8] التي تضمنت مرحلتين ، في المرحلة الاولى خلط 200 غرام من اوراق الشاي الاخضر بعد طحنها مع 400 مللتر من مزيج الكحول الميثانولي 95% بالماء المقطر بنسبة المحضر (1:9) ، وتم تحريك الخليط المتكون لمدة 18 ساعة باستخدام المحرك المغناطيسي بدرجة حرارة الغرفة بعدها رشح الخليط باستعمال ورق ترشيح واتمان رقم 1

بوساطة مضخة تخلخل ضغط وحفظ الراشح . اخذ الراسب واعيد استخلاصه في المرحلة الثانية مع 200 مللتر من الكحول المثيلي المخفف بالماء المقطر بنسبة 1:1 تحت الظروف ذاتها للمزج في المرحلة الاولى ثم رشح الخليط باستخدام ورق الترشيح واتمان رقم 1 .

جمع الراشح المتكون في المرحلة الاولى والثانية وتم تبخيره بالمبخر الدوار (Rotary evaporater) بدرجة حرارة 50 م لاجل تركيزه الى ثلث حجمه الاصلي .

نقي المستخلص المركز من الملوثات ذات القطبية الواطئة باضافة الكلورفورم الى المزيج في قمع فصل Separating funnel بنسبة 20:100 (حجم مستخلص : حجم الكلوروفورم) ، وخلط المزيج جيدا وترك لمدة ساعة لانفصال طورين حيث يمثل الطور العلوي الطبقة المائية والطور السفلي يعود لطبقة الكلورفورم التي جمعت بشكل منفصل في وعاء نضيف ، ثم اعيد تنقية الطبقة المائية ثانيا باضافة الكلوروفورم الى المزيج بنسبة 10:100 (حجم المستخلص : الكلوروفورم) وخلط المزيج جيدا بالظروف المذكورة اعلاه لانفصال طورين اذ جمعت الطبقة السفلى مع سابقتها للوعاء نفسه وتم تركيزها بالمبخر الدوار للحصول على مسحوق اخضر (F2) في حين تم تجفيف الطبقة المائية باستخدام المجفد Lyophilizer للحصول على مسحوق بني غامق (F1) .

الفحوصات الكيميائية:

اجريت الاختبارات جميعا باستخدام 5 مللتر من المستخلصات المستحصلة F1 و F2 في الفحوصات الاتية:

اختبار القلويدات Alkaloids Tests

اجري اختبار القلويدات استناداً الى كاشف Modified Dragendrof (دراجندروف المحور) اذ اعتمد الكشف موجباً للقلويدات بظهور راسب برتقالي [9] ، واختبار ماير (Myer's test) باستعمال كلوريد الزئبقيك وايوديد البوتاسيوم للاستدلال على الكشف الموجب للقلويدات بتكون راسب ابيض [10] .

الكشف عن الفينولات المتعددة Test for polyphenols

تمثل الكشف عن الفينولات المتعددة بالكشوفات الاتية :

الكشف عن التانينات (الدباغيات) Test for tannins

كشف عن التانينات باستعمال كلوريد الحديديك 1% [11] ، وخلات الرصاص 1% حيث يستدل على ايجابية الفحص بظهور اللون الازرق ، وراسب هلامي ابيض على التوالي .

الكشف عن الفلافونيدات Test for flavonoids

اجري هذا الاختبار استناداً الى ما تم وصفه من قبل Al-shahat [9] إذ يظهر الفحص الموجب لون اصفر غامق .

الكشف عن الكاتيكينات Test for catechins

اجري هذا الكشف بغمر قطعة من شريط تعقيم (Autoclaveable sticker) في المستخلص (النموذج) ثم جفف وبعدها رطب بقطرات من حامض الكبريتيك المركز ثم دفيء قرب اللهب ، حيث يستدل على ايجابية الفحص بتحول لون الشريط الى اللون الوردي او الاحمر [11] .

الكشف عن التربينات Test for triterpenoids

اختبار (Liebermann-Burchard)

حضر هذا الكاشف بمزج 4 مللترات من حامض الخليك اللامائي (Acetic acid anhydride) مع 1 مللتر من حامض الكبريتيك المركز ، ثم اضيفت قطرات عدة من هذا الكاشف المحضر انيا الى 5 مللترات من النموذج ، حيث يظهر لون غامق للمزيج (اخضر- ازرق) في الفحص الموجب للتربينات [12] .

الكشف عن الصابونين Test for saponin:

اجري هذا الاختبار استناداً الى ما ذكره الباحث Harborne [12] حيث يعد ظهور الرغوة الكثيفة دليل على ايجابية الفحص.

كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة High performance liquid chromatography

أجري هذا التحليل بحقن 20 مايكرولتر من المحلول القياسي المحضر بتركيز 10 مايكروغرام / مللتر المتكون من كلٍ من Catechin و Epicatechin و Epigallocatechin و Epigallocatechin gallate و Epicatechin gallate والمورودة من شركة Sigma و 20 مايكروليتر من النموذج (F1) قبل التجفيد

والمخفف ثلاث مرات قبل الحقن في عمود C-R6A (4.6×5mm) ذي حبيبات بقطر 3 مايكرومتر بوصفه طور ثابت ، وقد استردت مكونات المحلول القياسي والنموذج بمحلول ذو تدرج خطي من داريء فوسفات البوتاسيوم بتركيز 10 ملي مولار ورقم هيدروجيني 2.6 والمذيب العضوي الاسيتونايترل لنفاذيته كطور متحرك ، حيث كان وقت الاسترداد 0-12 دقيقة وبمعدل جريان 1.2 مللتر/دقيقة ، ثم قرأ الامتصاص للاجزاء المستردة باستخدام المطياف الضوئي وعلى طول موجي 280 نانوميتر .

اختبار السمية الوراثية للكاتيكول في الفئران:

بعد استخلاص الكاتيكينات(F1) من اوراق الشاي الاخضر والتأكد من تشخيصها نوعياً وكمياً ولغرض متابعة تأثير هذا المستخلص ، وكذلك الكاتيكول المورد من شركة Fluka بنقاوة 99 % تم الأستعانة بالحيوانات المختبرية لتحديد تأثير الكاتيكينات في السمية الوراثية المتسببة عن الكاتيكول وتأثيراتهما المتداخلة داخل الجسم الحي*in vivo* .

الحيوانات المختبرية

استخدمت ذكور فئران سويسرية بيضاء *Mus musculus* ضرب Balb / C بعمر 8-10 اسابيع ، تم إيوائها وتربيتها في البيت الحيواني لمركز بحوث التقنيات الأحيائية / جامعة النهرين في ظروف مختبرية مثلى من درجة الحرارة 28 م واضاءة وظلام متعاقبين 12:12 وبلغ وزن الحيوانات 23-25 غرام .

وزعت هذه الحيوانات الى سبعة مجاميع ووضعت في اقفاص بلاستيكية مخصصة لهذا الغرض وبواقع 9 حيوانات لكل مجموعة . وقد اطعمت هذه الحيوانات بالعليقة المحضرة محلياً ، وشُرِّبت ماء الحنفية او محلول الكاتيكينات بتركيز 0.05 % عن طريق القنينة المخصصة للشرب في الاقفاص حسب توزيع المجاميع الآتية :

مثلت المجموعة الاولى السيطرة السالبة التي لم تجرع فيها الحيوانات بأية مادة بل اطعمت العليقة المذكورة في الفقرة السابقة وشربت ماء الحنفية ، والمجموعة الثانية السيطرة الموجبة التي تم تجريعها بـ 0.1 مللتر من عقار الميثوتركسيت (MTX) المحضر بتركيز 12.5 ملغم/مللتراً للحصول على تركيز 50 ملغم/كغم من وزن الحيوانات وبمعدل 3-4 جرعات في الاسبوع عن طريق الفم ولمدد التجريع التي تراوحت بين 2 – 6 اسابيع . اما المجموعة الثالثة فلم تجرع بمادة بل شربت الكاتيكينات بتركيز 0.05% بوصفه شراباً وحيداً طوال مدد المعاملة للحيوانات . وجرعت المجموعة الرابعة والخامسة بـ 0.1 مللتر محلول الكاتيكول للحصول على تركيز 156 , 234 ملغم/كغم من وزن الحيوان على التوالي (اذ يمثلان التركيزان المذكوران LD_{50} 60 % و 90 % LD_{50} للكاتيكول) وبمعدل 3-4 جرعات اسبوعيا عن طريق الفم مع شرب الحيوانات لماء الحنفية طوال مدد التجريع . في حين مثلت المجموعتان السادسة والسابعة الحيوانات التي جرعت بالتراكيز المذكورة سابقاً من الكاتيكول (156 , 234) ملغم/كغم وبمعدل 3-4 جرعات اسبوعيا عن طريق الفم مع شرب الحيوانات الكاتيكينات بتركيز 0.05% كشراب وحيد طوال مدد الاحتفاظ بالحيوان .

المؤشرات الوراثية الخلوية

بعد انتهاء المدد المحددة لتجريع الفئران المعاملة والسيطرة السالبة والموجبة (2 و 4 و 6 اسابيع) حقنت الحيوانات قبل عملية التشريح (قتلها) بساعتين بمحلول (عالق) الكولجسين بتركيز 0.5 ملغم / مللتر وبمقدار 0.25 مللترا لكل حيوان داخل تجويف الخلب اعقبها عملية التخنيع ثم ثبت الحيوان على صحن التشريح وقص الجلد من الناحية البطنية السفلى بمحاذاة الفخذين وأزيل عظم الفخذين والساقين من الحيوان لاستخراج نقي العظم لاجراء التاثيرات السمية الخلوية داخل الجسم الحي .

تحضير الكروموسومات من خلايا جسمية لنقي عظام الفأر

عزلت الكروموسومات من هذه الخلايا تبعاً للطريقة الموصوفة من قبل الباحث Allen وجماعته [14] أذ علقت الخلايا المترسبة بالمحلول المثبت والمحضر انياً(الميثانول وحامض الخليك بنسبة(1:3)) ، وقُطرت 5 قطرات من العالق على شرائح زجاجية نظيفة وباردة وتركت لتجف في الهواء ثم صبغت بصبغة كمزا (Giemsa) وغسلت بعدها بالماء المقطر ثم فحصت بالمجهر الضوئي .

اعتمدت هذه الشرائح بوصفها طريقة مباشرة لدراسة معامل الانقسام الخلوي Mitotic index (MI) ومعامل التحول الارومي Blastogenic index (BI) على وفق الطريقة المتبعة في [14] إعتمادا على المعادلات الاتية :

$$\text{معامل الانقسام الخلوي} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{عدد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة}} \times 100$$

$$\text{معامل التحول الارومي} = \frac{\text{عدد الخلايا الارومية}}{\text{عدد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة}} \times 100$$

تردد تكوين النوى الصغيرة Micronucleus في خلايا نقي العظم

اجريت هذه الدراسة تبعاً للطريقة الموصوفة في [15] وكالاتي :

جمعت محتويات خلايا نقي العظم الذي تم حقنه بـ 1 مللتر من مصل العجل البقري Bovine Calf Serum (BCS) المثبط حرارياً بوساطة محقنة الانسولين في انبوب اختبار نظيف . ونبذت الانابيب بسرعة 1000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق . ثم مزج راسب الخلايا بكمية قليلة من الرائق المتبقي ثم اخذت قطرة واحدة من العالق على شريحة زجاجية تركت لتجف في ظروف المختبر . ثم ثبتت الخلايا على الشريحة باضافة 3-4 قطرات من الكحول المثيلي المطلق البارد وتركت لتجف ، بعدها صبغت بصبغة كمزا وفحصت بالمجهر الضوئي .

حسب تردد تكوين النوى الصغيرة على وفق المعادلة الاتية :

$$\text{تردد النوى الصغيرة} = \frac{\text{عدد النويات الصغيرة}}{\text{العدد الكلي للـ PCE}} \times 100$$

(polychromatic erythrocytes) PCE

التحليل الاحصائي

اجري التحليل الاحصائي باستخدام نظام احصائي جاهز Statistical Pakage for Social Scienes (SPSS) (Version 13) . إذ حُللت متغايرات هذه الدراسة الاولية باستعمال اختبار Kruskal-Wallis لتقويم الفروق المعنوية بين 3 او اكثر من مجاميع الدراسة واختبار Mann-Whitney لاظهار الفروق المعنوية بين كل زوجين من مجاميع الدراسة . اذ عدت قيم P المساوية او التي تقل عن 0.05 ذات معنوية احصائيا .

النتائج والمناقشة

استخلاص المركبات الفعالة في الشاي الاخضر

استخلصت المركبات الفعالة في اوراق الشاي الاخضر، وتم فصلها بشكل مساحيق لجزيئين اساسيين هما الجزء F_1 (مسحوق بني غامق)، والجزء F_2 (مسحوق اخضر). وقد بلغت نسبة الفينولات المتعددة (الجزء F_1) 27.6% و Triterpenoids (الجزء الثاني F_2) 3.0% من الوزن الجاف .

فبعد الحصول على الفينولات المتعددة والتربينات بالاعتماد على الطريقة الموصى بها في طرائق العمل اجريت الاختبارات الكيميائية النوعية التقليدية، وقد اعتمد اختيار الاختبارات الاتية على المجاميع الكبرى المثبتة في المصادر التي تمثل الفينولات المتعددة الجزء الاكبر في اوراق الشاي الاخضر والتي تتمثل بالكاتيكينات، والفلافونات ، والتانينات ، والاحماض الفينولية [16] .

الاختبارات الكيميائية العامة

اعتمدت هذه الاختبارات لاجل تحديد طبيعة المجاميع الفعالة في مستخلص اوراق الشاي مثل: (القلويدات، والتربينات، والفينولات المتعددة التي تضمنت الدباغيات، والفلافونات، والكاتيكينات) لذا اجريت العديد من الكشوفات الكيمائية النوعية لهذه المركبات في الجزيئين F_1 و F_2 والموضحة في الجدول (1) .

يظهر الجدول (1) النتيجة السالبة لاختبار القلويدات (دراجندروف وماير) لعدم تكون راسب برتقالي وابيض على التوالي ولكلا الجزئين F1 و F2 . كما اظهر الجزء F1 كشف موجباً للدباغيات عن طريق ظهور اللون الاخضر مع كلوريد الحديديك وراسب ابيض هلامي مع خلات الرصاص . واثبت الفحص عن الفلافونات والكاتيكينات كشفا موجباً في الجزء F1 ، بينما كانت النتيجة سالبة في الجزء الثاني (F2) الذي اظهر كشفا موجبا باستخدام اختبار ليبرمان – برجارد للكشف عن التربينات ، كما كانت نتيجة الفحص عن الصابونين سالبة ولكلا الجزئين (F1 , F2) .

جدول (1) الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلصات الخام للشاي الاخضر .

المركبات الفعالة	الكاشف	دليل الكشف	مستخلصات الشاي الاخضر	
			F_1	F2
القلويدات Alkaloids	دراجندوف	راسب برتقالي	–	–
	ماير	راسب ابيض	–	–
الدباغيات Tannins	كلوريد الحديديك 1%	لون ازرق مخضر	+	–
	خلات الرصاص 1%	راسب ابيض هلامي	+	–
الفلافونات Flavonoids	حامض الخليك اللامائي, ايثانول +KOH	لون اصفر	+	–
الكاتيكينات Catechins	شريط لاصق ورقي مغمور بالمستخلص ومرطب ب H_2SO_4 + لهب	لون احمر	+	–
التربينات Terpenoids	ليبرمان – برجارد	لون اخضر مزرق	–	+
الصابونين Saponin	الرج الشديد للمستخلص ثم كلوريد الزئبقيك 1%	رغوة كثيفة او تكون راسب ابيض	–	–

+ ايجابية الفحص

- سلبية الفحص

الاختبارات الكيميائية التحليلية

كروماتوغرافيا السائل عالي الكفاءة HPLC

فضلاً عن الكشوفات الكيميائية النوعية للمركبات الفعالة في مستخلص اوراق الشاي (F_1) فقد اجري هذا التحليل HPLC للمزيد من الكشف ولتشخيص المكونات الفعالة الاكثر اهمية في الفينولات المتعددة .

استردت مكونات المستخلص (F_1) من عمود C-R6A (5×4.6 mm) 3µm لكروماتوغرافيا السائل الفائق الكفاءة بالتدرج الخطي لداريء فوسفات الصوديوم والاسيتونايترل ولمدة 0-12 دقيقة بظهور قمم متعددة تباينت في اوقات استردادها , تمثلت باوقات الاحتجاز 3.15 ، و 4.083 ، و 4.765 ، و 5.377 ، و 6.735 دقيقة (الشكل1-B) اذ تقاربت بعض القمم وتطابقت أخريات مع اوقات استرداد المحاليل القياسية للكاتيكينات المحقونة في العمود ذاته والتي كانت اوقات احتجازها 3.417 ، و4.13 ، و4.78 ، و5.437 ، و 6.155 دقيقة (الشكل1-A) والمتمثلة بـ : Catechin و Epicatechin و Epigallocatechin و Epigallocatechin gallate و Epicatechin gallate على التوالي.

بلغت حصيلة استرداد الكاتيكينات في الجزء F_1 67.19% من المكونات الاصلية المحقونة في العمود والمتمثلة بالنسب 19.57% ، و 24.06% ، و 17.06% ، و 18.74% ، و 20.57% لكل من : Catechin و

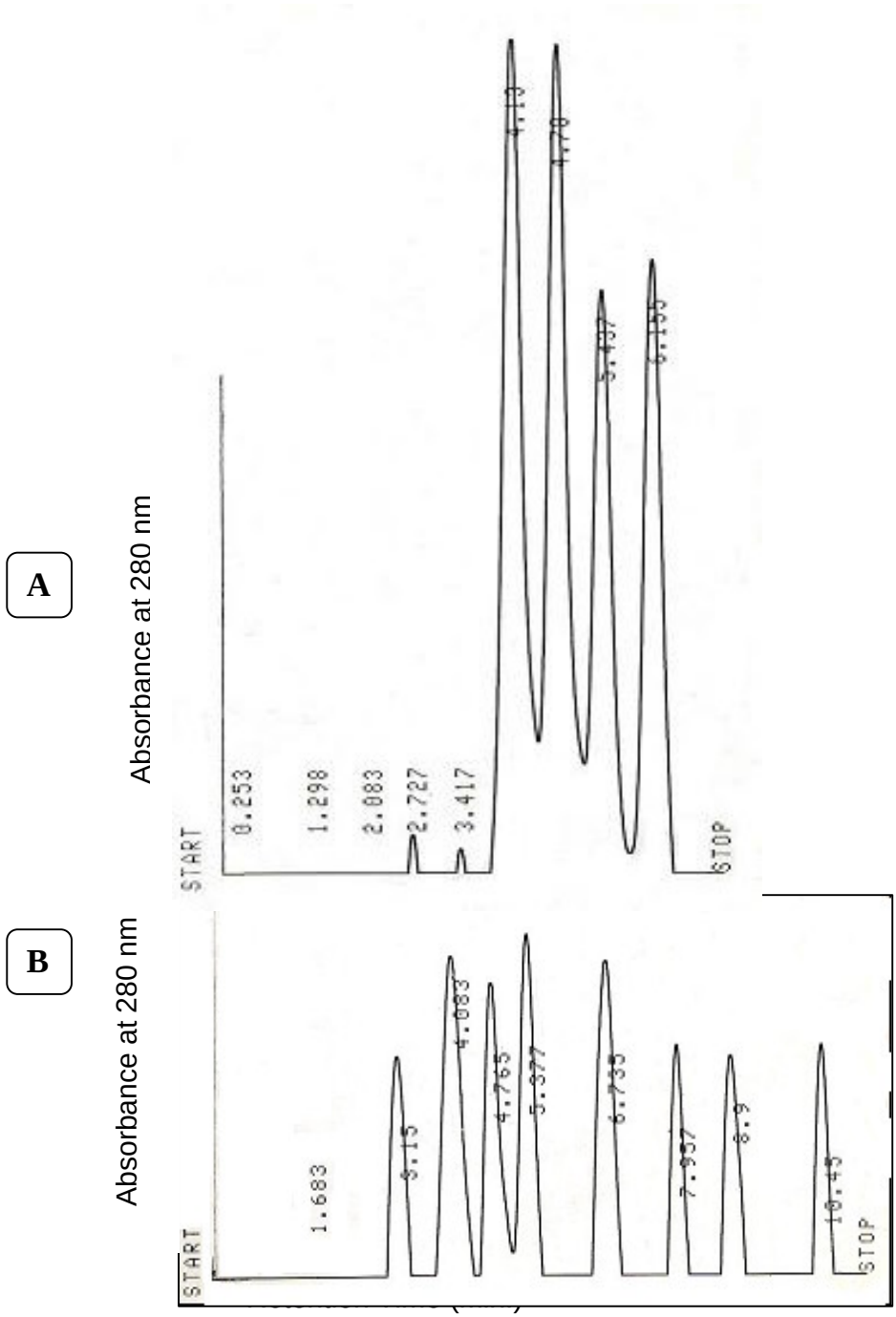
Epicatechin و Epigallocatechin و Epigallocatechin gallate و Epicatechin gallate على التوالي اعتمادا على اوقات احتجازها قياساً مع اوقات احتجاز المحاليل القياسية .

اما القمم الاخرى الظاهرة في الجزء F_1 التي كانت اوقات احتجازها 7.959 و 8.9 و 10.45 دقيقة فقد بلغت حصيلة استردادها 30.95% من المكونات الاصلية للمستخلص فهي على الاغلب تمثل الفلافونات الاخرى والدباغيات التي اظهرت كشفا موجبا في الاختبارات الكيميائية النوعية .

كشفت النتائج المستحصلة من هذه الدراسة وبالاعتماد على الفحوصات الكيميائية النوعية الموصى بها بوساطة HPLC ان الفينولات المتعددة هي المكون الرئيس في الشاي الاخضر التي تتضمن : الكاتيكينات ، والفلافونات ، والدباغيات فضلا عن التربينات . وقد وجد ان النسبة الكبرى من الدراسات البحثية تستعمل مركبات عالية النقاوة من الكاتيكينات ومشخصة مسبقا من الشركات المصنعة او المعاهد في بحوث السرطان والحيوانات التجريبية في حين تستعمل اخرى المستخلصات المستحصلة من الشاي الاخضر والمحضرة في المختبر[17] .

شخصت مئات عدة من الكيميائيات في اوراق الشاي ، الا ان اغلب الدراسات التي تواصلت مع بحوث السرطان تعنى بالفينولات المتعددة وخاصة مجموعة الكاتيكينات من الفلافونات (Flavanols) ، و Theanine (من مشتقات الحوامض الامينية N-methylated derived from glutamine) ، وان الفوائد المضادة للسرطان لايمكن ان تعزى الى مركب مفرد من الكاتيكينات او الحامض الاميني المعزول الا انها ذات تأثيرات متداخلة بوصفه خليطاً معقداً من شراب الشاي الطبيعي والى الفعل الحيوي لمكوناته . في الوقت الذي توجد كميات ضئيلة من الكاتيكينات في الشاي الاسود ،إذ يبقى Theanine دون تأثر بعمليات الاكسدة خلال تصنيع الشاي الاسود [18] . اثبتت النتائج المستحصلة من هذه الدراسة احتواء الشاي الاخضر على الكاتيكينات بنسبة 27.6% من الوزن الجاف وبكونها متقاربة مع النتائج المستحصلة من قبل باحثون آخرون أشاروا باحتواء الشاي الاخضر للفينولات المتعددة بنسبة تتراوح بين 30-36 % ، في حين سجل [19] ان نسبتها هي 36% . بينما كانت النسبة المسجلة للكاتيكينات والتربينات في الشاي الاخضر من قبل الباحث [20] 20.8% و 3.35% على التوالي . اذ يرجع هذا المدى الواسع من التباين في تركيز الفينولات المتعددة (الكاتيكينات) الى عوامل عدة تتضمن : المناخ ، وموسم اقتطاف الاوراق ، والممارسات الزراعية للنبات وبستنته ، فضلا عن نوع النبات وعمره [16] .

ويعود الانخفاض الحاصل في الكاتيكينات الى عمليات الاكسدة والبلمرة التي تعاني منها الجزيئات الصغيرة من الفينول المتعدد (الكاتيكينات) في ورقة الشاي بفعل انزيم polyphenol oxidase (PPO) ، اذ يحتمل ان تنخفض الكاتيكينات الى نصف قيمتها في الشاي الاخضر نتيجة الاكسدة الى معقدات اكثر من الفينولات المتعددة المركزة في اثناء التخمير [21] . حيث تبدأ مثل هذه التغيرات بشكل مباشر بعد قطف الاوراق النامية ، كما انها تزداد بفعل التلف الميكانيكي للاوراق وتكسير التركيب الداخلي لورقة الشاي والذي يجعل هذا الانزيم (PPO) من تماس مع الكاتيكينات (مادة اساس للانزيم) ، لذا من المهم تثبيط فعاليته وبالسرعة الممكنة وحال حصاد الاوراق للحصول على منتوج بمستو عال من مضادات الاكسدة للشاي الاخضر .



الشكل (1) :الفصل الكروماتوغرافي بوساطة HPLC للكاتيكينات القياسية (A) ومكونات الجزء F_1 للشاي الاخضر (B) بالطور المتعاكس في عمود C-R6A (5×4.6 mm) 3µm وطور متحرك بالتدرج الخطي لـ 10 ملي مولار داريء فوسفات الصوديوم والاسيتونايترل وبمعدل جريان 1.2 ملليتر/دقيقة .

تأثيرات الميثوتركسيت والكاتيكينات والكاتيكول في الوراثة الخلوية لخلايا نقي عظم الفئران

التأثيرات في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران

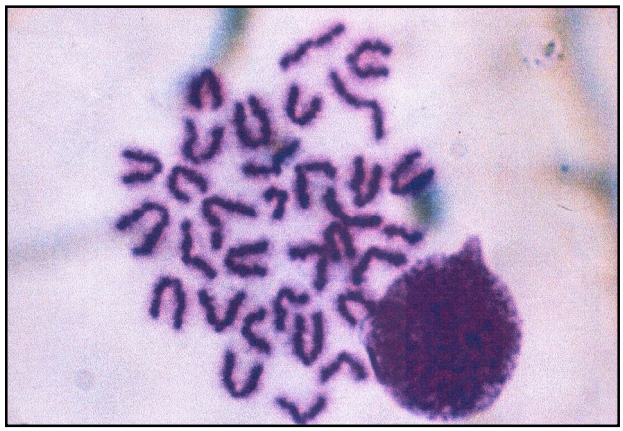
يوضح الجدول (2) تأثير الميثوتركسيت بتركيز 50 ملغم / كغم ، والكاتيكينات بتركيز 0.05% ، وتركيزين من الكاتيكول (156 و 234 ملغم / كغم) المجرعة فموياً لحيوانات التجربة السليمة (الفار) في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران . تراوح معامل الانقسام (MI) في خلايا نقي عظم فئران مجموعة السيطرة السالبة بين 4.33 - 4.42 % بعد 2 - 6 اسابيع من بدء التجربة. وسبّب تجريع الفئران بـ MTX بتركيز 50 ملغم / كغم انخفاضا غير معنوي ($P>0.05$) في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران بتقدم مدد التجريع ما بين 2-6 اسابيع والذي تراوح بين 2.5- 1.41 % ، بينما كان هذا الانخفاض معنوياً قياساً بمجموعة السيطرة السالبة ولمدد التجريع الثلاثة . اظهرت الحيوانات المتناولة الكاتيكينات بتركيز 0.05 % ارتفاعاً معنوياً في معامل الانقسام الخيطي بتقدم مدد التجريع من 2-6 اسابيع التي تراوحت فيها نسب MI بين 4.47 - 5.73 % ، ولم تسجل فروق معنوية بين تلك الزيادة في معامل الانقسام لهذه المجموعة قياساً مع نسب MI لمجموعة السيطرة السالبة بعد 2 و 4 اسابيع من التجريع بينما كان الارتفاع في (MI) معنوياً بعد 6 اسابيع فقط .

ونتج من تجريع الحيوانات بالكاتيكول (فقط) بالتركيزين 156 و 234 ملغم / كغم انخفاضاً غير معنوياً في معامل الانقسام الخيطي الذي تراوح بين 3.16 - 2.36 % و 3.94- 3.1 % على التوالي (جدول 2) بتقدم مدد التجريع الثلاثة ، وقد كان الانخفاض في نسب MI معنوياً لمجموعة الفئران المجرعة بالتركيز الاول من الكاتيكول بعد 4 و 6 اسابيع ، وللمجموعة المجرعة بالتركيز الثاني من الكاتيكول بعد 6 اسابيع من التجريع قياساً مع نسب MI للسيطرة السالبة . إذ تظهر الصورة الموضحة في الشكل (2) الطور الاستوائي لانقسام خلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالكاتيكول . وادت معاملة مجاميع الحيوانات المجرعة بالكاتيكول بالتراكيز 156 و 234 ملغم / كغم مع تناولها مستخلص الكاتيكينات بتركيز 0.05% بوصفه شراباً وحيداً طوال مدة التجريع من 2-6 اسابيع الى انخفاض غير معنوي في معامل الانقسام الخيطي والذي تراوح ما بين 2.86 – 1.59 % للتركيز الاول من الكاتيكول ومعنوي مع التركيز الثاني للكاتيكول والذي تراوح بين 3.01 – 1.45 % بتقدم مدد التجريع (جدول 2) . كما اظهرت هاتان المجموعتان انخفاضاً معنوياً في نسب MI قياساً مع نسب MI لمجموعة السيطرة السالبة ولمدد التجريع الثلاثة . واظهرت نتائج التحليل الاحصائي للبيانات الموضحة في جدول (2) وجود فروقاً معنوية في معامل الأنقسام الخيطي لخلايا نقي العظم بين مجاميع الحيوانات المعاملة كافة عند مدد التجريع 4 و6 اسابيع. بينت النتائج ان تجريع الحيوانات بـ MTX سبب انخفاضا في معامل الانقسام لخلايا نقي العظم قياساً مع السيطرة السالبة ، ولربما لهذا الانخفاض علاقة بالبروتينات و الانزيمات المتطلبة للانقسام الخيطي والتي قد لاتنتج بالكميات والمستويات ذاتها بالقياس مع السيطرة السالبة ، أو لعدم وصول الاشارات التي تحث توالد الخلايا ، فضلا عن تأثير العقار في مكونات خيوط المغزل خلال انقسام الخلية [22] ، وقد اشارت الدراسات المستحصلة من قبل الباحث [23] التي وجدت ان التجريع بتركيز 25 و 50 ملغم من MTX / كغم من وزن الحيوانات سبب انخفاضا في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران .

جدول (2): معدل معامل الانقسام الخيطي (MI) لخلايا نقي عظم الفئران المتباينة التجريع بالميثوتركسيت والكاتيكينات والكاتيكول بمدد تجريع من 2-6 اسابيع

مجاميع التراكيز / الحيوانات المعاملة	معامل الانقسام (MI) بعد مدد التجريع (اسبوع) Mean ± SD			قيم P الاحصائية (تأثير الوقت)
	2	4	6	
السيطرة السالبة	4.33±0.07	4.2±0.18	4.42±0.12	0.4^{NS}
السيطرة الموجبة (MTX) 50 ملغم/كغم	2.5±0.21	1.69±0.18	1.41±0.11	0.18^{NS}
الكاتيكينات (0.05%)	4.47±0.7	5.36±0.21	5.73±0.06	0.05
الكاتيكول 156 ملغم/كغم	3.16±0.13	2.17±0.03	2.36±0.47	0.18^{NS}
الكاتيكول 234 ملغم/كغم	3.94±0.06	3.99±0.29	3.1±0.19	0.18^{NS}
الكاتيكينات+الكاتيكول 156 ملغم/كغم	2.86±0.11	2.75±0.21	1.59±0.04	0.08^{NS}
الكاتيكينات+الكاتيكول 234 ملغم/كغم	3.01±0.26	2.28±0.26	1.45±0.28	0.05

NS : قيم غير معنوية



الشكل (2): صورة تظهر الطور الإستوائي لإنقسام خلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالكاتيكول

قد تعود الزيادة في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران المعاملة بمستخلص الكاتيكينات الى احتواء هذه المركبات لمضادات الاكسدة التي تمثل الفعل الاساس للكاتيكينات ، وبكونها من اقوى مضادات الاكسدة قياساً بفيتامين C وفيتامين E [24] لاحتواءها على EGCG التي تمكن من حث انقسام وتضاعف الخلايا دون ان يكون لها تأثيرات مطفرة . في حين يعزى الانخفاض في معامل الانقسام الخيطي في خلايا نقي عظم الحيوانات المجرعة بالكاتيكول بتركيزي 156 و 234 ملغم / كغم بتقدم مدد التجريع الى التأثير السمي للكاتيكول في العمليات الخلوية عن طريق تآثره مع المحاور الاساس للدنا DNA adducts [7] اذ سجلت تأثيرات سمية لتجريع الفئران فموياً للكاتيكول حيث كان التركيز القاتل لنصف عدد الحيوانات LD_{50} هو 260 ملغم/ كغم [25].

لمستخلص الشاي الاخضر تأثيرات متعددة تتمثل بكونه مضاداً للاكسدة ومضاداً للتطفير فضلا عن فعاليته المضادة للاورام . اذ يرجح ان للكاتيكينات الذي تناولته الحيوانات تأثيرات مضادة للبدء بالتسرطن (Antiinitiative) عن طريق تأثيرها في خفض مستويات الجذور الحرة المتكونة كما تخفض من اكسدة المكونات اللبييدية لغشاء الخلية التي تؤدي بطريقة اخرى الى تلف الدنا ، فضلا عن تأثيراتها في فعاليات الانزيمات ذات العلاقة بتوالد الخلايا وتسرطنها داخل الجسم الحي وتقدم الاورام والمتمثلة بانزيمات DNA & RNA Polymerase ، و Lipoxygenase ، و Cyclooxygenase ، و p450 Cytochrome ، و Glutathione S-transferase ، و Glutathione peroxidase ، و Catalase [26] .

التأثيرات في معامل التحول الارومي (BI) Blast index

تشير النتائج المبينة في الجدول (3) الى قيم معامل التحول الارومي لخلايا نقي عظم حيوانات السيطرة السالبة التي تراوحت بين 25.76-24.98% ، وازداد هذا المعامل غير معنوياً لمجموعة السيطرة الموجبة (MTX) ليكون بين 27.68-35.41 % بتقدم مدد التجريع .

ولم تتاثر كثيراً قيم معامل التحول الارومي (BI) لمجموعة الحيوانات المتناولة للكاتيكينات فقط بتقدم مدد التجريع والتي تراوح بين 31.32-22.18 % باستثناء الارتفاع غير المعنوي في BI بعد اسبوعين من المعاملة قياساً بالسيطرة السالبة ، كما لوحظ ارتفاع واضح في نسب BI لخلايا نقي العظم لمجموعتي الحيوانات المجرعة بتركيزي الكاتيكول 156 و 234 ملغم/كغم في الاسبوعين الاوليين من التجريع تلاها انخفاض تدريجي وغير معنوي بتقدم مدد التجريع والتي تراوح بين 43.85-33.05 % و 43.57-35.5 % على التوالي .وسجلت فروق معنوية (ارتفاع) في معامل التحول الارومي في مجاميع الحيوانات المجرعة بتركيزي الكاتيكول 156 و 234 ملغم/كغم والمتناولة للكاتيكينات والاستمرار في ارتفاع BI حتى الاسبوع الرابع من التجريع تلاه انخفاض في الاسبوع السادس ولكلا التركيزين ليكونا بين 38.57 – 33.6 % و 36.03 – 26.43 % على التوالي بتقدم مدد التجريع والتي كانت جميعا معنوية قياساً مع السيطرة السالبة باستثناء الارتفاع غير المعنوي في BI لخلايا نقي العظم لمجموعتي الحيوانات المجرعة بالكاتيكول بتركيز 156 ملغم/كغم بغياب الكاتيكينات والتركيز 234 ملغم/كغم بوجود الكاتيكينات بعد 6 اسابيع من التجريع .

فضلا عن ما اظهره التحليل الاحصائي فروقاً معنوية ($P<0.05$) في قيم BI لخلايا نقي العظم بين مجاميع معاملات الحيوانات كافة بعد الاسبوع الثاني والرابع من التجريع .

جدول (3): قيم معامل التحول الارومي (BI) لخلايا نقي عظم الفئران في مجاميع الحيوانات المجرعة بالميثوتركسيت (MTX) والكاتيكينات والكاتيكول بمدد تجريع من 2-6 اسابيع

مجاميع التراكيز / الحيوانات المعاملة	معامل التحول الارومي (BI) بعد مدد التجريع (اسبوع) Mean ± SD			قيم P الاحصائية (تأثير الوقت)
	2	4	6	
السيطرة السالبة	25.75±0.2	25.15±0.14	24.98±0.25	0.16^{NS}
السيطرة الموجبة (MTX) 50 ملغم/كغم	27.68±1.3	32.49±1.71	35.41±0.86	0.06^{NS}
الكاتيكينات (0.05%)	31.32±2.34	24.5±0.21	22.18±0.36	0.08^{NS}
الكاتيكول 156 ملغم/كغم	43.85±3.74	37.35±1.65	33.05±0.54	0.06^{NS}
الكاتيكول 234 ملغم/كغم	43.57±0.93	42.38±4.5	35.5±0.96	0.08^{NS}
الكاتيكينات+الكاتيكول 156 ملغم/كغم	38.57±1.79	51.99±3.29	33.6±0.27	0.05
الكاتيكينات+الكاتيكول 234 ملغم/كغم	36.03±0.25	46.5±2.69	26.43±2.51	0.05

NS : قيم غير معنوي

تعود الزيادة المتدرجة في BI لمجموعة حيوانات السيطرة الموجبة التي قد تكون ناشئة عن تأثير MTX في اصلاح الخلايا الطافرة في طور G_2 بسبب تأخر وصولها الى مرحلة الانقسام الخيطي والتي يسبقها التحول الارومي وهذا ما لوحظ عن طريق عدم ظهور فروقا معنوية في BI بين هذه المجموعة ومجموعة السيطرة السالبة اي انها لم تتمكن من التأثير وثبيط تصنيع الدنا ، وربما يرجع الانخفاض في نسب BI لخلايا نقي عظم الفئران المتناولة للكاتيكينات (فقط) بتقدم مدد التجريع الى تأثير تلك المركبات في اليات انزيمية متعددة لها علاقة با لارتباط والتآثر مع بوادىء تصنيع الدنا والرنا ، ولقابلية المركبات الفينولية المتعددة للشاي الاخضر في تفكيك شبكة النبيبات الدقيقة ثم ايقاف عملية الانقسام [27].

اما الزيادة في معامل التحول الارومي لمجموعة الحيوانات المجرعة بالكاتيكول والمتناولة للكاتيكينات فانها ناتجة من احتواء هذا المستخلص (الكاتيكينات) على مركبات تقلل من كسور الدنا المحثة بفعل الكاتيكول اذ تعمل الكاتيكينات على حماية الدنا من التلف ، لتظهر تأثيرات وقائية لحمايته من الضرر[28] . كما تعمل هذه الكاتيكينات وكبقية الفلافونيدات بوصفها مضادات للتطفير يمكنها التآثر مع عمليات اصلاح الدنا وحماية الخلايا الحية من كسور سلسلة الدنا المحثة بفعل الكاتيكول ، لذا فهي تساعد على الاصلاح بشكل يفوق تأثيرها في انبثاق وتوالد الخلايا بتقدم مدد التجريع [29] .

التأثيرات في حث تكون النوى الصغيرة Micronucleus

توضح النتائج المبينة في الجدول (4) تأثيرات المعاملة بالميثوتركسيت والكاتيكينات والكاتيكول في حث تكون النوى الصغيرة ، وقد تراوح تردد النوى الصغيرة في خلايا نقي عظم فئران السيطرة السالبة بين 0.78-0.87% من 2 إلى 6 من بدء التجربة . وازدادت النسب المئوية لتردد Micronucleus (MN) لتصبح مابين 2.18-4.02% لحيوانات السيطرة الموجبة (MTX) ولمدد التجريع الثلاثة التي اظهرت فروقاً معنوية معتمدة على مدد التجريع ، فضلا عن الارتفاع المعنوي في نسب MN لهذه المجموعة قياساً مع السيطرة السالبة و لمدد التجريع الثلاثة .

أدت معاملة الحيوانات بالكاتيكينات (فقط) الى انخفاض غير معنوي (P>0.05) في MN والذي تراوح 0.36-0.63% بتقدم مدد التجريع ، ولم تظهر فروق معنوية في قيم MN لهذه المعاملة قياساً مع السيطرة السالبة ولمدد التجريع الثلاثة .

جدول (4) :النسب المئوية لتردد MN في خلايا نقي عظم الفئران المتباينة التجريع بالميثوتركسيت والكاتيكينات والكاتيكول بمدد التجريع من 6 – 2أسابيع

التراكيز مجاميع الحيوانات المعاملة	تردد تكون النوى الصغيرة (MN) بعد مدد التجريع (اسبوع) Mean ± SD (%)			قيم P الاحصائية (تأثير الوقت)
	2	4	6	
السيطرة السالبة	0.78±0.03	0.8±0.03	0.87±0.02	0.16^{NS}
السيطرة الموجبة (MTX) 50 ملغم/كغم	2.18±0.21	2.85±0.16	4.02±0.12	0.05
الكاتيكينات (0.05%)	0.36±0.04	0.42±0.04	0.63±0.07	0.1^{NS}
الكاتيكول 156 ملغم/كغم	1.77±0.07	1.99±0.04	2.38±0.1	0.1^{NS}
الكاتيكول 234 ملغم/كغم	1.97±0.08	2.21±0.04	2.57±0.08	0.1^{NS}
الكاتيكينات+الكاتيكول 156 ملغم/كغم	1.59±0.06	1.86±0.08	2.09±0.09	0.1^{NS}
الكاتيكينات+الكاتيكول 234 ملغم/كغم	1.9±0.02	2.15±0.06	2.43±0.2	0.1^{NS}

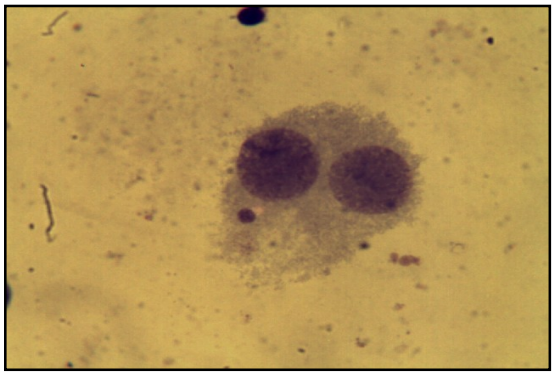
اما نتيجة تجريع الحيوانات بالكاتيكول بتركيزي 156 و 234 ملغم/كغم فقد ادت الى زيادة في تكوين MN بصورة غير معنوية لتتراوح بين 1.77-2.38 % و 1.97-2.57 % على التوالي بتقدم مدد التجريع . في حين سجل ارتفاع معنوي في نسب MN لكلتا المجموعتين قياساً بقيم MN للسيطرة السالبة ولمدد التجريع الثلاثة . وتظهر الصورة المبينة في الشكل (3) تكون النوى الصغيرة MN في خلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالكاتيكول .

ونتج من تناول الحيوانات للكاتيكينات وبشكل مستمر ومصاحب للتجريع بالكاتيكول بتركيز 156 و 234 ملغم/كغم ارتفاع تدريجي وغير معنوي في قيم MN لتكون بين (1.59-2.09% و 1.9-2.43%) على التوالي معتمدة على مدد التجريع جدول(4) . اذ كان هذا الارتفاع معنوياً في نسب MN لكلا تركيزي الكاتيكول بوجود الكاتيكينات قياساً بنسب MN للسيطرة السالبة . فضلا عن ظهور فروقاً معنوية في نسب MN بين المعاملات كافة بعد (2 و 4 و 6) اسبوع .

يرجح ان الزيادة في نسب MN بوساطة الـ MTX متأتية من التلف الحاصل في الدنا ، اذ ياتي اصل النوية الصغيرة (Micronucleus) من اجزاء او قطع كروموسومية (كروماتينات) ناتجة عن تلف السلسلة المزدوجة للدنا لم يتم اندماجها الى نواة الخلية الجديدة قبل انقسام الخلية نتيجة فشل الاجسام المغزلية لتكون حولها غشاء نووي جديد اثناء مرحلة الطور النهائي من الانقسام الخيطي Telophase ، فضلا عن حث تكون MN بفعل الميثوتركسيت نتيجة التلف الكروموسومي او التلف في عدة (Apparatus) الانقسام الخيطي في الارومات المولدة لكريات الدم الحمراء في نقي عظم الفئران [30] .

اما الانخفاض المستحصل في تردد MN لمجموعة الحيوانات المعاملة بالكاتيكينات (فقط) فربما ناتج عن وجود مركبات فعالة ذات تأثيرات وقائية وفعالية عالية مضادة للاكسدة مثل EGCG ذات قابلية في تثبيط نمو الخلايا الورمية وتضاعفها لامتلاكها لتأثيرات مضادة للسرطان ومضادة للتطفير [28] .

وربما يعود الارتفاع في نسب MN للحيوانات المجرعة بالكاتيكول (فقط) بالتراكيز (156 و 234) ملغم/كغم الى التأيض الطبيعي للكاتيكول داخل الجسم الحي بفعل انزيم DT- Dihydrodiol dehydrogenase التي يكون BT (1,2,4-benezotiol) احد مكوناته ، فضلاً عن الهايدروكوينون اذ تكون تلك المتأيضات مواد اساساً للبيروكسيديزات وتكوين المزيد من الكوينونات (quinones) التي ترتبط مع الدنا مؤدية الى حدوث اضرار وتلف فيه نتيجة التأثيرات التازرية لمثل هذه المتايضات التي ينشا عنها تكون MN في الفئران [4] والخلايا اللمفاوية للانسان [5] ، لتتراكم مثل هذه المتأيضات في نقي العظم .



الشكل (3): صورة توضح تكوّن النوى الصغيرة MN في خلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالكاتيكول .

اما الانخفاض البسيط في قيم MN لمجموعة الحيوانات المجرعة بكلا التركيزين من الكاتيكول مع تناول الحيوانات للكاتيكينات فانه قد يرجع الى الفعل المضاد للاكسدة للكاتيكينات وبالتحديد EGCG الذي يعمل على كنس وازالة الجذور الحرة والكوينونات المتكونة والحماية الناتجة من الانزيم المضاد للاكسدة Glutathione S-transferase [31] .

المصادر:

1. Balentine,D.A.(1997). Tea. In:Encyclopedia of chemical technology (eds. Kroschwitz,J.I. and Howe – Grant,M.).(4th ed.) Vol. 23, NewYork, Jhon Wiley and Sons,Inc., PP.:746 – 768.
2. Chung,J.Y.;Hung,C.;Meng,X.;Dong,Z. and Yang,C.S.(1999). Inhibition of activator protein I activity and cell growth by purified green tea and black tea polyphenol in *H-ras* transformed cells: Structure – activity,Relationship and Mechanisms involved. Cancer Res. ,59:4610 – 4617
3. Gupta,S.;Hastak,K.;Ahmed,N.;Lewin,J.S. and Mukhtar,H.(2001). Inhibition of prostate carcinogensis in TRAMP mice by oral infusion of green tea polyphenols. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.,98:10350 – 10355
4. Barale,R.;Marrazzini,A.;Betti,C.;Vangelisti,V.;Loprieno,N. and Barrai,I. (1990). Estimating mean exposures from censored data: exposure to benzene in the Australian petroleum industry. Muta. Res.,244:15 – 20.
5. Robertson,M.;Eastmond,D. and Smith,M.T.(1990). Two Benzene metabolites, catechol and hydroquinone, produce asynergistic respone in cultured human lymphocytes. Mutat. Res. ,249:201 – 209
6. Levay,G. and Bodelly,W.J.(1992). Potential of DNA adduct formation in *HL* – 60 cells by combinations of benzene metabolites. Proc. Natl. Acad. Sci., USA,89:7105-7109
7. Cavalieri, E.L.; Li, K.M.; Balu, N.; Saeed, M.; Devanesan, P.; Higginbotoham, M.; Zhao, J., Gross,M.L. and and Rogan,E.G.(2002). Catechol ortho-quinones: the electrophilic compounds that from depurinating DNA adducts and could initiate cancer and other disase. Carcinogensis,23(6):1071 – 1077.
8. Markham KR (1982). Techniques of Flavonoid Identification. Academic Press. Pp.:15-16.,UK

9. Al-Shahaat, N. A. Z. 1986. Plants and Medicinal Herbs. Dar AI-Behaar, Beirut. pp. 140-146. Cited in: Sa'eed, O. F. (2004). The Effect of Green and Black Tea Extracts on Different Cell Lines *in Vitro*. M. Sc. Thesis, College of Pharmacy, University of Mosul, Mosul, Iraq.
10. Sousek J, Guedon D, Adam T, Bochorakova H, Taborska E, Valka I and Simanek V.(1999).Alkaloids and organic acid content of eight *Fumaria* species. Phytochemical Analysis,10:6-11.
11. Evans, W. C. (1997). Trease and Evans` Pharmacognosy. 4th ed. W. B. Saunders Company. pp. 225-227.
12. Harborne, J. B. (1984). Phytochemical Methods. 2nd ed. Chapman & Hall, London. p. 5.
13. Allen,J.W.;Shuler,C.F.;Mendes,R.W. and Latt, S.A.(1977).A simplified technique for *in vivo* of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxy-uridine tables. Cytogenetics ,18:231 – 237.
14. Shubber, E.K. and B.M.Al-Allak (1986). Spontaneous chromosomal aberration and SCE in human lymphocytes effect of culture conditions. Nucleus, 22:92-98.
15. Schimd,W.(1982). The micronucleus test : an *in vivo* bone marrow method. In: Cytogentic assays of environmental mutagens. (ed. Hsu,T.S.) Allanheld, Osmum, Totowa, PP.:221 – 229.
16. Mukhtar,A. and Ahmed,N.(2000). Tea polyphenols : prevention of cancer and optimizing health. Am. J. Clin. Nutr. 1:16985 – 17025.
17. Lu,Y.-P.;Lou,Y.-R.;Xie,J.-G.;Peng,Q.-Y.;Liao,J.;Yang,C.S.;Huang, M.-T. and Conney,A.H. (2002). Topical application of caffeine or (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) inhibit carcinogenesis and selectively increase apoptosis in UVB-induced skin tumors in mice. Pharmacology, 99(19):12455-12460.
18. Lee,S.H.(2004). Re – introducing tea to the west, this time to fight cancer Society for Integrative oncology (1st) International conference,24 December:1 – 19 ,Medical paradigm,NewYork.
19. Zhao,W. and Chen,J.(2001). Candidate foods in the Asia – Pacific Region for cardiovascular protection: oriental tea. Asia Pacific. J. Clin. Nutr.,10(2):138 – 142
20. Sa'eed,O.F.(2004). The effect of green and black tea extracts on different cell lines *invitro* .A thesis of MSc.,College of Pharmacology, University of Mosul, Iraq.
21. Manach,C. ;Scalbert,A.; Morand,C.; Remesy,C. and JimenezmL.(2004). Polyphenols: Food sources and bioaviability. Amer. J. Clin. Nutr., 79(5):727–747.
22. Turner,R.R.;Wakely,G.K.;Hannon,K.S. and Bell,N.H.(1988). Tamoxifen inhibits osteoclast mediated resorption of trabecular bone in ovarian hormone deficient rats. Endocrinology, 122:1160 – 1164.
23. Al-Neimy,E.H.M.(2006). Biological effects on *Capparis spoinosa* and *Rumex acetasella* extract on animal and human normal tumor cells. Ph.D. Thesis, College of Science, Al-NAhrain University. Baghdad, Iraq.

24. Mitscher,L.(1997). Strongest of all antioxidants found in green tea. Japanese Journal of Clinical Oncology, 86:423-431.
25. NIOSH: National Institute for Occupational safety and healthy (2000). Registy of toxic effects of chemical substance. Education and Welfare, Reports and memoranda. Dept. of health, U.S. .
26. Yamane, T.; Nakatani, H.; Matsumoto, H.; Iwata,Y. and Takahashi, T.(1997). Inhibitory effects and toxicity of green tea components for the prevention of gastrointestinal carcinogensis. In : Ohigashi H, Osawa T, Terao J, Watanabe S, Yoshikawa T (Eds.). Food factors for cancer prevention. Springer –Verlag Tokyo, pp: 118-121.
27. Li, M.; Ciu, J.R.; Ye,Y.; Zhang, L.H.; Wang, K.; Gares, G.; Crose ,J.; Wright, M.and Tack, J.L (2002). Antitumor activity of z-ajoene, a natural compound purified from Garlic: antimitotic and microtubule - interaction properties. *Carcinogenesis*, 23:573-579
28. Sahelian,R.M.(2004). The modulating effects of quercetin and rutin on the mytomycin C induced DNA damage. Toxicol. Lett.,151:143 – 149.
29. Cerd?-Zolezzi, P. ; Fern?ndez, T. ; Aulicino, P. ; Cavaliere, V. ; Greczanik, S. ; Caldas-Lopes, E. ; Wagner, M. ; Ricco, R. ; Gurni, A. ; Hajos, S. and Alvarez, E.(2005). *Ligaria cuneifolia* flavonoid fractions modulate cell growth of normal lymphocytes and tumor cells as well as multidrug resistant cells. *Immunobiology*, 209: 737-49.
30. Armstrong,M.J. and Galloway,S.M. (1994). Micronuclei induced in peripheral blood of mu-pIM-1 transgenic mice by chronic oral treatment with 2-Acetylaminofluorene or benzene but not with diethylnitrosamine or 1,2-dichloroethane. Mutat. Res.,302:61 – 70.
31. Katiyar,S.K.,Afaq,F.;Azizuddin,K. and Mukhtar,H.(2001a). Inhibition of UV B-induced oxidative stress – mediated phosphrylation of mitogen – activated protein kinase signaling pathways in cultured human epidermal keratinocytes by green tea polyphenol (-)- epigallocatechin – 3 – gallate . Taxicol. Appl. Pharmacol.,176:110 – 117..