The Study of some Plant Extracts Effect on Free Radicals Removal from DNA in Vetro

Dr.Azhar M. Haleem
Environmental Research center/ University of Technology/Baghdad
Dr.Esmaeel K. Shubber
Ministry of science and technology/Baghdad
Dr.Abdul Wahid B. Al-Shaibani
University of Nahrain/Baghdad
Email:amhjanabi@yahoo.com

Received on: 23 /9 /2012 & Accepted on: 4/4/2013

ABSTRACT

The removal efficiency of Several plant extracts of Nagilla sativa linn, Allium sativum sativum and Allium sativum ophioscordon of free radicals from pure DNA molecule at concentration 5 µgm / ml have been studied when we added 1×10^{-5} M of H2O2 with plant extracts mixture by measuring absorbency at 260 nanometer . Breaking index for nitrogen base pair was calculated. The plant extracts showed high ability in free radicals scavenge when used in concentrations (0.1, 1, 10, 100) µgm / ml which effect in DNA molecule. Also the DNase activity from different plant extracts was measured in DNase agar. Alcoholic mixture activity of three plants in (1،10،100) µgm/ml concentration was studied by monitoring the protection effect on pBR322 plasmid DNA from *Escherichia coli which* was protect t pBR322 plasmid he plasmid DNA from breaking by H2O2.

Keyword: Free Radicals, DNA, Plant Extracts, Medical Plants, Pbr322 Plasmid

دراسة قابلية بعض المستخلصات النباتية في ازاحة الجذور الحرة من جزيئة DNA خارج الجسم الحي

الخلاصة

باستخدام مجموعة من المستخلصات (مائي، كحولي، زيتي، خليط مائي، خليط كحولي، الكلويدي، فلافينويدي) لبذور نبات حبة البركة Nagilla sativa linn وثمار نباتي الثوم Allium sativum sativum والصرماق Allium sativum ophioscordon درست قابلية هذه المستخلصات في ازاحة الجذور الحرة من جزيئة DNA عند اضافة تركيز مقداره 1×10^{-5} مولار من بيروكسيد الهيدروجين لخليط متكون من المستخلص النباتي ومحلول الدنا المستخلص من الغدة الصعترية للعجل بتركيز نهائي (5) مكغم / مل وذلك بقياس الامتصاصية عند طول موجي 260 نانوميتر وحساب معامل التجزء QB لازواج القواعد النتروجينية، حيث ثبتت قدرة هذه المستخلصات في ازاحة الجذور الحرة والتي تؤثر سلبا على جزيئة الدنا وثبوتيتها عند استخدام هذه المستخلصات بتركيز (100،10،1،0.1) مكغم/مل . كما ودرست فعالية هذه المستخلصات في تحليل جزيئة الدنا من خلال اضافتها الى حفر عملت مسبقا في اكار الدنييز DNase agar ، كما درست قابلية مزيج من المستخلصات الكحولية في تراكيز مختلفة (100،10،1) مكغم/مل في ازاحة الجذور الحرة المتحررة من التحلل الضوئي photolysis لمركب بيروكسيد الهيدروجين من خلال الحماية التي اضفاها

المزيج على بلازميد (pBR322) الذي يمنع تحوله من الشكل الحلقي المفتوح الى الشكل الخطي وفي جميع تراكيز المزيج.

كلمات مفتاحية: جذور حرة، مستخلصات نباتية، نباتات طبية، بلازميد pBR322.

مقدمة

يطلق مصطلح الجذور الحرة على كل جذور الاوكسجين (الهيدروكسيل، البيروكسيل،الالوكسيل، السوبر اوكسيد)وانواع النتروجين الفعال NO_2,NO [1] واصبح معروف تماما دورها في نشوء وتطور السرطان من خلال مجموعة من الاليات منها.

احداث ضرر وتغيير في المادة الوراثية يتضمن حصول طفرة ثنائية القاعدة او حذف او حشر اذ ان لهذه المواد قدرة في احداث ضرر كروموسومي كبير بسبب فقدان او تطفير احدى اليلات الطور البري للجين Tumor suppressor gen و proto-oncogene [2] .

التداخل في نقل الاشارة بين السايتوبلازم والنواة على سبيل المثال ان المركب H_2O_2 له القابلية على العبور خلال الاغشية الخلوية والعضيات بسهولة فيسبب ازاحة للعوامل المثبطة للاستنساخ في السايتوبلازم والنواة ويسمح بهجرة العوامل المحفزة للاستنساخ من السايتوبلازم للنواة [3] .

احداث تحوير في فعالية البروتينات والجينات المسؤولة عن الجينات المنظمة لعملية التكاثر والتمايز والمواد المبرمج [4] ، اذ ان المركب H2O2 له القدرة في تفعيل عملية استنساخ الجين C-jun [5].

المواد وطرائق العمل

التحري عن نشاط انزيم DNase في لمستخلصات النباتية

اتبعت الطريقة الواردة في [6] للتحري عن نشاط انزيم **DNase** في المستخلصات النباتية مع بعض التحوير كون ان هذا الفحص مخصص للتحري عن انتاج هذا الانزيم في البكتريا [7]. تتلخص الطريقة بعمل حفر في اطباق حاوية على وسط اكار ال DNase المجهز بصبغة التولودين الزرقاء بتركيز (0.1)% كان قطر هذه الحفر (6) ملم ، بعدها وضعت المستخلصات المختلفة (مائي، كحولي، زيتي، خليط مائي، خليط كحولي، الكلويدي، فلافينويدي) لبذور نبات حبة البركة *Nagilla sativa lin*n وثمار نباتي الثوم *Allium sativum sativum* والصرماق Allium *sativum ophioscordon* بحجم (100) مايكروليتر في كل حفرة ، تركت الاطباق في الحاضنة بدرجة (37) م° لمدة (2 ، 4، 6، 24) ساعة حيث ان ظهور هالة وردية او شفافة حول الحفرة دليل ايجابية الفحص .

التحري عن فعالية المستخلصات النباتية المختلفة على جزيئة DNA خارج الجسم الحي

تم معاملة محلول ال DNA المحضركما في [7] و الذي يمتلك نسبة امتصاصية A260 / A280 تعادل (1.87) بخمسة تراكيز من المستخلصات (مائي، كحولي، زيتي، خليط مائي، خليط كحولي، الكلويدي، فلافينويدي) لبذور نبات حبة البركة *Nagilla sativa lin*n وثمار نباتي الثوم*Allium sativum sativum* والصرماق*Allium sativum ophioscordon* (0.0 و 0.1 و1 و10 و 100) مكغم / مل و ذلك بمزج حجم واحد من المستخلص (1) مل مع حجم مماثل من محلول الدنا القياسي ، حضن المزيج بحرارة (37) م° لمدة (10) دقائق ، بعدها تمت متابعة تأثير المستخلص على جزيئة الDNA من خلال قياس الامتصاصية على طول موجي (260) نانوميتر .

تأثير المزيج النباتي على الدنا البلازميدي

لغرض دراسة تأثير المزيج النباتي(مزيج النباتات الثلاثة حبة البركة، الثوم، الصرماق) على جزيئة الدنا لبلازميد PBR322 تم اولا" عزله وتنقيته من عزلة قياسية لبكتريا *Escherichia coli* حاوية على هذا البلازميد تم الحصول عليها جاهزة و مشخصة من مركز بحوث التقنيات

الاحيائية / جامعة النهرين وحسب ما ورد في [8] درس تأثير المزيج النباتي في ازاحة الجذور الحرة وحسب ما ورد في [9] وذلك بوضع حجوم متساوية من محلول الدنا البلازميدي في انابيب ايتدورف و اضافة تركيز (1 و10 و100) مكغم / مل من المزيج النباتي و اضافة المركب (H_2O_2) بتركيز نهائي (10^{-5} × 1) مولار أي ان الحصيلة النهائية كانت خمسة انابيب و كالآتي:

الانبوبة الاولى / دنا بلازميدي + محلول TE (وتعد كسيطرة سالبة)

الانبوبة الثانية /دنا بلازميدي + 1 مكغم/مل مزيج نباتي +(1×10^{-5}) مولار H_2O_2

الانبوبة الثالثة /دنا بلازميدي+ 10 مكغم /مل مزيج نباتي +(1×10^{-5})مولار H_2O_2

الانبوبة الرابعة/ دنا بلازميدي+ 100 مكغم/مل مزيج نباتي +(1×10^{-5}) مولار H_2O_2

الانبوبة الخامسة/ دنا بلازميدي+ (1×10^{-5}) مولار H_2O_2 (و تعد كسيطرة موجبة)

بعدها عرضت الانابيب الخمسة للتشعيع بتعريضها الى (300) نانوميتر من الاشعة فوق البنفسجية المنبعثة من جهاز Trans illuminator لمدة (5) دقائق بدرجة حرارة الغرفة وتكون عملية التشعيع هذه ضرورية لانبعاث ايون الهيدروكسيل (-OH) من جزيئة المركب (H_2O_2) و هو الايون الفعال في احداث ضرر في جزيئة الدنا البلازميدي بعد عملية التشعيع هذه تم ترحيل الدنا البلازميدي كهربائيا"و ذلك بتسليط فرق جهد كهربائي مقداره (60) فولت لمدة ساعة ونصف في (0.8)% من الاكاروز [8] .

النتائج

التحري عن نشاط انزيم DNase في المستخلصات النباتية

توضح نتائج الجدول (1) فعالية المستخلصات النباتية المختلفة في تحليل جزيئة الدنا عند استخدام وسط DNase ، فقد كانت مستخلصات الثوم هي الاعلى فعالية لهذا الاختبار ، تلتها مستخلصات الصرماق و أخيرا"حبة البركة . اما المزيج النباتي فقد امتلك فعالية عالية لهذا الاختبار ظهرت بشكل هالة شفافة حول الحفرة الحاوية على المزيج النباتي .

تأثير المستخلصات النباتية في ازاحة الجذور الحرة من محلول الدنا

نتائج الجدول (2) توضح تأثير التراكيز المختلفة من المستخلصات النباتية في جزيئة DNA نقية المحضرة بتركيز نهائي مقداره (5) مكغم/مل ، اذ يلاحظ ان الامتصاصية ازدادت بزيادة تركيز المستخلص النباتي ، و تتوافق النتائج هذه مع نتائج التجربة السابقة الموضحة في الجدول (1) أي ان المستخلصات النباتية تحتوي على فعالية لانزيم DNase تختلف باختلاف المستخلص النباتي هذا فيما يخص المجموعة (A) .

اما نتائج المجموعة (B) فتمثل قدرة المستخلصات النباتية في ازاحة الجذور الحرة المتحررة من مركب بيروكسيد الهيدروجين(H_2O_2) والمستخدم بتركيز (5-10) مولار و ذلك من خلال انخفاض قيم الامتصاصية عند الطول الموجي (260) نانوميتر بزيادة تركيز المستخلص النباتي . كما ان الفروق بين المعاملات و معاملة السيطرة كانت معنوية في اغلبها عند مستوى احتمالية ($P\leq0.05$) .

دراسة تأثير تراكيز مختلفة من المزيج النباتي على جزيئة DNA لبلازميد pBR322 المعزول من بكتريا E. Coli

المحلول القياسي لبلازميد pBR322 المجهز من شركات عالمية معروفة مثل (Sigma) الامريكية عند ترحيله كهربائيا"يظهر بثلاثة اشكال فيزيائية معروفة هي الحلقي المغلق و الحلقي المفتوح و اخيرا"الخطي و الذي يكون اسرع الاشكال الفيزيائية تأثرا"بالمجال الكهربائي فيظهر بشكل حزمة بلازميدية هي الابعد عن حفرة الترحيل يأتي بعدها الشكل الحلقي المفتوح ثم الحلقي المغلق بعدها الدنا الكروموسومي .

اما بطريقة استخلاصنا الواردة في [8] فاننا حصلنا على شكليين فيزيائيين فقط الحلقي المفتوح و الخطي بالاضافة للدنا الكروموسومي . استخدم هذا الاختبار للكشف عن الفعالية المزيحة للجذور الحرة في المزيج النباتي، تظهر النتائج الواردة في الصورة (1) فعالية المزيج النباتي عند التراكيز (1 و 10 و 100) مكغم/مل في حماية الدنا البلازميدي من التحول الى الشكل الخطي أي ان المزيج اضفى حماية على جزيئة الدنا البلازميدي .

المناقشة Discussion

يلاحظ من نتائج الجدول(2) ان المستخلصات النباتية المستخدمة في الدراسة قد اختزلت الضرر الحاصل في جزيئة الدنا النقية من خلال خفض الامتصاصية عند طول موجي (260) نانوميتر عن طريق غلق المواقع الحساسة في الجزيئة و التي قد يعمل عندها المركب H_2O_2 او من خلال تكوين اواصر بين المستخلص النباتي و المركب تؤدي الى خفض فعاليته المحطمة للجزيئة و بذلك اثبتت المستخلصات فعاليتها في ازاحة الجذور الحرة وضمنت حمالية لجزيئة الدنا و تاكيدا" لما سبق جاءت نتائج تأثير المزيج النباتي المنتخب في حماية جزيئة الدنا البلازميدي pBR322 من ايون الهيدروكسيل (OH^-) المتحرر بوساطة التحلل الضوئي (Photolysis) لمركب بيروكسيد الهيدروجين و الموضحة في الصورة (1) و هذه النتائج اتفقت مع ما توصل اليه [9] في فعالية المستخلصات المائية لنباتي (*Cistus incanus*) و (*C. Monspelinses*) في تثبيط الفعل التطفيري لبيروكسيد H_2O_2 من خلال حماية جزيئة الدنا البلازمييدي pBR322 من التحول الى الشكل الخطي و حفاظه على الجزيئة بالشكل الحلقي المقفول و الحلقي المفتوح.

المصادر

[1].Cerutti, A. (1994): flavon- 3- ols. Prodelphinidins and further polyphynols. form *Cistus salvifolius*. Pytochemistry. (37): 533-538.

[2].Totter, J.R. (1980): Superoxide radical scavenging activity of phenolic compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (77): 1763- 1773.

[3].Wiseman, H. and Halliwell, B. (1996): Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in iflammatory disease and progression to cancer. Biochem. J. (313): 17-29.

[4].Jakson, J.; (1994): Acamparison of DNA damages produced under conditions of direct and indirect action of radiation. Environ Health. (102): 155-158.

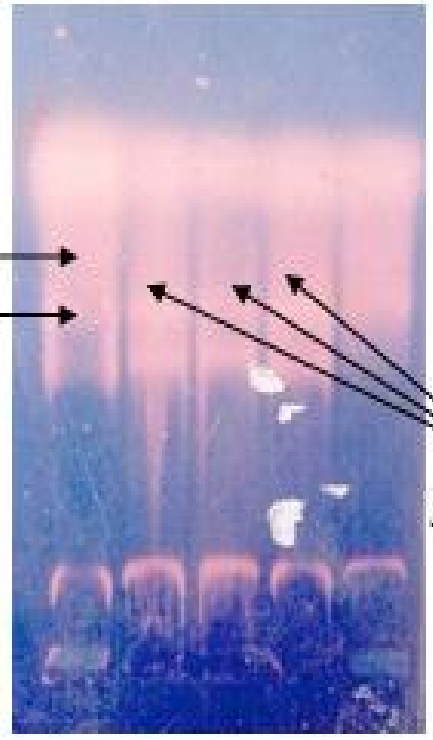
[5].Stevenoson, M.; Pobcck, S.; Coieman, C. and Caider Wood, S. (1994): Single and double-strand break formation in DNA aqueos solution dependence on dose and OH radical concentration. Cancer Res. (54): 12-15.

[6].Cappuccino, J. and Sherman, N. (1987): Identification of human staphylococcal pathogens. In microbiology: The Benjamin / cummings publishing company. PP. 361-379.

[7] . الجنابي، ازهار محمود،(2004): التأثير المضاد لبعض المستخلصات النباتية على الخلايا اللمفاوية لابيضاض الدم النخاعيني المزمن، اطروحة دكتوراه/ كلية العلوم/ الجامعة المستنصرية.

[8].Maniatis, T.; Fritsh, E. and Sambrook, J. (1982): Molecular Cloning: A laboratory Manual. New York, Colds ping Harbor laboratory.

[9].Attaguile, G., Russo, A.; Campisi, A.; Savoca, F.; Acquaviva, R.; Ragusa, N. and Vanella, A. (2000): Antioxidant activity and protective effect on DNA cleavage of extracts from Cistus incanus and C. monspeliensis. Cell Biology and Toxicology. (16): 83-90.



صورة (1) الترحيل الكهربائي لدنا بلازميدي معامل بتراكيز مختلفة من المزيج النباتي والمركب H_2O_2 في (0.8)% اكاروز وبفرق جهد (60) فولت لمدة ساعة ونصف.

1-الدنا البلازميدي +داري TE
2-الدنا البلازميدي + 1مكغم مل مزيج نباتي + (1×10^{-5}) مولار H_2O_2
3- الدنا البلازميدي + 10مكغم مل مزيج نباتي + (1×10^{-5}) مولار H_2O_2
4- الدنا البلازميدي + 100مكغم مل مزيج نباتي + (1×10^{-5}) مولار H_2O_2
5- الدنا البلازميدي + (1×10^{-5}) مولار H_2O_2

جدول (1) الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة في لمستخلصات النباتية المختلفة.

نوع المستخلص	الفعالية
حبة البركة مائي	+
ثوم مائي	++
صرماق مائي	+
حبة البركة كحولي	-
ثوم كحولي	++
صرماق كحولي	-
(حبة البركة + ثوم + صرماق) كحولي	++
(حبة البركة + ثوم + صرماق) مائي	++
حبة البركة الكلويد	+
ثوم الكلويد	++
صرماق الكلويد	++
حبة البركة فلافينويد	+
ثوم فلافينويد	++
صرماق فلافينويد	++
++ فعالية عالية + فعالية متوسطة - عديم الفعالية	

جدول (2) تأثير تراكيز مختلفة من المستخلصات النباتية المختلفة على جزيئة DNA نقية و أثر هذه المستخلصات في ازاحة الجذور الحرة من المحلول.

المعاملة		مجموعة (A)	مجموعة (B)
نوع المستخلص	التركيز (µg/ml)	المستخلص + DNA	المستخلص + DNA + M(1×10 5) H_2O_2
حبة البركة مائي	0.0	0.2006 ±0.0005	0.275 ± 0.0067
	0.1	0.227 ± 0.0068*	0.267 ± 0.009
	1	0.254 ± 0.0056*	0.242 ± 0.004*
	10	0.265 ± 0.0045*	0.225 ± 0.008*
	100	0.274 ± 0.0068*	0.213 ± 0.0254*
ثوم مائي	0.0	0.2006 ± 0.0005	0.275 ± 0.0067
	0.1	0.217 ± 0.0125	0.257 ± 0.0105
	1	0.232 ± 0.0106*	0.233 ± 0.0125*
	10	0.265 ± 0.014*	0.219 ± 0.0121*
	100	0.284 ± 0.0064*	0.23 ± 0.036*
صرماق مائي	0.0	0.2006 ± 0.0005	0.275 ± 0.0067
	0.1	0.206 ± 0.0045	0.2366 ± 0.0081*
	1	0.207 ± 0.001	0.223 ± 0.0087*
	10	0.208 ± 0.0015*	0.210 ± 0.0029*

0.207 ± 0.0026*	0.212 ± 0.0067*	100	
0.275 ± 0.0067	0.2006 ± 0.0005	0.0	حبة البركة كحولي
0.245 ± 0.00115*	0.24 ± 0.02*	0.1	
0.234 ± 0.0036*	0.27 ± 0.1*	1	
0.224 ±0.0025*	0.326 ± 0.0289	10	
0.214 ± 0.007*	0.376 ± 0.0153*	100	
0.275 ± 0.0067	0.2006 ± 0.0005	0.0	ثوم كحولي
0.266 ± 0.0105	0.230 ± 0.01*	0.1	
0.254 ± 0.0065*	0.240 ± 0.01*	1	
0.247 ± 0.0072*	0.247 ± 0.0042*	10	
0.239 ± 0.00115*	0.2627 ± 0.0057*	100	
0.275 ± 0.0067	0.2006 ± 0.005	0.0	صرماق كحولي
0.265 ± 0.0115	0.206 ± 0.005*	0.1	
0.258 ± 0.00416*	0.213 ± 0.0027*	1	
0.248 ± 0.0025*	0.219 ± 0.001*	10	
0.242 ± 0.0057*	0.223 ± 0.0015*	100	
0.275 ± 0.0067	0.2206 ± 0.0005	0.0	حبة البركة زيتي
0.269 ± 0.0055	0.207 ± 0.0055*	0.1	
0.261 ± 0.0012*	0.214 ± 0.0053*	1	
0.253 ±0.00153*	0.23 ± 0.01*	10	
0.244 ± 0.0025*	0.246 ± 0.002*	100	
0.275 ± 0.0067	0.2006 ± 0.0005	0.0	ثوم زيتي
0.26 ± 0.0066*	0.207 ± 0.0055	0.1	
0.251 ± 0.004*	0.2137 ± 0.0142	1	
0.245 ± 0.0021*	0.218 ± 0.002*	10	
0.2267 ± 0.0051*	0.26 ± 0.0132*	100	