Study of anti mutagenic and anti oxidant activity of clove plant extract in male white rats

دراسة النشاط المضاد للتطفير والأكسدة لمستخلص نبات القرنفل في ذكور الجرذان البيض*

السعدي ، رضية نجم عبد **; السعدي ، علي حمود ***و حتروش ، ستار جاسم ****

*بحث مقدم من لدن الباحث الاول
**كلية العلوم ،جامعة كربلاء
***كلية العلوم، جامعة بابل
****كلية التربية، جامعة كربلاء

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية للكشف عن الفعالية المضادة للأكسدة والتطفير للمستخلص الميثانولي المائي لنبات القرنفل(clove) *Syzygium aromaticum* . فقد تم توصيف المستخلص النباتي باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC إذ بينت النتائج وجود أكثر من مكون للمستخلص وعند فحص الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين لوحظ امتلاك المستخلص فعالية مضادة للأكسدة ظهرت في عدة حزم ، وقد حددت الفعالية المضادة للأكسدة لهذه الحزم من خلال احتفاظها باللون الأصفر. هذا وعند معاملة الجرذان بجرعة 2ملغم/كغم من عقار MMC لوحظ انه ادى الى زيادة مستوى تحلل الـDNA ، كما ادى اعطاء مستخلص القرنفل بتركيز 500 ملغم/كغم مع وبعد المطفر الى خفض مستوى التحلل، مايدل على ان المستخلص يعمل كمضاد للطفرة خارج الخلية بالدرجة الاولى ومضاد للطفرة داخل الخلية بالدرجة الثانية عند إعطائه قبل المطفر. كما تم اختبار معاملة المستخلص مع المطفر لمدد زمنية مختلفة وهي أسبوع واحد وأسبوعان وثلاثة أسابيع وأربعة أسابيع وخمسة أسابيع وذلك لمعرفة التأثيرات التراكمية للمستخلص في التقليل من أو منع فعل العقار، اذ لوحظ انخفاض مستوى التحلل خلال الاسابيع المتتالية ليصل الى السيطرة السالبة في الاسبوع الخامس. كذلك لوحظ ان معاملة الجرذان بالعقار ادى الى خفض معامل الانقسام MI 1.16 مقارنة بالسيطرة السالبة 3.2 . في حين ان اعطاء المستخلص مع وبعد المطفر ادى الى رفع قيم MI الى 2.43 ، 2.13 على التوالي بينما لم تشكل المعاملة قبل1.68 فرقا معنويا مع السيطرة الموجبة، وعند استمرار التجريع لخمسة اسابيع بالمستخلص مع المطفر لوحظ ارتفاع قيم MI وصولا الى السيطرة السالبة في الاسبوع الخامس. كما اشارت الدراسة الكروموسومية لنقي العظم الاحمر الى ارتفاع معدل التشوهات عند المعاملة بالمطفر . ولكن اعطاء المستخلص مع وبعد المطفر ادى الى خفض معدل التشوهات ، بينما المعاملة بالمستخلص قبل المطفر لم تعط فرقا معنويا مع السيطرة الموجبة ، اما التجريع المستمر فقد ادى الى خفض التشوهات الى حد السيطرة السالبة .لقد دلت نتائج الدراسة الحالية ان لمستخلص القرنفل فعالية مضادة للاكسدة والتطفير داخل وخارج الجسم.

Abstract

This study was designed to test the antioxidant and antimutagenic activity of methanolic water extract of clove. The extract has been described by using thin layer chromatography TLC, the results which showed the presence of more than one component of this extract and when examining the activity of antioxidant by beta carotene spray process , It was observed appearance of the antioxidant activity in several bands .

The antioxidant activity was determinated for these bands through the retention of the color yellow, which indicates the existence of effective antioxidant in some components of clove extract. When rats treated with 2 mg/kg of MMC lead to increased the level of DNA fragmentation and the interference treatment of extract at 500 mg/kg (with) and (after) the mutagen performed decrease the level of fragmentation,Thes results may indicate that the extract works as desmutagenic agent, while when given befor the MMC, the extract may works as antimutagenic agent. So the result of the oral gavage of mixing the extract with mutagen for five weeks reducing the level of the crash in the DNA compared with negative control. The results of MI of the interference treatment with extract (with) and (after) the mutagen performed a best result in the raising of median MI to 2.43 , 2.13 respectively compared with the positive control 1.16, while the extract before the treatment with mutagen did not

posses any significant differences 1.68 compared with positive control .The result of the oral gavage of mixing the extract with mutagen for five weeks had been showed, in the first week led to raise the median MI. The result of chromosomal abnormality CA of mice stem cell possessed a high significant difference in the positive control 26.0 compared with the negative control 5.33, while in the interference between the extract and mutagen the result showed a decrease in the median of abnormality to both treatment (with) and (after), while the treatment (before) did not posses any significant difference compared with positive control . Also the results of median chromosomal abnormality of the interference treatment (with) to five weeks showed a decrease in the median of CA. The results of this study refer to that the clove extract have antioxidant and antimutagenic activity In vivo and In vitro.

المقدمة

لقد أثبتت البحوث الحديثة امتلاك المركبات الفعالة في النبات الفعل المضاد للطفرة الناتجة من الكثير من العوامل الملوثة الداخلية والخارجية والتي تحث على تكوين أنواع مختلفة من الأضرار الوراثية والضعف المناعي والذي يسبب بدوره أمراض عديدة في الإنسان والحيوان والنبات وتعمل هذه المركبات الفعّالة بشكل مفرد أو تآزري إذ أنها قسمت إلى قسمين تبعا للآلية التي تعمل بها فالقسم الأول مضاد للطفرة المباشرة Desmutagens أي التي تثبط التنشيط الايضي للمطفر أو منعه أو احد متايضاته من الوصول إلى ألـ DNA وإحداث ضرر فيه ، القسم الآخر مضاد للطفرات الحيوية Bioantimutagens والتي تعمل على منع تثبيت الطفرة بزيادة كفاءة أنظمة الإصلاح DNA repair systems في الخلية [1]. ونبات القرنفل (Clove) *Syzygium aromaticum* ينتمي إلى العائلة الآسية Myrtaceae ، و هو من الأشجار دائمة الخضرة والتي تنمو إلى مديات عالية تتراوح من 10-20 متر وتمتلك أوراق بيضوية كبيرة وأزهار قرمزية اللون في مجاميع متعددة لعناقيد طرفية ، تكون البراعم الزهرية في البداية شاحبة اللون ، تصبح خضراء تدريجيا وعندما تنضج تكون ذات لون احمر مشع [2]. وقد استخلصت العديد من المركبات الفعالة من هذا النبات كالتانينات tannins والتربينيدات الثلاثية triterpenoids [3]. كما وجد [4] ان لمستخلص القرنفل عدة مركبات فعالة تمتلك تأثير مضاد للاكسدة antioxidant ومضاد للورم antitumor اضافة الى كونه مركب مضاد للتسرطن [5]. وقد اظهر اليوجينول وهو المركب الرئيس في القرنفل قابلية على توليد الجذور الحرة ROS (Reactive Oxygen Species) وهي انواع الاوكسجين الفعالة في خط خلايا اللوكيميا HL-60 والتي تؤدي إلى زيادة نفاذية المايتوكوندريا وبالتالي ظهور الموت الخلوي المبرمج Apoptosis [6]. وعلى النقيض من ذلك فقد افاد [7] ان مركب اليوجينول يقلل من تولد انواع الاوكسجين الفعّالة ROS داخل الخلايا الطبيعية وبذلك فانه يقلل من الفعل التطفيري لها. كما لاحظ [8] ان القرنفل يعمل على خفض مستويات إنزيمات الكبد في المصل وتعود هذه الفعالية إلى وجود مضادات الأكسدة في القرنفل كما أنه يحتوي على مركبات فينولية تعمل ككاسحات للجذور الحرة . وقد هدفت الدراسة الحالية الى الكشف عن الفعالية المضادة للتطفير والاكسدة لمستخلص نبات القرنفل لذا تضمنت.

1. توصيف المستخلص الميثانولي المائي بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC .
2. فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص بطريقة الرش بالبيتاكاروتين .
3. دراسة تأثير الجرعة المطفرة لعقار المايتومايسين و التاثير الوقائي أو العلاجي المحتمل للمستخلص في كروموسومات خلايا نقي العظم الاحمر والـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيض.

المواد وطرائق العمل

المواد:

1.النبات المستخدم:

استخدم في هذه الدراسة البراعم الزهرية الجافة dried flower buds لنبات القرنفل المتوفرة في السوق المحلية لدى العطارين وبائعي الأعشاب الطبية وقد صنف النبات استنادا إلى[9].

2.حيوانات التجارب:

استخدمت في هذه التجربة 33 جرذ ابيض White albinos' rats بعمر 8 اسابيع وتركت على الاقل اسبوعين للتكيف مع ظروف المختبر قبل اجراء التجارب عليها.

طرائق العمل:

1.تحضير المستخلص: حضر مستخلص القرنفل من البراعم الزهرية الجافة وحسب طريقة [10] وركز باستخدام المبخر الدوار(Rotary evaporator) ووضع في الحاضنة على درجة 50 م للحصول على المستخلص الجاف، حفظ في مكان جاف لحين الاستعمال.

2.توصيف المستخلص بواسطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:

نشطت صفائح السيليكا جيل بوضعها في الفرن لمدة ساعة تقريبا عند درجة حرارة 105 م وتم وضع مايقارب (50 - 100) مايكروليتر من مزيج المستخلص ومحلول الطور السائل المستخدم في التجربة واستخدم مزيج (خلات الاثيل : هكسان 3:1

(V/V/V) [11] كطور سائل لعملية الفصل، واجريت عملية الفحص تحت الضوء المرئي والاشعة فوق البنفسجية، اذ تم تحديد عامل الإعاقة R_f(Retardation Factor) للحزم المتكونة إضافة إلى ألوان تلك الحزم وعددها[12].

3.اختبار الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين:

اجري اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بأستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين على صفائح TLC والمشار اليها من قبل [13] أذ مثلت الحزم التي احتفظت باللون الأصفر مكونات مضادة للأكسدة وتتناسب كثافتها اللونية مع الفعالية المضادة للأكسدة .

4.تحديد الجرعة المثالية للمايتومايسين (MMC) والقرنفل:

تم استخدام التركيز الامثل لـ MMC والذي يمتلك قدرة تطفيرية ويناسب مع وزن الجرذ والمتمثل بـ 2 ملغم/ كغم من وزن الجسم [14] ، اما تركيز المستخلص النباتي المثالي فقد كان 500 ملغم/كغم من وزن الجسم [15].

5.تصميم التجارب:

استخدم التركيز الامثل للمطفر والمتمثل بـ 2 ملغم/ كغم من وزن الجسم مع المستخلص بتركيز 500 ملغم/كغم من وزن الجسم وعلى شكل ثلاثة تداخلات ، تم تجريع الحيوانات فمويا للمستخلص والمطفر .

السيطرة السالبة: تم تجريع 3 جرذان ماء مقطر فقط وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة.

التداخل الاول: تم تجريع 3 جرذان بالمستخلص قبل المطفر بـ 24 ساعة وقتلت بعد 48 ساعة.

التداخل الثاني: تم تجريع 3 جرذان بالمستخلص مع المطفر وقتلت بعد 24 ساعة.

التداخل الثالث: تم تجريع 3 جرذان بالمستخلص بعد المطفر بـ 24 ساعة وقتلت بعد 48 ساعة.

كما تم اختبار المعاملة بالتداخل الثاني لمدد مختلفة ، اذ تم قتل 3 جرذان كل اسبوع ولمدة خمسة اسابيع كما تم تجريع 3 جرذان بالمطفر لمدة اسبوع واحد واعتبرت سيطرة موجبة.

وقد اجري على كل مجموعة اختبار تحلل الـDNA واختبار معامل الانقسام واختبار التشوهات الكروموسومية.

6.اختبار تحلل الـDNA :

تم استخلاص الـDNA حسب التعليمات المرفقة من شركة Promega ، ثم اجريت عملية الترحيل الكهربائي لـ DNA حسب طريقة [16].

7.تحضير كروموسومات نقي العظم :

لتحضير كروموسومات نقي العظم اتبعت طريقة[17]، اذ حقنت الحيوانات بـ0.25 مل من الكولجسين بتركيز (0.1 ملغم/مل) في التجويف الخلبي قبل القتل بثلاث ساعات ثم تم حساب الاختلالات الكروموسومية لكل 1000 خلية ، اما معامل الانقسامMI فتم حسابه لكل 1000 خلية وحسب المعادلة التالية:

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

8.التحليل الاحصائي:

تم التحليل الاحصائي باستعمال البرنامج SAS (2001) بتصميم عشوائي كامل (CRD)، كما تم استعمال اختبار دانكن متعدد المدى Duncan s Multible Range Test على مستوى احتمال1%[18].

النتائج والمناقشة

توصيف المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC:

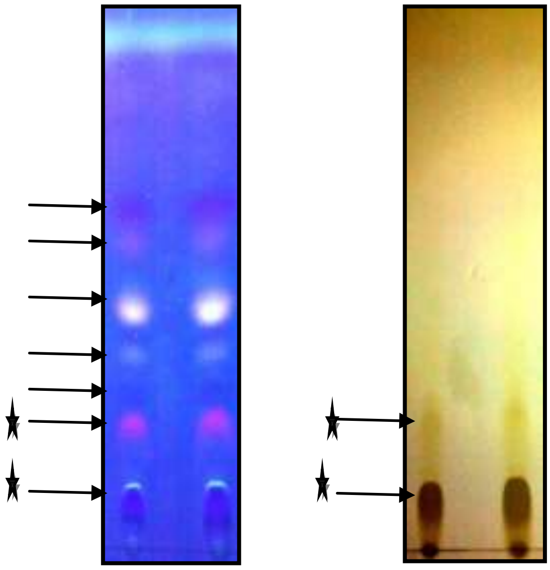
يبين الشكل(1) نمط ترحيلTLC للمستخلص عند فحصه بالضوء المرئي والاشعة فوق البنفسجية التي تم تلخيصها في الجدول (1) الذي يبين خصائص الحزم من ناحية الـ R_f واللون وعدد الحزم الظاهرة، حيث يلاحظ ظهور حزمتين عند الفحص بالضوء المرئي للطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 3 : 1 V/V) وكان R_f = 0.123 , 0.217 و(7) حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية وتراوحت قيم الـ R_f لها بين 0.123 – 0.833، وتشير هذه النتائج إلى وجود أكثر من مكون مختلف في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.ويمكن ان يعزى ذلك الى احتواء المستخلص على اكثر من مركبواهمها الفلافونيدات، اذ اشار [19] ان اختبار phytochemical لمستخلص القرنفل قد كشف عن وجود الفلافونيدات والراتنجات والكلايكوسيدات والقلويدات والصابونيات والتانينات. كذلك وجد [20] ان القرنفل يحتوي على مركبات عديدة كالتانينات والفلافونيدات والستيرولات والكلايكوسيدات . وقد ذكر [21] ان المكونات الرئيسة لزيت القرنفل هي phenylpropanoides مثل مركب carvacol وthymol وeugenol وcinnamaldehyde .

جدول (1) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/ v) .

طريقة الفحص	خصائص الحزم		العدد
	R_f	اللون	
الضوء الاعتيادي (المرئي)	*0.123	بني	2
	*0.217	اصفر	
الأشعة فوق البنفسجية	*0.123	ازرق فاتح	7
	*0.217	وردي غامق	
	0.355	نيلي	
	0.442	ازرق فاتح	
	0.565	ابيض	
	0.739	وردي فاتح	
	0.833	بنفسجي	

- الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية

المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية

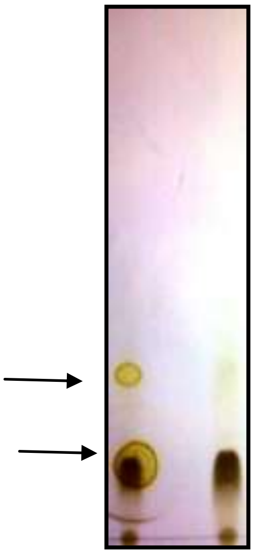


(ب) (أ)

شكل (1) يوضح ترحيل المستخلص الميثانولي للقرنفل على صفائح TLC باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/ v) .تشير الاسهم الى الحزم المفصولة .أ-عند الفحص بالضوء المرئي.ب- عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية
★الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والاشعة فوق البنفسجية.

اختبار الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين:

يبين شكل (2) نتائج فحص الفعالية المضادة للاكسدة لمستخلص القرنفل باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين والموضحة في جدول(2) وقد أظهرت النتائج وجود فعالية جيدة للمستخلص مضادة للاكسدة في حزمتين الـ R_f = 0.12 , 0.21 وذلك لاحتفاظها باللون الاصفر كدليل على كونها مضادات اكسدة فقد اشار [22] الى ان القرنفل يمتلك فعالية مضادة للاكسدة خارج الجسم *In vitro* . كما انه يقلل او يخفض من جهد التاكسد oxidative stress داخل الجسم *In vivo*[23].وقد تعود الفعالية المضادة للاكسدة للقرنفل الى محتواه من الـ phytochemicals والتي تزيد من مقدار او فعالية الانزيمات المضادة للاكسدة[24]. او قد تعود الى محتواه من العناصر الاثرية والتي تعتبرمن المتطلبات الضرورية لفعالية الانزيمات المضادة للاكسدة [25].



(أ)   (ب)

شكل(2) فحص الفعالية المضادة للاكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v)

(أ) قبل الرش   (ب) بعد الرش

• الاسهم تشير الى الحزم ذات الفعالية المضادة للاكسدة (التي احتفظت باللون الاصفر).

جدول (2) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v).

الحزمة R_f	نتيجة الفحص
0.123	+
0.217	+
0.355	-
0.442	-
0.565	-
0.739	-
0.833	-

+ : وجود فعالية مضادة للأكسدة (الحزم التي احتفظت باللون الاصفر)
- : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة

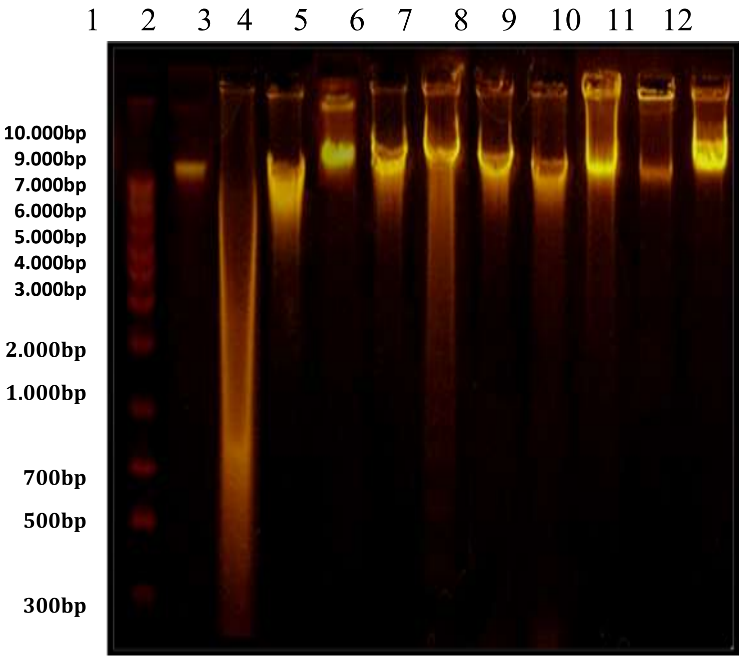
الاختبارات البايولوجية الجزيئية والوراثية الخلوية:

اختبار تحلل الـDNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء :

يبين الشكل (3) مستوى تحلل الـDNA المستخلص من دم الجرذان المعاملة بالمستخلص و بثلاثة تداخلات (قبل، مع ، بعد) المطفر وبالجرع المنتخبة ،كما يبين مستوى تحلل الـDNA لدم الجرذان المعاملة بالتداخل (مع) ولخمسة اسابيع ،وقد تم تلخيص النتائج في جدول (3)، اذ لوحظ ان الجرذان المعاملة بـ MMC اظهرت مستوى عالي من التحلل للـ DNA بمسحة تراوحت من 300-10000 زوج قاعدي وبحجم جزيئي 9700 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة السالبة بحجم جزيئي 10000 زوج قاعدي اذ لم يظهر اي تحلل ويرجع السبب الى ان عقار المايتومايسين له فعل المباشر على الـ DNA والذي يحدث بطريقتين هي اما الكلة الحامض النووي منقوص الاوكسجين alkylation DNA (والتي تؤدي الى حدوث ارتباطات عبورية cross links)، أو توليد الجذور الحره مثل superoxide وhydroxy radicals (والتي تؤدي الى كسور في شريط الـ DNA) [26]. اما عند اجراء التداخل بين المستخلص والعقار اظهر الـ DNA مستوى تحلل منخفض وللمعاملات الثلاث (قبل) و (مع) و (بعد) اذ اعطت حزم بحجم جزيئي 6000 ، 2000، 4000 زوج قاعدي على التوالي بالمقارنة مع السيطرة الموجبة كما كانت المعاملة (بعد) هي الافضل في خفض مستوى التحلل.وعند استمرار التجريع بالمعاملة (مع) اظهرت النتائج انخفاض مستوى تحلل الـDNA، فالاسبوع الاول اعطى مسحة بحجم جزيئي 4000 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة الموجبة التي اعطت مسحة بحجم جزيئي 9000 زوج قاعدي ، اما الاسبوع الثاني والثالث والرابع والخامس فقد اعطت مسحات بحجم جزيئي 5000، 5000، 2000، 1000 زوج قاعدي على التوالي هذا يدل على ان للمستخلص النباتي قدرة على تثبيط فعل المطفر والتي تعود الى احتواء المستخلص على المركبات الكيميائية النباتية، فبعض المركبات مثل الفلافونيدات و التانينات معروفة بفعلها المضاد للتطفير من خلال تفعيلها لآليات مختلفة و عديدة لصالح الجسم فمثلا" يعتقد ان الفلافونيدات المستخلصة من نبات الميرمية والزعتر والنعناع الفلفلي لها القدرة على تثبيط الفعالية التطفيرية لمركب Trp-p-2 من خلال عرقلة مسار التنشيط الايضي للمركب اضافة الى فعلها المضاد للاكسدة في ازالة الجذور الحرة المتولدة من تأيض المطفرات ، اما التانينات فيعتقد انها المسؤولة عن عملية الاصلاح بالقص (Excision erepair) من خلال تفاعلها مع جزيئة الـ DNA مباشرة" او من خلال تنشيطها لانزيمات الاصلاح [27]. كما وجد [28] ان نبات*Phllanthus orbicularis* الغني بمركبات الكلايكوسيدات والصابونيات والكومارينات مضاد للاكسدة والتطفير اذ انه يحفز انظمة الاصلاح لشريط الـ DNA ويؤدي الى غلق المواقع الحساسة للجزيئات الخلوية لحمايتها من التاكسد بالجذور الحرة. وقد وجد ان لبعض النباتات ومركباتها كفاءه مضادة للتطفير الذاتي الناتج بسبب حصول تحوير في انزيم DNA– polymerase ومن هذه النباتات الشاي الاخضر[29].

جدول(3) يبين مستوى تحلل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان بعد المعاملة بالـMMC و المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل ،مع، بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.

رقم المجال في الشكل 3	التداخل	الحجم الجزيئي التقريبي bp (base pair)	مستوى التحلل مقارنة بالسيطرة السالبة bp
1	DNA ladder	10000	-
2	السيطرة السالبة	10000-10000	0
3	السيطرة الموجبة	300-10000	9700
4	المستخلص قبل المطفر	4000-10000	6000
5	المستخلص مع المطفر	8000-10000	2000
6	المستخلص بعد المطفر	6000-10000	4000
7	MMC اسبوع واحد	1000-10000	9000
8	التداخل (مع) اسبوع اول	6000-10000	4000
9	التداخل (مع) اسبوع ثاني	5000-10000	5000
10	التداخل (مع) اسبوع ثالث	5000-10000	5000
11	التداخل (مع) اسبوع رابع	8000-10000	2000
12	التداخل (مع) اسبوع خامس	9000-10000	1000



شكل (3) يبين نمط الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان المعاملة بالـ MMC والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل ،مع، بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.

1. DNA ladder المستخدم كدليل حجمي .
2. DNA دم الجرذان المعاملة بالماء المقطر (السيطرة السالبة).
3. DNA دم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من عقار MMC (السيطرة الموجبة).
4. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص قبل المطفر.
5. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر .
6. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص بعد المطفر .
7. DNA دم الجرذان المعاملة بالمطفر MMC لمدة اسبوع واحد.
8. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع اول.
9. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع ثاني.
10. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع ثالث.
11. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع رابع .
12. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر اسبوع خامس.

اختبار معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان:

يوضح الجدول (4) انخفاض قيمة معامل الانقسام MI لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من عقارMMC إلى1.16 مقارنة مع السيطرة السالبة 3.2 وبفرق معنوي عالي، وهذا يدل بوضوح على التاثيرات السمية الوراثية و التطفيرية للعقار من خلال قدرته على خفض معامل الانقسام وتتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للعقار على خلايا اللبائن من خلال تثبيطه لمعامل الانقسام لخلايا نقي عظم الفئران عند استخدامه بجرعة 4 ملغم / كغم [30] .ويعود سبب هذه التاثيرات الى فعالية العقار في القضاء على الخلايا لتداخله مع المادة الوراثية الـ DNA لانه يعترض عملية التضاعفDNA Replication وتثبيط الانقسام الخيطي من خلال ارتباطه التساهمي بقاعدة الكوانين بنفس شريط الـ DNA او بين شريطي الـ DNA ، لذا فان هذا الارتباط لـMMC بالـ DNA هو المسؤول عن التقليل من النمو والانقسام الخيطي[31]. وعند اجراء التداخل بين المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بجرعة 500 ملغم/كغم مع الجرعة المعتمدة للـMMC وعلى شكل ثلاث معاملات و هي المستخلص (قبل،مع ،بعد) المطفر لتحقيق هدف الدراسة في معرفة الآلية التي تعمل بها مثبطات المواد المطفرة من خلال اختلاف المعاملة بين المطفر والمثبط ، لوحظ ارتفاع معدل معامل الانقسام ، اذ نجد ان المعاملة بالمستخلص (مع)،(بعد) المطفر كانت الافضل في رفع قيم MI الى2.43 ،2.13 على التوالي وبفرق معنوي عالي عن السيطرة الموجبة اما قيمة MI للمعاملة (قبل) فقد ارتفع الى 1.68 وبفرق معنوي بسيط عن السيطرة الموجبة، وتعود هذه الفعالية الى قدرة المركبات الفعالة النباتية على تحفيز الخلايا الجذعية على الانقسام لكي تعوض النقص الحاصل في الخلايا الدموية في

مجرى الدم نتيجة التاخر في عملية الانقسام او موت بعض الخلايا نتيجة المعاملة بالعقار[32]. وعموما فالمواد المثبطة التي تكون فعالة مع او قبل المطفر تعمل كمثبطات مباشرة Desmutagens من خلال تثبيط عمل المطفر كيميائيا وذلك بتكوين معقد مع المادة المطفرة او احد متايضاتها وبذلك يمنع وصوله الى الخلية او ربما تتفاعل المادة المضادة مع المواقع المستهدفة بفعل المطفر من خلال عملها بوصفها مادة غالقة Blocking agent تمنع المطفر من الوصول الى المواقع المستهدفة في الـ DNA او التفاعل معها مما يؤدي الى منع تاثيرات المطفر، او من خلال تثبيط عمل المطفر انزيميا وذلك بتثبيط انزيمات التنشيط الايضي للمطفرات وبصورة غير مباشرة او من خلال زيادة انزيمات ازالة السمية المتواجدة بصورة طبيعية في الجسم[33]. اما المثبطات التي تكون فعالة بعد اعطاء المطفر فتسمى مثبطات حيوية Bio-antimutagens اذ تعمل على اصلاح التلف بعد حدوثه من خلال زيادة دقة عملية تضاعف الـDNA وزيادة انظمة الاصلاح عن طريق زيادة الاصلاح الخالي من الخطا والتقليل من الاصلاح القابل للخطأ[34].

وقد اوضحت نتائج المعاملة بالمستخلص مع المطفر ولمدة خمسة اسابيع كما في جدول (5) ان التاثير التراكمي للمستخلص قد رفع قيمة MI تدريجيا اذ كانت قيمته في الاسبوع الاول والثاني والثالث من التجريع 1.93 ،2.03، 2.16 على التوالي وبفرق معنوي بسيط مقارنة مع السيطرة الموجبة 1.02 او بالمقارنة فيما بينها اما الاسبوع الرابع والخامس فقد ارتفع MI الى 2.73، 2.7 على التوالي وصولا الى السيطرة السالبة 3.2 وبدون فرق معنوي ، مما يعني ان التجريع المستمر للمستخلص قد قلل او منع تاثير المطفر على معدل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الجرذان، وقد يعود السبب الى احتواء المستخلص على المركبات الفلافونيدية. فقد وجدت [35] زيادة في معدل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالفلافونيدات المستخلصة من نباتات الكجرات و اكليل الجبل و الميرامية. ويعود تاثير الفلافونيدات المستخلصة في رفع معامل الانقسام لكون لها قابلية تحفيزية للخلايا على الانقسام الخلوي من خلال التاثير على نفاذية غشاء خلايا الدم البيضاء فتحفزها على الانقسام الخلوي بشكل غير مباشر او بشكل مباشر من خلال حثه على تحديد النشاط والحيوية للخلايا اللمفاوية او حثه لعملية تضاعف الـDNA[36].

جدول (4) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي للتداخلات الثلاثة .

المعاملة	M± SE
السيطرة السالبة	3.2 ± 0.11 A
السيطرة الموجبة	1.16 ±0.01 D
المستخلص مع المطفر	2.43 ± 0.01 AB
المستخلص بعد المطفر	2.13 ± 0.01 BC
المستخلص قبل المطفر	1.68 ± 0.24 CD

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
- الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية < 0.01 .

M: المتوسط

SE: الخطأ القياس

جدول (5) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص ولمدد مختلفة .

المعاملة	M± SE
السيطرة السالبة	3.2±O.1 A
السيطرة الموجبة (مطفر اسبوع)	0.96 ±0.09 C
المستخلص مع المطفر (اسبوع اول)	1.93±0.01 B
المستخلص مع المطفر (اسبوع ثاني)	2.03±0.0 B
المستخلص مع المطفر (اسبوع ثالث)	2.16±0.03 B
المستخلص مع المطفر (اسبوع رابع)	2.73±0.01 A
المستخلص مع المطفر (اسبوع خامس)	2.7 ±0.21 A

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
- الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية < 0.01 .

M: المتوسط

SE: الخطأ القياسي

أختبار التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان.

يشمل الجدول (6) بعض التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من الـMMC ، اذ بلغت 26.0 مقارنة مع السيطرة السالبة 5.33 وبفرق عالي المعنوية مما يدل على التأثير السمي الوراثي للعقار في احداث التشوهات الكروموسومية . وتتفق هذه النتيجة مع نتائج دراسات سابقة والتي أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للمطفر مايتومايسين C في خلايا الفئران من خلال حثه التغيرات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفئران[37]. وعلى الخلاف من المواد المسرطنة التي تنتج الانحرافات الكروموسومية عن طريق التداخل مع آليات التكاثف، يحث الـMMC هذه الانحرافات عن طريق شطر اشرطة الـDNA ، وقد لوحظ ان حدوث الكسور الكروماتينية وكسور منطقة السنترومير ربما تعود الى الفعالية الانتقائية للعقار لمناطق Heterochromatin [38].

وعند اجراء التداخل بين المستخلص بجرعة 500 ملغم/كغم والمطفر بالجرعة المعتمدة ، لوحظ انخفاض معدل التشوهات الكروموسومية من كسر كروماتيدي وكروموسومي وكروموسوم حلقي وفرط وقلة مجموعة كروموسومية في جميع المعاملات بالمستخلص مع و بعد وقبل المطفر ،اذ بلغت 14.0، 14.0، 19.66 على التوالي وبفرق معنوي عن السيطرة الموجبة ، مما يثبت قابلية المستخلص على خفض تاثير العقار واعتباره ضمن المثبطات المباشرة بالدرجة الاولى (اي التي تعمل على تثبيط التنشيط الايضي للمطفر او حدوث تداخل كيميائي مباشر بين المطفر ومضاد التطفير) وضمن المثبطات الحيوية بالدرجة الثانية (اي تعمل على تنشيط عمليات اصلاح الطفرة).

كما ان التجريع المستمر للمستخلص مع العقار قد ادى الى خفض معدل التشوهات الكروموسومية كما في جدول(7) ، اذ لوحظ ان التجريع لمدة اسبوع واحد للمعاملة (مع) قد خفض معدل التشوهات الى 14.66 مقارنة مع السيطرة الموجبة 24.33 وبفرق معنوي بسيط اما التجريع للاسبوع الثاني والثالث والرابع قد خفض معدل التشوهات الى 12.0 ، 12.33، 12.66على التوالي ولكن بدون فروق معنوية بالمقارنة فيما بينها او مع الاسبوع الاول اما المعاملة للاسبوع الخامس فقد ادت الى خفض معدل التشوهات9.0 وبدون فرق معنوي بالمقارنة مع السيطرة السالبة 5.33 ، مايدلل على ان استمرار اخذ المستخلص ادى الى الحد من تاثير العقار في احداث التشوهات الكروموسومية.وقد اتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل اليه[39]إلى أن مستخلص نبات *Ginseng* *Callus* له القدرة على تثبيط المطفر مايتومايسين C الذي يمتلك تأثير تطفيري في رفع معدل التغيرات الكروموسومية والتبادل الكروماتيدي الشقيقي لخلايا نقي العظم للفأر الأبيض والهامستر .ويتفق ذلك ايضا مع ما ذكره [40] حول قدرة الشاي الاخضر على خفض معدل الاختلالات الكروموسومية وذلك من خلال اجراء اختبار النوى الدقيقة (Micronucleus assay) في خلايا CHO

وخلايا الفئران المستحثة بحقن تلك الحيوانات بالمطفر MMC داخل البريتون ، حيث لوحظ انخفاض تكرار النوى الدقيقة بشكل واضح عند معاملة الحيوان بالمستخلص بحجم 1مل قبل حقنه بالمطفر بحوالي ست ساعات.

جدول (5) متوسط التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي في ثلاثة تداخلات.

التشوهات / المعاملة	كسر كروماتيدي M± SE	كسر كروموسومي M± SE	كروموسوم حلقي M± SE	فرط مجموعة كروموسومية M± SE	قلة مجموعة كروموسومية M± SE	مجموع التشوهات M± SE
السيطرة السالبة	1.0± 0 B	0.33±0.33 B	± 0.57 2.0 B	1.0±1.0 A	1.0 ± 0.5 B	5.33±1.4 C
السيطرة الموجبة	8.0 ± 2.08 A	4.33 ± 0.3 A	± 0.8 6.33 AB	2.0± 1.0 A	5.33± 0.88 A	26.0± 1.0 A
المستخلص مع المطفر	2.6 ± 1.33 B	1.0± 0.5 B	7.0± 3.2 AB	0.66± 0.3 A	2.66± 1.7 AB	14.0± 3.2 B
المستخلص بعد المطفر	2.0± 1.1 B	1.33± 0.6 B	7.0± 3.6 AB	0.33± 0.33 A	0.33± 0.66 AB	14.0± 3.05 B
المستخلص قبل المطفر	2.0± 1.1 B	1.0± 0.5 B	11.6± 0.8 A	2.0± 0.5 A	3.0± 1.5 AB	19.66± 1.7 AB

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
- الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية < 0.01 .

M: المتوسط

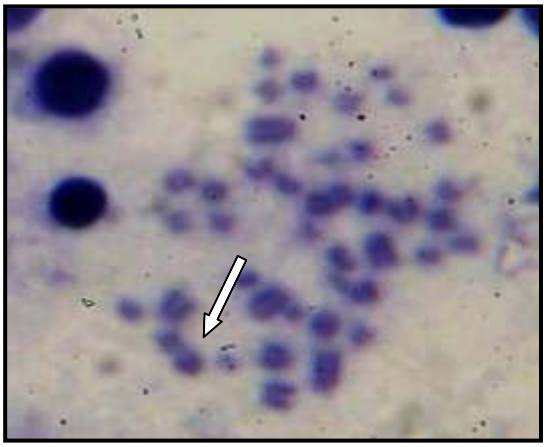
SE: الخطأ القياسي

جدول (6) متوسط التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي ولمدد مختلفة.

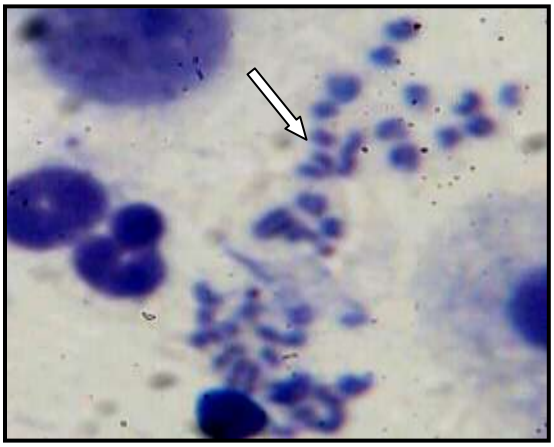
التشوهات / المعاملة	كسر كروماتيدي M± SE	كسر كروموسومي M± SE	كروموسوم حلقي M± SE	فرط مجموعة كروموسومية M± SE	قلة مجموعة كروموسومية M± SE	مجموع التشوهات M± SE
السيطرة السالبة	1.0± 0.0 B	0.33±0.33 B	2.0±0.57 B	0.66±0.66 A	1.0±0.57 B	5.33±1.45 D
السيطرة الموجبة (مطفر اسبوع)	8.33±2.02 A	3.66±0.33 A	6.0±1.0 AB	2.0±1.15 A	4.33±0.33 A	24.33±1.85 A
المستخلص مع المطفر (اسبوع اول)	3.66±2.1 B	0.33±0.33 B	7.33±1.8 A	1.33±0.33 A	4.66±0.88 A	14.66±1.2 B
المستخلص مع المطفر (اسبوع ثاني)	0.33±0.33 B	1.0±0.57 B	7.33±2.18 A	0.33±0.33 A	3.0±1.0 AB	12.0±2.64 BC
المستخلص مع المطفر (اسبوع ثالث)	1.0±0.57 B	0.66±0.33 B	4.33±1.2 AB	1.33±0.33 A	5.0±0.57 A	12.33±1.2 BC
المستخلص مع المطفر (اسبوع رابع)	0.0±0.0 B	0.66±0.33 B	6.33±1.76 AB	0.66±0.66 A	5.0±1.5 A	12.66±0.66 BC
المستخلص مع المطفر (اسبوع خامس)	0.0±0.0 B	0.0±0.0 B	4.0±0.57 AB	1.33±0.66 A	3.66±3.66 AB	9.0±0.57 CD

- الاحرف المتشابهة تدل على عدم وجود فروق معنوية.
- الاحرف المختلفة تدل على وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية < 0.01 .

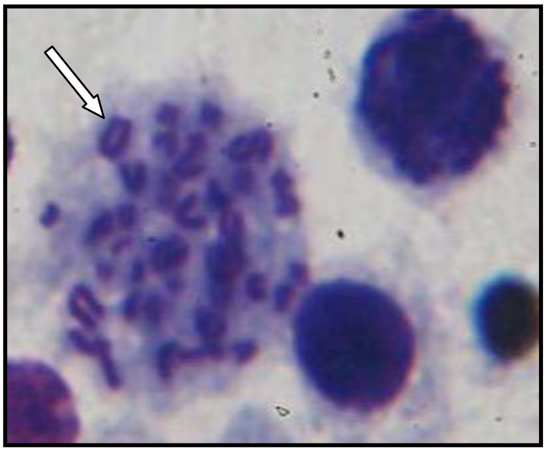
M :المتوسط
SE :الخطأ القياسي



كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ،صبغة گمزا)

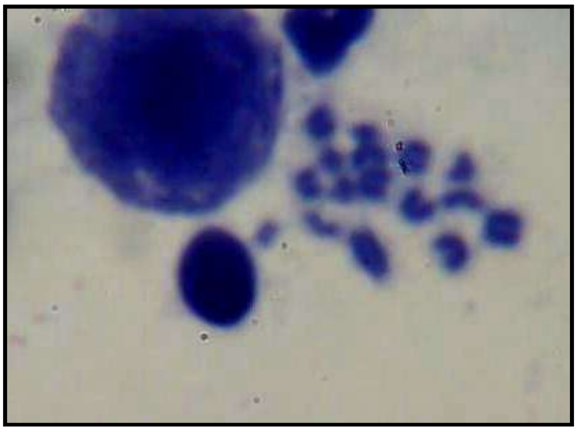


كسر كروماتيدي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل(1000Xصبغة گمزا) .



كروموسوم حلقي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

فرط المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .



قلة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

References

[1]**Samejima, K. ;Kanazawa, K. ; Ashida, H. & Danno, G. I.(1995).** Luteolin : astrong antimutagen against dietary carcinogen Trp- p-2 , in peppermint, sage and thyme. J.Agric. food. chem.,**43**(2): 410-414.

[2]**Kim , H. M.; Lee, E. H.; Hong, S. H.; Song, H. J.; Shin , M. K. ; S. H. & Shin, T.Y. (1998).**Effect of *Syzygium aromaticum* extract on immediate hypersensitivity in rats. J. Ethnopharmacol. , **60**: 125-131.

[3]**Umehara ,K.; Takagi ,R.; Kuroyanaki, M.; Ueno, A.; Taki , T. & Chen, Y.J. (1992)**. Studies on differentiation-inducing activities of tri terpens. J. Chem. Pharm. Bull., **40** (2) : 401-405.

[4]**Lee, K. G. & Shibamoto, T. (2001).** Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. Food Chem., **74**:443–448.

[5]**Dorai,T. & Aggarwal, B.B.(2004).** Role of chemopreventive agents in cancer therapy. Cancer Lett**.**, **215**: 129-140.

[6]**Chae-Bin, Y.; Ki-Tae, H. & Kyu-Seok, C. (2005).** Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. Cancer Lett.,**225**(1):41-52.

[7]**Nagababu, E. ;Rifkind, J. ;Boindala, S. & Nakka, L. (2010).** Assessment of antioxidant activity of eugenol *In vitro* and *In vivo*. Methods Mol. Biol., **610**:165-180.

[8]**Abdel-Wahhab, M.A. & Aly, S.E.(2005).** Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. J. Appl. Toxicol., **25**:218-23.

[9] **Bin Mdderos, M. R. (2008).** Production and characterization of extraction oil from natural spices: A comparison study with functional group content of *Zea may* and *Elaeis guineesis jaco*. oil .Bachelor Thesis, Malaysia Pahang, Univ.

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

[11]**Carrasco, H. A.; Espinoza, L.C.; Cardile, V. ; Gallardo, C.; Cardona, W.; Lombardo, L.; Catalan, K. M.; Cuellar, M.F. & Russo, A.(2008).**Eugenol and its synthetic analogues inhibit cell growth of human cancer cels(part I). J. Braz. Chem. Soc., **19**(3) : 543-548.

[12]**Vekiari, S. A.; Orcopoulo, V. & Thomopoulos, C.D. (1993).** Oregano flavonoids as lipid antioxidants. J. AOCS., **70** (5) : 483-487.

[13] **Pratt, D . E . & Miller, E. E.(1984).** A flavonoid antioxidant in spanish peanuts . J. AOCS., **61**(6) : 1064 – 1071.

[14] **Vancleve, J.F.; Salim, B. & Zavos, P.M.(1987)** .The effexy of Mitomycin-C on daily sperm production potential and other spermatogenic parameters in mice. Drug Chem. Toxicol., **10**:275-290.(Abstract on line).

[15]**Tajuddin ; Ahmed, S. ; Latif , A. & Qasmi, I. A.(2004).** Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behavior of normal male rats .J. BMC. Comp. Alt. Med., **4**:1-7.

[16]**Prifer, V.(1984).** Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. In : Advanced molecular genetics. Spring- er verlage, Berlin , Pp.26-37.

[17]**Tolliver, D. K. & Robbins, L. W. (1991).** Techniques in karyology: The bone marrow extraction method in tested studies for laboratory teaching. J.ABLE.,**12**:69-74 .

[18] **Steel, R.G.D. & Torrie, J.H.(1980).**Principles and Procedures of Statistics. 2^{nd} edn. Mc. Graw-Hill Book Co., Inc., New York, NY.

[19]**Tanko, Y. ;Mohammed, A. ;Okasha, M. A. ;Umar, A. H. & Magaji,R. A.(2008).**Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Syzygium aromaticum* flower bud in wister rats and mice. Afr. J. Trad. CAM, **5**(2): 209-212.

[20]**Jirovetz, L.(2010).** Medicinal value of clove. J. Herbication. www.herbication.com

[21]**Chaieb, K.; Hajlaoui, H. & Zmantar, T.(2007).**The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytother. Res., **21**(6):501-506.

[22]**Oya, T.; Osawa, T.; Kawakishi, S.(1997).** Spice constituents scavenging free radicals and inhibiting pentosidine formation in a model system. Biosci. Biotechnol. Biochem., **61**:263-266.

[23]**Cotran, R.S.; Kumar, V. & Collins, T. R.(2000)**. Pathologic basis of disease. 6th edn. Pennsylvania: Saunders.

[24]**Rock, C.L.; Jacob, R.A. & Bowen ,P.E.(1996).** Update on the biological characteristics of the antioxidant micronutrients vitamin C, vitamin E , and the carotenoids .J. Am. Diet Assoc.,**96**:693-702.

[25]**Lampe, J.W.(1999).** Health effects of vegetables and fruit : assessing mechanisms of action in human experimental studies. Amer. J. Clin. Nutr.,70(3):475-490.

[26]**Kang, Y.H.; Lee, K.A.; Ryu, C.J. & Lee, H.G. (2006).** Mitomycin C induces apoptosis via Fas/FasL dependent pathway and suppression of IL-18 in cervical carcinoma cells. Cancer Lett., **237**: 33-44.

[27]**Kuroda, y. ; Jain, A. ; Tezuka, H. & Kada, T. (1992).** Antimutagenecity in cultured mammalian cells. Mut. Res., **267** : 201-209.

[28]**Alonso, A.; J.orge,L.F.; Angel, S. & Montserrat, L.(2010).**Antimutagenic effect of *Phllanthus orbicularis* against γ-radiation. Lat. Am. J. Pharm. ,29:148-152.

[29]**Kada, T. ; Inoue, T. ; ohta, T. & Shiraus, Y. (1985).** Antimutagens and their modes of action. In : Shankel, D. M. ; Hartman. P. , Antimutagenesis and Anticarcinogenesis mechanisms. Basic Life Sciences, Plenum, New York, (39) : 181-196.

[30]**Pooder, S.; Chattopadhyay, A. & Bhattacharya, S.(2008).***In vivo* suppression fluoride of chromosomes aberration induced by mitomycin–C in mouse bone marrow cells . J. Fluoride . Res ., **41** (1): 40-43 .

[31]**Warren, A. J. ;Maccubbin, A. E. & Hamilton, J. W.(1998).**Detection of Mitomycin-C DNA adducts *In vitro* by P^{33}-postlabelling : Time course for formation and removal of adduct and biochemical modulation .Cancer Res., **58**: 453-461.

[32]**Travis, E. L. (1995).** Primer of medical radiobiology. Year Book Medical Puplisher. U.S.A.

[33]**Kuroda, Y. & Hara, Y. (1999).** Antimutagenecity of tea polyphenols. Mut. Res., **436**:69-97.

[34]**Bronzetti, G.(1997).** The role of antimutagenesis and anticarcinogenesis. J. Environ. Patho. Toxicol. Oncol., **16**: 259-262.

[35]**الطائي، شذى علي شفيق. (2005).**تأثير فلافونيدات بعض الانواع النباتية في الفعل التطفيري لعقار الميثوتركسين (MTX) وسم افلاB1 .اطروحة دكتوراة ، كلية العلوم، الجامعة المستنصرية.

[36]**Elves, M. W. & Wikinson , J. F. (1962).** Nature. 194: 1257. Egner, P. A. ; Wang , J. B. ;Zhu, Y. R.; Zhang, B.Ch.; Zhang, Q. N. ;Qian, G. S. ; Yuan-Kuar, Sh. ;Gange, S.J. and Jacobson, L.P. (2001). Chlorophyllin intervention reduces Aflatoxin-DNA adduct in individuals at high risk for liver cancer. Sci., **98**(25):14601-14606.

[37]**Abou-Tarboush, F. M. ; El-Ashmaoui, H. M. & Dafter Dar, M.Y.(1999).** Cytogenetic effects of Mitomycin – C on fetal and adult mouse cells *In vivo* . J. Egyp. Med. Sci., **20** (2) : 463-474.

[38]**Natrajan, A.T. & Raposa, T.(1975).** Heterochromatin and chromosome aberrations: A comparative study of three mouse cell lines with karyotype and heterochromatin distribution. Heredita, **80**:83-90.

[39]**Umnova, N.; Michrina, T.; Smirnova, N.; Aleksandrova, T. & Proshenko, G. (1991).** Study of antimutagenic properties of bio-ginseng in mammalian cells *In vitro* and *In vivo* Bull .J. Eksp. Biol. Med., **111** (5) : 507-509.

[40]**Nakamura, T.; Nakazawa, T.; Onizuka, S.; Satoh, S.;Chiba, A.; Sekihashi, K.; Miura, A.;Yasugahira, N. & Sasaki, Y.(1997).**Antimutagenecity of tochu tea (anaqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves). Mut. Res., **388**(1):7-20.