التأثيرات الوراثية الخلوية للمستخلص الميثانولي المائي لجذور عرق السوس

منى نجاح ألطريحي
جامعة الكوفة /كلية العلوم

علي حمود السعدي
جامعة بابل | كلية العلوم

الخلاصة

درست التاثيرات الوراثية الخلوية للمستخلص الميثانولي المائي لجذور عرق السوس داخل الجسم الحي باستخدام ذكور الجرذان البيضاء . استخدمت ثلاث جرع من المستخلص لفترات زمنية مختلفة (١٠٠٠ ، ٥٠٠ ، ٢٥٠ ملغم\كغم) لمدة (٧ ، ١٥ ، ٣٥ يوم) على التوالي ، استخدمت الاختبارات الوراثية الخلوية كالتشوهات الكروموسومية ومعامل الانقسام والتشوهات في رؤوس النطف ، وتم الكشف عن المركبات الفعالة في المستخلص بطرق كيميائية مختلفة ووصف باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة . بينت النتائج ان المستخلص يحتوي على مركبات كيميائية مختلفة ويتكون من مركبات مختلفة القطبية ، ولم يكن للمستخلص أي تاثيرات وراثية او تطفيرية اذ لم يسبب زيادة في التشوهات الكروموسومية و تشوهات رؤوس النطف ولم يؤثر في معدل انقسام خلايا نقي العظم معنويا .

مفاتيح الكلمات : تاثيرات وراثية خلوية ، كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة ، تشوهات كروموسومية ، معامل الانقسام .

Abstract

The studying aims to investigate the cytogenetic effect of methanolic- water extract in vivo using white albino rats . using three doses for different time (250 , 500 , 1000 mg\kg) for (35 , 15 , 5 days) respectively . the cytogenetic assays use in this studying include chromosome aberration , mitotic index and sperm head abnormality , the plant extract phytochemicals was detect by different chemical reagents and characterization by thin layer chromatography . the results show that extract contains of different compounds and different polar , that extract don't cusses increased in chromosome aberration and changes in sperm head and don't affect on bone marrow proliferation .

KEY WORDS: cytogenetic effect , thin layer chromatography , chromosome aberration , mitotic index.

المقدمة INTRODUCTION

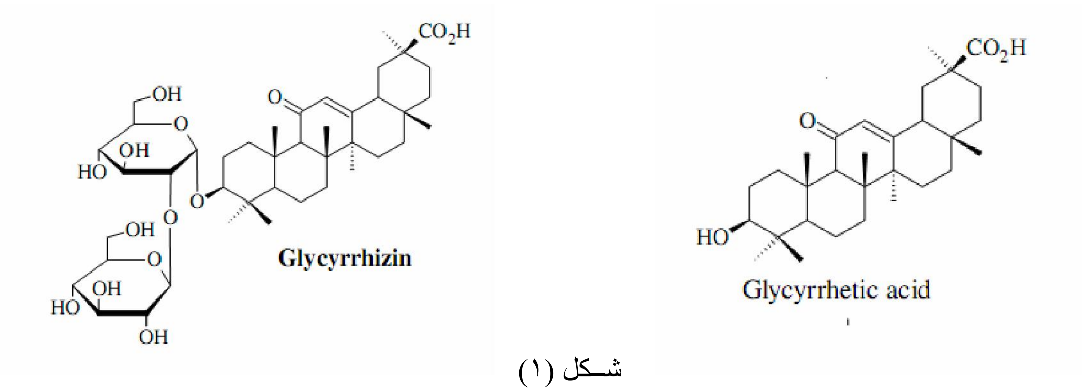
يعد نبات عرق السوس (*(Glycyrrihza glabra* Gly من النباتات التي لها تاريخ طويل في استخداماتها الطبية والعلاجية والتي تعود إلى الحضارة البابلية والمصرية (**Fenwike *et al*., 1990**) ويعود اسم Glycyrrihza إلى الحضارة الاغريقية ويتكون من جزئين هما glykos بمعنى حلو و rhiza بمعنى جذور ثم تغير الاسم الى liquritia ثم إلى licorice((**Schulz *et al* .,1980**) . ينتمي جنس *Glycyrrihza* الى العائلة البقولية Ligumenacea ويضم ١٤ نوع (**Grieve, 1995**) وصنف النبات الى عدة اصناف حسب المناطق والاقاليم التي ينمو فيها الى :

١ . *Gly glabra var vcolacea* يتواجد في العراق وايران .
2 . *Gly glabra L-var glandulitera* يتواجد في روسيا .
3 . *Gly glabra Var typica* يتواجد في امريكا .
4 . *Gly glabra* C *var lepidola* يتواجد في اوربا .

ينتمي الجنس المستخدم في الدراسة الحالية الى الصنف الاول (**Isbrucker** and Burdock, 2006) اذ تعد الجذور الجزء الاهم في النبات لاحتوائها على المواد الفعالة المهمة علاجيا (**Hayashia *et al* .,1993**) ويعزى اللون الاصفر للجذور الى وجود مركبات الفلافونويد (Flavonoid) بصورة اساسية والتي تشمل , liquiritin (isoliquritin , achalcone) و مكونات اخرى (**Yamamura** *et al*., 1993) .

يحتوي النبات على العديد من المركبات الكيميائية النباتية الفعالة ومن اهمها مادة glycyrrhiza التي تعد المكون الاساسي للجذور وهي مادة حلوة المذاق وعند تحللها مائيا تفقد طعمها الحلو وتعطي الجزء اللاسكري الذي يتكون من جزيئة واحدة من حامض (CA) Glycyrrhetinic acid وجزيئتين من حامض Glucuronic acid (**Evans** and) Oriordan, 1975.

يعد حامض GA الجزء المهم علاجيا ويتواجد بشكلين stereoisomerism 18 α و – 18 β stereoisomerism (**Wang** *et al*., 2000) او على شكل املاح البوتاسيوم والكالسيوم وتركيبه الكيميائي $C_{24}H_{62}O_{16}$ (**Newall *et al*., 1996**) (شكل 1)



شكل (١)

. التركيب الكيميائي لبعض مركبات عرق السوس .

لذا فقد هدفت الدراسة الحالية الى توصيف المستخلص الميثانولي المائي لجذور عرق السوس ودراسة تأثيراته الوراثية الخلوية في ذكور الجرذان البيضاء .

المواد و طرائق العمل MATERIALS AND METHODES

تحضير المستخلص النباتي : حضر المستخلص الميثانولي المائي للنبات حسب ماورد في (**Sato *et al* ., 1990**) وتم توصيف المستخلص باستخدام تقنية TLC حسب (**Meena *et al*., 2010**) وتم الكشف عن المركبات الكيميائية فيه .

الاختبارات الوراثية الخلوية : اجري اختبار الاختلالات الكروموسومية chromosome aberration test واختبار معامل الانقسام mitotic index test وحضرت الهيئة الكروموسومية حسب(**Tolliver** and Robbins, 1991)

تصميم التجارب: استخدمت ذكور الجرذان البيضاء *Rattus rattus* بمعدل وزن ٥٠ ±٣٠٠ غم وعمر ١٢ اسبوع وقسمت المجاميع كما يلي :

١ – السيطرة السالبة جرعت بالماء المقطر

٢ – المعاملة الاولى جرعت الحيوانات بالجرعة ١٠٠٠ ملغم \كغم لمدة اسبوع

٣ – المعاملة الثانية جرعت الحيوانات بالجرعة ٥٠٠ ملغم\كغم لمدة اسبوعين

٤ – المعاملة الثالثة جرعت الحيوانات بالجرعة ٢٥٠ ملغم\كغم لمدة ٥ اسابيع .

٥ – السيطرة الموجبة استخدمت جرعة تطفيرية مفردة لعقار السايكلوفوسفومايد ٢٠ ملغم\كغم لغرض المقارنة عند التحليل الاحصائي .

قتلت الحيوانات بعد انتهاء مدة التجريع واجريت الاختبارات الوراثية الخلوية .

التحليل الاحصائي : تم تحليل النتائج بأستخدام برنامج SPSS بطريقة تحليل التباين احادي الاتجاه one way ANOVA على مستوى معنوية ($P < 0.05$) ، كذلك تم حساب المعدل والخطأ القياسي

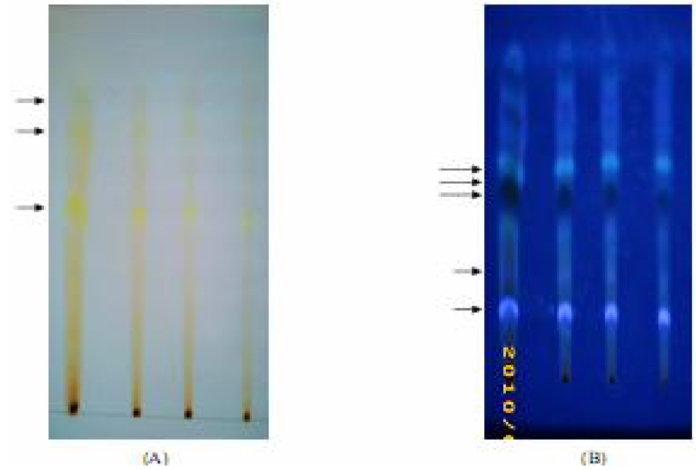
النتائج والمناقشة RESULTS AND DISSCUTION

١ . المستخلص النباتي

يبين الجدول (١) ان المستخلص يتكون من العديد من المركبات الكيميائية الفعالة وهي (القلويدات والكلايكوسيدات والصابونيات والفينولات والفلافونات والكومارين والراتنجات وزيوت طيارة وتربينات) . ويبين الشكل (١) وجدول (٢) ان المستخلص يتكون من عدد من المركبات المختلفة القطبية عند الفحص بالضوء الاعتيادي والاشعة فوق البنفسجية تراوحت قيم عامل الاعاقة لها بين ٠.٢١ – ٠.٥٣ مع اشتراك حزمتين بين طريقتي الفحص . ان هذه النتائج جاءت متوافقة لما اثبته (**Meena *et al* ., 2010**) عند دراسة جذور عرق السوس الذي بين انه يتكون من مركبات مختلفة.

جدول (١) المركبات الكيميائية الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي لعرق السوس

المادة	الاختبار المستخدم	نتيجة اختبار المستخلص
القلويدات	كاشف ماير	+
	كاشف واكنر	+
الكلايكوسيدات	كاشف بندكت	+
التانينات	خلات الرصاص	+
الصابونيات	كلوريد الزئبقيك	+
	طريقة الرج	+
الفينولات	كاشف كلوريد الحديديك	+
الفلافونات	ايثانول + KOH	+
الكومارين	UV + NaOH	+
الراتنجات	ايثانول + ماء محمض بـ٤%HCL	+
زيوت طيارة	UV	+
التربينات	كلوروفورم Acetic acid H_2SO_4	+
الستيرويدات	كلوروفورم Acetic acid H_2SO_4	–



شكل (١) . ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لنبات عرق السوس بكروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام المذيب (كلوروفورم : خلات الاثيل) (٨٠ : ٢٠ V\V) ، تشير الاسهم الى مواقع الحزم .

جدول (٢) . توصيف الحزم الناتجة من ترحيل المستخلص على كروماتوكرافيا الطبقة الرقيقة باستخدام المذيب (كلوروفورم : خلات الاثيل) .

طريقة الفحص	خصائص الحزم		عدد الحزم
	اللون	قيمة R_f	
الفحص بالضوء المرئي	برتقالي	0.21	٣
	اصفر	0.53*	
	بني فاتح	0.71	
الفحص بالأشعة فوق البنفسجية	بنفسجي	0.34	٤
	بني	0. 37	
	اصفر فاتح	0.51	
	اخضر	0.53*	

٢ ـ التشوهات الكروموسومية

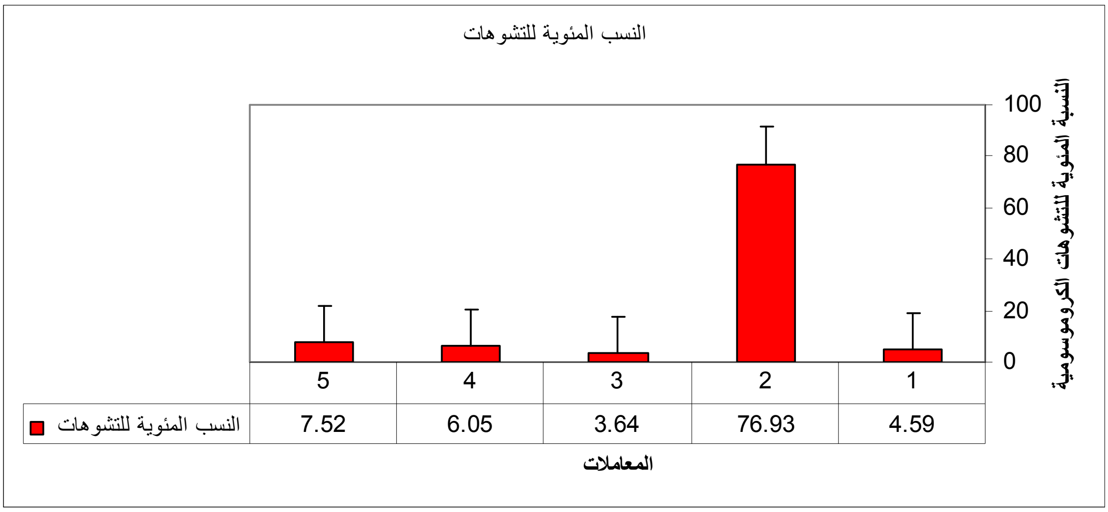
يبين الجدول (٣) انواع التشوهات الكروموسومية التي تم التحري عنها في خلايا نقي العظم للجرذان المستخدمة في الدراسة اذ وجد ان هناك نسبة منخفضة من التشوهات وهي كسر كروماتيدي وكسر كروموسومي وقلة مجموعة كروموسومية وفرط مجموعة كروموسومية اضافة الى الكروموسوم الحلقي ، لم تؤدي المعاملة بالجرع المستخدمة بالدراسة الى ارتفاع نسب جميع التشوهات بل ادت الى خفض التشوهات التلقائية التي لوحظت في السيطرة السالبة للجرعة ١٠٠٠ ملغم\كغم كما مبين بالشكلين (٢) و (٤) . توافقت هذه النتيجة مع ماتوصل إليه **(Zani *et al*., 1993; Martinez et) al ., 1999** بأن مستخلص نبات عرق السوس لم يسبب أي تأثير مطفر في اختبار ايمز Ames، كما أثبتت الدراسات إن الجرعة نصف القاتلة LD_{50} للنبات كانت عالية نسبيا فبلغت 18.0 g\ kg لذكور الجرذان و 14.2 g \ kg لإناث الجرذان عن طريق الفم (**Isbrucker** and Burdock, 2006) .

جدول (٣) . انواع التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي العظم للجرذان المعاملة بالمستخلص النباتي .

المعاملة (mg \ kg)	كسر كروماتيدي	كسر كروموسومي	قلة مجموعة كروموسومية	فرط مجموعة كروموسومية	كروموسومات حلقية
N C	*17.00±1.00	*9.33±1.33	*8.00±2.30	4.00±2.30	6.66±3.52
Cp 20	146.66 ±24.6	25.33±6.66	* 425.33±144.1	2.66±2.6	50.66±15.02
Gly 250	*16.00±2.30	*4.00±0.00	*16.66±4.9	*0	*10.00±1.154
Gly 500	*10.66±1.33	*4.00±0.00	*14.66±1.33	*2.66±1.33	*4.00±2.30
Gly 1000	*10.66±1.33	*5.33±1.45	*8.00±1.73	*2.60±0.88	*1.33±1.33

* الفرق معنوي بمستوى ٠.٠٥
M ± SE المعدل ± الخطا القياسي

شكل (٢) .النسبة المئوية لمجموع التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي العظم للجرذان المعاملة بالمستخلص .



١ السيطرة السالبة
٢ السيطرة الموجبة
٣ المعاملة بالجرعة ١٠٠٠ ملغم \كغم
٤ المعاملة بالجرعة ٥٠٠ ملغم\كغم
٥ المعاملة بالجرعة ٢٥٠ ملغم\كغم

٣ – تشوهات رؤوس النطف **sperm head abnormality**

يبين الجدول (٤) انواع التشوهات في رؤوس النطف للجرذان المستخدمة بالدراسة الحالية اذ لم تسبب المعاملة بالجرع المستخدمة بالدراسة ارتفاع نسبة التشوهات في رؤوس النطف لكل الانواع التي تم التحري عنها بالدراسة بل كانت النسب مقاربة للنسب الطبيعية المتحصل عليها من السيطرة السالبة في جميع مراحل تكون النطف spermatogenesis ، الجرعة ٢٥٠ ملغم \كغم لمرحلة Spermatogonia ولمرحلة Spermatocyte الجرعة ٥٠٠ كغم\ملغم وللمرحلة الاخيرة من تكوين النطف لم تسبب الجرعة ١٠٠٠ ملغم\كغم ، كما مبين في الشكلين (٣) و (٥) . لقد تطابقت نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسات سابقة اذ أوضحت الاختبارات الخلوية خارج وداخل الوسط الحي ان المركبات المشتقة من عرق السوس لم تظهر أي تأثيرات تراكمية أو مسرطنة حتى لو استخدمت لفترات طويلة (**Kobuke *et al*., 1985**) . ولم يسبب حامض glycyrrhetic acid أي تأثيرات وراثية لخلايا نقي العظم للفئران والجرذان كما لم يؤد الى تأثيرات ضارة في الأجنة (**Mantovani *et al*., 1988**). كما لم تؤدي المعالجة بمركبات GR (glycyrrhizin) أو GA الى ترسبات في الانسجة او تغيرات نسجية مرضية **Ishida *et al*., 1989**) .

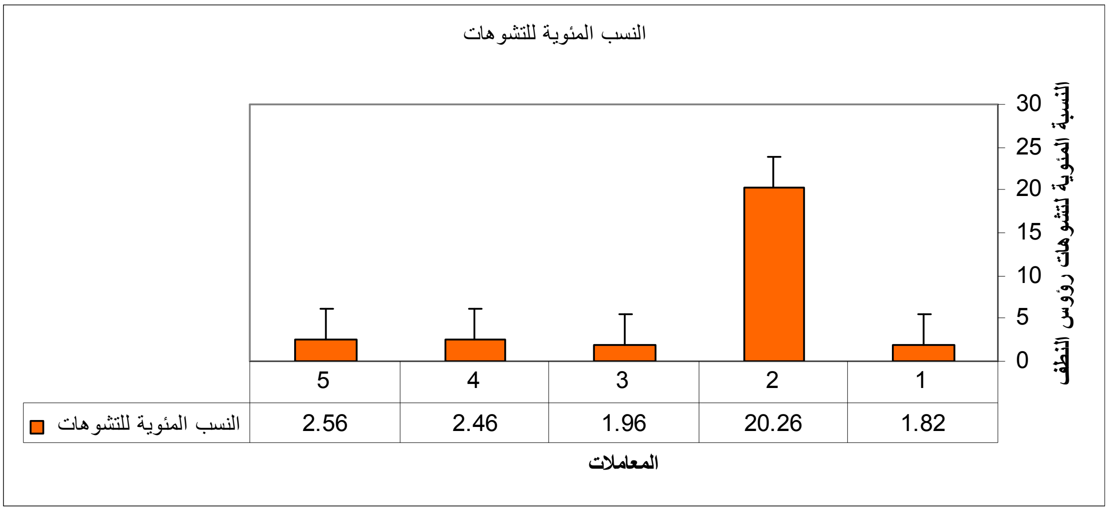
جدول (٢) . انواع التشوهات في رؤوس النطف للجرذان المعاملة بالمستخلص النباتي

المعاملة mg \ kg	فاقدة للراس	مفصصة الراس	كروية الراس	معقوفة الراس
N C	* 14.66 ± 2.18	* 2.66 ± 1.33	* 1.00 ± 0.57	* 0
CP 20	138.33±44.75	47.00 ± 35.59	11.33 ± 6.35	6.00 ± 1.15
Gly 250	* 15.00 ± 2.00	* 7.00 ± 1.73	2.66 ± 1.45	* 1.00 ± 1.00
Gly 500	* 14.33 ± 1.33	* 6.33 ± 3.48	3.00 ± 1.52	* 1.00 ± 0.00
Gly 1000	* 13.00 ± 2.08	* 6.00 ± 1.15	* 0.66 ± 0.33	* 0

* الفرق معنوي بمستوى ٠.٠٥

M ± SE المعدل ± الخطا القياسي

شكل (٣) .النسبة المئوية لمجموع التشوهات في رؤوس النطف للجرذان المعاملة بالمستخلص النباتي



١ السيطرة السالبة

٢ السيطرة الموجبة

٣ المعاملة بالجرعة ١٠٠٠ ملغم\كغم

٤ المعاملة بالجرعة ٥٠٠ ملغم\كغم

٥ المعاملة بالجرعة ٢٥٠ ملغم\كغم

٤ – معامل الانقسام MITOTIC INDEX

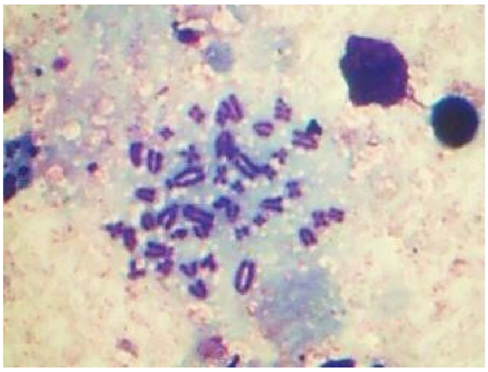
يبين الجدول (٤) نسبة معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للجرذان المعاملة بجرع مختلفة من المستخلص النباتي اذ لم يسبب المستخلص انخفاض كبير في نسبة معامل الانقسام ولم يكن الفرق معنويا بين المعاملات والسيطرة

السالبة، ان النتائج الحالية تؤكد بان المستخلص النباتي غير سام اومؤثر وراثيا . ان احتواء المستخلص النباتي على بعض المركبات منها الكيومارين coumarine والصابونيات saponins والتربينات terpenoid والكلايكوسيدات glycoside والايزوفلافونات isoflavonide التي أثبتت فعاليتها العلاجية وليس السمية (**Beresford , 1999**) . إذ يمتلك المركب licochalcon وهو من المركبات الفلافونويدية الاستروجينة المشتقة من نبات عرق السوس دور في السيطرة على نمو وانقسام الخلايا (**Hsieh *et al*., 2004**) ، كما إن لوجود بعض المواد المحفزة لانقسام الخلايا مثل المايتوجين (mitogen) دور في زيادة انقسام الخلايا اذ بينت دراسة ارتفاع معامل الانقسام للخلايا اللمفاوية المعاملة بمستخلص نبات *Derris scandeus* الذي ينتمي للعائلة البقولية والغني بمادة المايتوجين (**Hsieh *et al*., 2007**)،كما إن بعض المركبات الكيميائية النباتية تعمل على تحفيز انزيم MAPK (Activated - Mitogen Protein Kinase)الذي يسيطر على انقسام الخلايا ونموها (**Kensler, 1997**) .

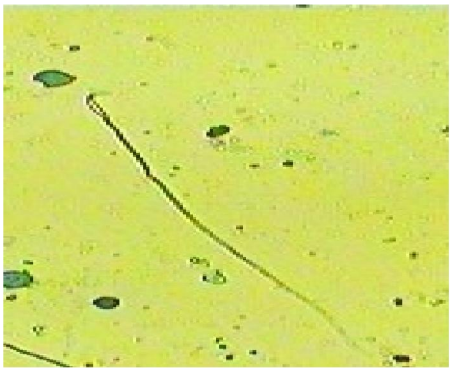
جدول (٤) . معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للجرذان المعاملة

المعاملة mg\ kg	M ± SE
N C	* 5.16 ± 0.42
Cp 20	1.40±0.49
Gly 1000	* 5.76 ± 0.23
Gly 500	* 4.43± 1.00
Gly 250	3.00± 0.80

* الفرق معنوي بمستوى ٠.٠٥
M ± SE المعدل ± الخطا القياسي



شكل (٤) .الهيئة الكروموسومية الطبيعية
لخلايا نقي العظم للجرذان البيض
(قوة التكبير X٢٠٠٠)



شكل (٥). شكل النطفة الطبيعي للجرذان
البيض . (قوة التكبير X٨٠٠)

References

Fenwike, G. R. ; Lotuomski, J. and Nieman, C. (1990). Liquorice , Glycyrrihza *glabra* L-Composition uses and analysis. Food Chemistry 38, 199-143.

Schulz, V. ; Hansel, R. ; Tyler, V. E. (1998) . Rational Phytotherapy. A Physicians Guid to herbal Medicine. Springer- Veralg , Germany,160-187.

Grieve, M. (1995). Liquoria. Botanical.com, 9.

Isbrucker, R. and Burdock, G.(2006) . Risk and safety assessment on the consumption of licorice root (*Glycyrrhiza* sp.) its extract and powder as a food ingredient, with emphasis on the pharmacology and toxicology of glycyrrhizin. Regulatory toxi. and pharma. 46,167-192

Hayashia, H.; Fukui, H. and Tabata, M. (1993). Distribution pattern of saponisin in different organs of *Glycyrrhiza glabra*. Planta, Med. 59, 351-353.

Yamamura, Y. ; Kawakami, J.and Sanata, T. ; (1992) . Pharmacokinetic profile of glycerrhizin in healthy volunteers by a new high- performance liquid chromatographic method . J Pharm. Sci. 81,1042-1046 .

Evans, H. J. and Oriordan, M. L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagen test .J. Mut .Res .31,135 – 148.

Wang, Z. Y. ; Athar, M. and Bickers, D. R.(2000) . Licorice in foods and herbal drug Chemistry,pharmacology , toxicology and uses. Inmazza G. Oomah B.D. (Eds) Herbs ,Botanicals &Teas. Technomic Publishing Co. Inc,Lancaster, PA. 321-353.

Newall, C.A.; Anderson, L.A. and Phillipson, J.D. (Editors)(1996). Herbal Medicines The Pharmaceutical Press, London. 183- 186.

Sato, T. ; Onse, Y. ; Nagase, H. and Kito, H. (1990). Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against (benzo (a) yrene) in the *Samonella* assay .J. Mut. Res . 241,283-290

Meena, A. k. ; arjun, S. ; Kiran, S. ; Suman, K. and Rao, M. M. (2010). Physicochemical and preliminary Phytochemical studies on the rhizomes of *Glycyrrihza glabra* Lin. Inter. J. of pharm. and pharmaco. Sci. 2,1497-1491.

Tolliver, D. and Robbins, L. (1991). Techniques in karyology: the bone marrow extraction method. Association for Bio. Lab. Education,12,69-73.

Zani, F. ; Cuzzoni, M.T. ; Daglia, M. ; Benvanuti, S. and Vampa, G. Mazza, (1993). Inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium* by *Glycyrrihza glabra* extract ,glycyrrhizinic acid 18α – and 18β glycyrrhetinic acid . plant Medica. 59,502-507.

Martinez, A. ; Ikken, Y. ; Cambero, M. I. ; Marin, M. L. ; Haza, A.L. ; Casas, C. ; Morales, P. (1999). Mutagenecity and cytotoxity of fruits and vegetables evaluated by the Ames test and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay . Food sci. and techn. 5, 431-437.

Kobuke, T. ; Inai, K. ; Nambu, S. ; Ohe, K. ; Takemoto, T.; Matsuki, K. ; Nishina, H. ; Huang, I. B. and Tokuoka, S. (1985) . Tumorigenicity study of disodium glycyrrhizinate administered orally to mice. Food and chem. Toxi. 23,979-983.

Mantovani, A. ; Ricciardi, C. ; Stazi, A. V. ; Macri, C. ; Piccioni, A. ; Badellino, E. ; De Vincenzi, M. ; Caiola, S. and Patriarca M. (1988) Teratogenicity study of ammonium glycyrrhizinate the Sprague- dawley rat .Food Chem. Toxicol 26,435-440

Ishida S. , Skiya, Y. ; Ichikawa, T. ; Kinoshita, M. and Awazu, S. (1989) Binding of glycyrrhizin to human serum and human serum albumin. Chem. and Pharm. Bulletin, 37,226-228.

Beresford, T. (1999). *Glycyrrhiza glabra* and treatment of respiratory disorders. Theaus.net@hotmail.Com

Hsieh, F. Y. **;** Guo J. ; Kanicki J. ; Lee MY. ; Darzynkiewicz, Z. and Wu, J. M. (2004). Licochalcone / A anovel flavonoid isolated From licorice root (*Glycyrrihza glabra*) causes G2 and late/ G1 Arrest in androgen/independent PC/3 prostat cancer cell. Biochem. Biophys. Res. 10, 263-270 .

Aurasorn, S. ; Kornkanok, I. and pattana, S. .(2007) . Immunomodulating Activity of Thai Rejuvenatin Plant . Naresuan Uni. J. 15, 149-157.

Kensler, T. (1997). Environ Health Prespect. 105,965.