------ مجلة علوم الرافدين، المجلد 17، العدد 2، ص61-78، 2006 ------

تثبيط الاثر السمي الوراثي للعقارين Cyclophosphamide (CP) و Methotrexate (MTX) باستخدام ثمار الهيل

اسماعيل كاظم شبر *مركز الاشعاع الحياتي*
وزارة العلوم والتكنولوجيا

مفيد فائد حسن *كلية العلوم*
جامعة بابل

سعد جابر تاج الدين

(تاريخ الاستلام 2002/7/6 ، تاريخ القبول 2003/3/10)

الملخص

هدف البحث الى دراسة التأثيرات السمية والتطفيرية لثمار الهيل وكذلك دراسة الدور التثبيطي لتلك الثمار اتجاه التأثيرات السمية والتطفيرية لنوعين من العقارات هما (CP) Cyclophosphamide و Methotrexate (MTX) واللذان يختلفان في الية تأثيرهما على احداث التلف في المادة الوراثية DNA وحدوث الطفرة. لغرض الوصول الى هذا الهدف تم تحويل تلك الثمار الى مستخلصين احدهما مائي والاخر كحولي وتمت دراسة السمية من خلال استخدام اربع جرع متدرجة التركيز وذلك لغرض انتخاب جرعة واحدة مثالية تخلو من التأثيرات الجانبية ولكلا المستخلصين. اجرت عملية التداخل بين العقارين والجرعة المثالية من المستخلصين وبهيئة معاملتين (استخدام المستخلصين قبل وبعد العقارين كلاً على انفراد).

استخدمت الفئران البيض المختبرية نوع (Balb/c)، واعتمدت الاختبارات قصيرة الامد ممثلة بأختبار معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية والزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس الحيامن، وتوصل البحث الى اهم النتائج الاتية:

1. انعدام التأثيرات السمية والتطفيرية لمستخلصي ثمار الهيل وبالجرعة50 ملغم/كغم، كما اظهرت هذه الجرعة تأثيراً مثبطاً للتردد التلقائي كالزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة، بينما اظهرت الجرعة 155ملغم/كغم تأثيرات سمية من خلال خفض معامل الانقسام الخيطي للخلايا الجنسية وخلايا نقي العظم.
2. ابرزت النتائج ان العقارين يمتلكان تأثيرات سمية ووراثية في الفأر المختبري اذا ما اعطيا بجرع مختلفة بضمنها الجرعة العلاجية.
3. كما اوضحت النتائج ان الجرعة المثلى من المستخلصين تمتلك كفاءة عالية في رفع معامل انقسام خلايا نقي العظم والخلايا الجنسية وخفض نسبة الزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس نطف الفأر والمستحثة بتأثير العقارين، وقد اظهر المستخلص الكحولي اكثر كفاءة من المستخلص المائي اما على صعيد المعاملة فقد اظهرت المعاملة الاولى (قبل العقار) اكثر كفاءة من المعاملة الثانية ولكلا المستخلصين.

Suppression of Genotoxic Effects of Cyclophosphamide (CP) and Methotrexate (MTX) in Mice by Cardamom (Elelteria cardamomum) Fruits Extracts

Esmaeel K. Shubber *Radiobiology Center* *Ministry of Science &Technology*

Mofeed K. Hasan **Saad J.Taj-Al-Deen** *College of Sciences* *Babylon University*

ABSTRACT

The present study aimed at investigating the inhibitory effect of cardamom (Elelteria cardamomum) towards the genotoxic effects of two drugs; Cyclophsphamide (CP) and Methotrexate (MTX) in mice. Four cytogenetic parameters were employed to achieve the aim. Those were mitotic index of bone marrow and germ cells, chromosomal aberrations, micronuclei test and sperm head abnormality assay.

Cardamomum fruits were subjected to extraction with two solvents, water and ethanol. From each extracts, four gradually increased doses were evaluated for their toxicity. Doses from plant extracts with no toxic effect was chosen for drug-plant extract interaction was employed in (Balb/c mice). Genotoxicity of CP and MTX were also tested in mice.

Cadamomum extracts showed no toxic effects at doses up to 50 mg/kg which were pictured by cell divisions of bone marrow and germ cells. While both drugs CP and MTX exert genotoxic effects at 100 and 3.25 mg/kg respectively. These plant and drug doses were applied for plant drug, and drug–plant interaction studies.

The result revealed that the aqueous and alcoholic extracts of cardamomum exhibit a good protective activity. This was depicted by increasing the mitotic activity and reducing the chromosomal aberration, micronucleus, and sperm head abnormality-frequencies. The alcoholic extract was more potent in protection activity compared to equalize extract specially when it was proceeding the drug treatment.

المقدمة

تعتبر الفحوص الخلوية الوراثية مثل الانقسام الخلوي (Mitotic Index MI) والزيغ الكروموسومي (Chromosomal Aberration CA) وفحص النواة الصغيرة(Micronuclei Test, MN) من الاختبارات المستخدمة في الكشف عن التأثيرات الوراثية السمية للكثير من المطفرات المسرطنات الفيزيائية والكيميائية البيئة وهي معتمدة من قبل المنظمة العالمية للمطفرات والمسرطنات البيئية (Kliesch et al., 1982) حيث تشير الدراسات التي أجريت في هذا المجال إلى أن التأثير السمي للمطفرات المسرطنة فيظهر جلياً على النشاط التكاثري للخلايا السريعة الانقسام الجسمية منها نقل نقي العظم أو الجنسية منها خلايا الخصيتين (Shubber, 1981). أما استحثاث الزيغ الكروموسومي فهو المعبر عن الطفرة الكروموسومي التي تغير في التركيبة للكائن الحي نتيجة تعرضه للملوثات البيئية المسرطنة ولها علاقة مباشرة مع نشوء حالات عديدة من السرطان من جهة أخرى، تظهر النوى الصغيرة على شكل كتل

كروماتيدية مجتمعة في الخلايا الجسمية إذا تعرض الحيوان أو الإنسان إلـى مـادة مطفـرة (Schmid, 1975)وهي تعكس مستوى التلف الوراثي الـذي ينـتج فـي الجهـاز المولـد العـام (Jagetia 1990 Hemopoietic System) إذا طبقت على خلايا الدم اللمفاوية أو خلايا نخاع العظم.

يتبع نبات الهيل العائلة الزانجبارية (Zingeberaceae) ويوجد هذا النبات بشكل طبيعي في الهند وسيرلانكا كما انه يزرع بشكل واسع في الجنوب الشرقي من قارة اسيا، ويعد هذا النبات من التوابل واسعة الاستخدام، ومتعددة الاغراض اذ يستخدم بوصفه من مطيبات الغذاء، ويطلق عليه ملك التوابل، كما انه يدخل في صناعة العطور، اما الاستخدامات الطبية لهذه الثمار فقد استخدمت بدرجة كبيرة لشفاء المعدة فضلاً عن استخدامها بوصفها مسهلاً (Chong, 1995) وفي دراسة اجراها الباحث (Uragoda, 1992)على العاملين المتعرضين لغبار التوابل في موانيء التصدير، توصلت الدراسة الى ان الهيل هو التابل الوحيد الذي لا يسبب أي تأثيرات ضارة، اما الدراسات التي تناولت دور الزيوت الطيارة المستخلصة من بعض التوابل فقد اوضحت دراسة EL-Kady وجماعته(1994) ان زيوت كل من الزعتر والقرفة والهيل ذات كفاءة عالية ضد جميع انواع البكتريا وذات كفاءة عالية ضد ثماني سلالات لانواع مختلفة من الفطريات التي تصيب الجلد. كما درس تأثير الزيوت الاساسية الموجودة بشكل طبيعي في ثمار الهيل على فعالية انزيمات الكبد الخاصة بتأيض المسرطنات على سبيل المثال Cytochromp450 (Cyt. P450) و Arylhydrocarbon Hydrosylose (AHH) و مستوى السلفايديل الذائب في الحامض Glutathions-Tranferase (GST) ومستوى الحمض الذائب Acid-Soluble Sulfhydryl (SH) وقد بحثت في الفئران السويسرية البيضاء اذا اطعمت زيت الهيل وبجرعة (15) ميكروليتر ولمدة (14) يوماً تم قتل الحيوانات، وقدرت فعالية الانزيمات المشار اليها وقد توصلت الدراسة الى ان زيت الهيل يقلل من فعالية انزيمات (Cyt. P450) و (AHH) وبشكل معنوي اما (GST) فقد ارتفعت فعاليته علاوة على ذلك فقد ادى زيت الهيل الى زيادة فعالية الحمض الذائب (SH) وبشكل معنوي، وهذه النتائج توضح ان زيت الهيل يزيد من فعالية الانزيمات المساعدة في ازالة سمية المركبات الغريبة Xenobiotic التي تتضمن المسرطنات ، والمطفرات الكيميائية، كما انه يثبط فعالية الانزيمات التي تحول المطفرات الاولية الى مطفرات فعاله جداً (Banerjee et al., 1994).

وفي السياق نفسه اجرى الباحث Abraham وجماعته (1998) دراسة عن فعالية المستخلص المائي للهيل يوصفه مضاداً للسمية الوراثية والانزيمية في الفئران المختبرية، وذلك عند تجريعها بمادة اليوراثين المطفرة، وقد اظهرت اختبارات السمية الوراثية بأستخدام اختبار النوى الصغيرة ان التاثير المضاد للسمية له علاقة بزيادة جرعة المستخلص، اما على صعيد الدراسة الانزيمية فقد لاحظ ان المستخلص يثبط تأثير اليوراثين من زيادة نشاط انزيم (GST) مقارنة مع الفئران المعاملة باليوراثين فقط.

يمتلك العقارين CP و MTX تأثيرات سمية وراثية و قابلية على استحثاث الزيغ الكروموسومي في خلايا الحيوان و الانسان (Nombela and Murice, 1972 ؛ Shubber, 1981 ؛ Crook et al ., 1986 ؛ Shubber et al., 1999 ؛ Jaffer et al., 2001).

قد يعزى سبب التأثيرات السمية والتطفيرية للعقارين CP و MTX الى مقدرتهما عن التداخل مع المادة الوراثية واذ يعد العقار (CP) عامل الكيل Alkylating Agent يودي الى منع انقسام الخلايا من خلال احداث ترابط في نفس شريط الـ DNA او بين شريطين مختلفين (Crook et al., 1986) ويمكن مشاهدة الكسور الكروموسومية عند اجراء التحليلات الخلوية او ربما تتحول هذه الكسور الى نوى صغيرة تلاحظ داخل سايتوبلازم الخلايا الجديدة الناتجة عن عملية الانقسام (Murcia, ؛ Schmid, 1975 Maskaleris et al., ؛ Kasahara et al., 1992 ؛ Wyrobek et al., 1983؛ Nombela and 1972 1998).

اما فيما يتعلق بتأثير الـ MTX فانه يؤدي نقص في انزيم(Dihdrofolate Reductase (DHFR المفتاح الرئيسي في عملية نمو وانقسام الخلايا (Huennekens, 1994) كما انه يؤدي الى منع عملية الاصلاح في جزيئة الـDNA زيادة على ذلك يؤدي الى حدوث تغير في جزيئة الـ DNA (Borchers et al., 1990).

اما فيما يخص تأثير العقارين على الخلايا المولدة للحيامن وانتاج نطف مشوهة نتيجة تأثير العقارين على احداث طفرة في الجينات التي تشفر الى توليد النطفة مما يؤدي الى انتاج نطف غير طبيعية وقد تنتج هذه التشوهات بوساطة الاحداث اللابنوية Epigenetic من خلال تأثير العقارين على التفاعلات الانزيمية والهرمونية (Quninto et al., 1989).

فقد اختصت هذه الدراسة في الكشف عن قابلية مستخلصات ثمار الهيل في كبح التأثيرات الـسمية الوراثية لهذين العقارين نظراً لاستخدامهما الواسع في معالجة الامراض السرطانية.

المواد وطرائق العمل

استخدم عقاري Cyclophosphamide (CP) من انتاج شركة Asta Pharma (Germany) وعقار Methotrexate (MTX) شركة Osaka (Japan) وذلك لامتلاك هذين العقارين تأثيرات تطفيرية (Jafar et al., 2000 ؛ Shubber et al., 1999).

الحيوانات المستخدمة في هذا البحث هي ذكور الفئران البيضاء وبأعمار تتراوح بين (8-12) اسبوعاً وبوزن 20-30غم، قسمت هذه الفئران الى مجاميع رئيسية وفرعية وحسب متطلبات كل تجربة وكما هو موضح لاحقاً.

اما بالنسبة لثمار الهيل فقد تم تأمينها من الاسواق المحلية في بغداد وثبتت تصنيفياً من قبل المعشب الوطني في وزارة الزراعة. وتم تحضير مستخلصين احدهما مائي من خلال استخدام طريقة Zheng-Mu وجماعته (1990)، اما في حالة تحضير المستخلص الكحولي فقد اعتمدت طريقة Harborne (1984).

وفيما يتعلق بأختبارات التحليلات الوراثية الخلوية فقد استخدمت طريقة Allen وجماعته (1977) وطريقة Evans وجماعته (1964) لتحضير كروموسومات خلايا نقي العظم والخلايا الجنسية وحسب الطريقتين المذكورتين على التوالي. اما بالنسبة لحساب معامل الانقسام الخيطي Mitotic Index (MT) فقد تم حسابه من خلال استخدام الشرائح المحضرة بالطريقتين السابقتين ومن خلال تطبيق المعادلة الاتية:

$$\frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{1000 خلية منقسمة و غير منقسمة}}$$

(Shubber et al., 1981)

وبينما استخدمت طريقة Worobex و Bruce (1975) في استخراج النطف وحساب التشوهات في رؤوسها، كما استخدمت طريقة Schmid (1975) لحساب النوى الصغيرة .

التحليلات الاحصائية : استخدم البرنامج الاحصائي الجاهز Statistical Package For Social Sciences (Spss)، اذ تم تطبيق تحليل التباين الاحادي ومن ثم المقارنات المتعددة وتحديداً اختبار اقل فرق معنوي Least Significant Difference (L.S.D) بين قيم معدلات المعاملات وعند مستوى دلالة 5% .

دراسة تأثير المستخلصين المائي والكحولي لثمار الهيل على الفأر المختبري

استخدمت أربع جرع تدريجية من كل من المستخلص المائي أو الكحولي وهي 12.5 ، 25 ، 50 ، 100 ملغم/كلغم (مع العلم أن الجرعة الأولى هي متوسط المستخلص الذي قدّر عن طريق الاستفتاء، أما الجرع الباقية فهي مضاعفة للجرعة الأولى). تمت تهيئة 30 فأراً من الذكور وبعمر 8-12 أسبوع ، وقسمت إلى مجموعتين ولمواقع ذا فأر لكل مجموعة وابتعت معاملتين وكما يأتي :

أ- **المعاملة الأولى** : قسمت الفئران إلى خمسة مجاميع، عوملت مجموعة السيطرة السالبة بمحلول PBS لمدة 6 أيام وشرحت في اليوم السابع. أما المجاميع الأربعة الأولى فقط لغرض التحليلات الخلوية الوراثية.

ب- **أما المعاملة الثانية** : فقد أجريت على 15 فأراً بواقع خمس مجاميع أيضا وعوملت مجموعة السيطرة السالبة لمدة 6 أيام بمحلول المطفرات المسرطنات PBS ثم شرحت في اليوم السابع، أما مجاميع التجربة فقد جرعت في اليوم الأول بمحلول المطفرات المسرطنات PBS ومن ثم بمحلول المستخلص في اليوم الثاني حتى اليوم السادس ثم شرحت في اليوم السابع لغرض التحليلات الخلوية الوراثية.

تحديد الجرعة والوقت الامثلين للفعل التطفيري CP والـ MTX

تم انتخاب ثلاث جرع من كل عقار تمثل إحداها الجرعة العلاجية، أما الجرعة الأولى هي الاوطـأ والثالثة هي الأعلى (Shubber, 1981)، وتمت المقارنة بين تأثيرات الجرع المنتخبـة علـى اختبـارات الانقسام الخلوي، والزيغ الكروموسومي والنواة الصغيرة، وفي فترات مختلفة 1 ، 2 ، 3 ، 4 ، 5 ، 6 يوم وقد حدد التركيز الأمثل والزمن الواحد لكل عقار هو الذي يعطي أعلى معدل للتغيـر الـوراثي وكانـت الجرع العقارية هي 4 ، 20 ، 100 ملغم/كلغم لعقار الCP و3.25 ملغم/كلغم لعقار الMTX وكان الزمن الامثل لظهور تأثير عقار CP هو 24-72 ساعة.

التداخل بين مستخلصي ثمار الهيل والعقارين CP و MTX في التأثير على المـادة الوراثيـة للفـأر المختبري

استخدمت جرعة واحدة من كل عقار وهي 100 ملغم/كلغم CP و3.25 ملغم/كلغم من MTX . مع جرعة واحدة من المستخلص الكحولي والمائي وهي 50 ملغم/كلغم . وكانت المعاملة كما يأتي :

المعاملة الاولى (المستخلص + العقار):

I- عقار الـ CP:

هيئ 20 فأراً بواقع اربع مجاميع:

1- السيطرة السالبة، جرعت محلول PBS لمدة ثلاث ايام ثم شرحت في اليوم الرابع،

2- مجموعة السيطرة الموجبة: جرعت بمحلول الـ PBS لمدة يومين و بجرعة من العقار فـي اليـوم الثالث و شرحت في اليوم الرابع.

3- مجموعة المستخلص: اعطيت المستخلص في اليوم الاول و الثاني و تبعها محلول PBS في اليـوم الثالث و شرحت في اليوم الرابع.

4- مجموعة التداخل: اعطيت المستخلص في اليوم الاول و الثاني و العقار في اليوم الثالث و شرحت في اليوم الرابع.

II- عقار الـ MTX:

اجريت الخطوات ذاتها كما في عقار الـ CP في غذائها اعطيت العقار في اليوم الخامس و شرحت الحيوانات في اليوم السادس و ليس الرابع، حيث يختلف العقاران بفترة التأثير للوصول لمقدار واحـد او متشابه من التأثير.

المعاملة الثانية (العقار + المستخلص):

اتبعت الطريقة ذاتها كما في المعاملة الاولى، ما عدا كان اعطاء العقار يسبق اعطـاء المـستخلص بيوم واحد في حالة عقار CP ثم بعدها المستخلص لمدة يومين متتاليين، و التشريح في اليوم الرابع. امـا

عقار الـ MTX فقد اعطي في اليوم الاول، ثم المستخلص في اليوم الثاني والثالث و محلول الـ PBS في اليوم الرابع و الخامس و شرحت في اليوم السادس.

ولغرض دراسة تأثير التداخل بين المستخلصين و العقارين على اختبـار التـشوهات فـي رؤوس النطف بعد 35 يوماً هيئت مجموعة اخرى من الفئران و عوملت بنفس الطريقين و لكن شرحت بعـد 35 يوماً.

النتائج

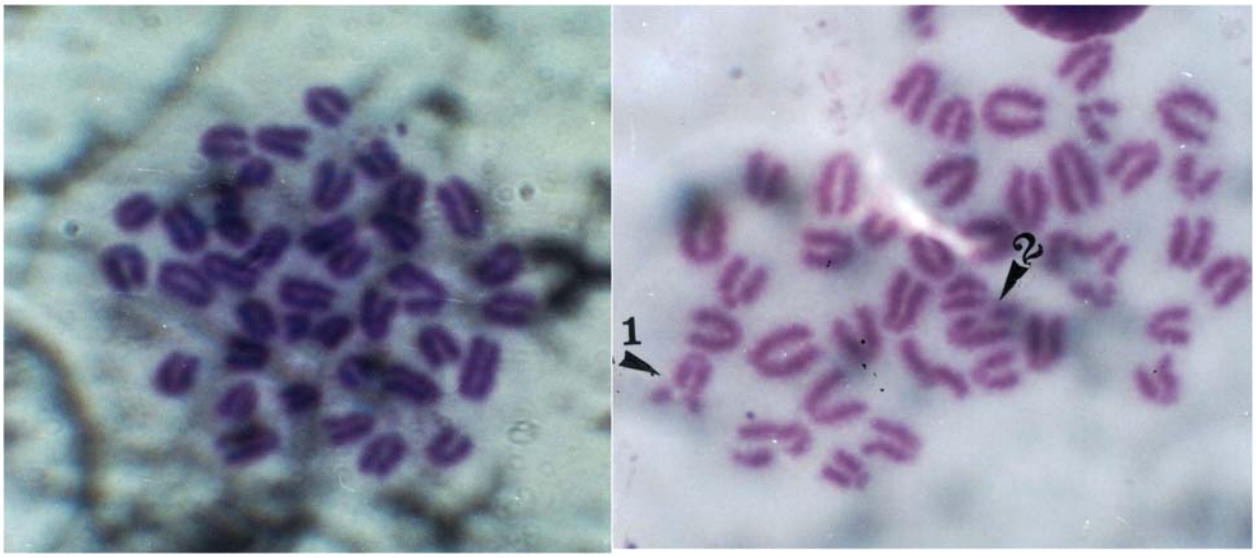
1. الاختبارات السميه والتطفيريه لمستخلص ثمار نبات الهيل المائي والكحولي :

تم انتخاب اربع جرعات بتراكيز (12.5 , 25 , 50 , 100)ملغم /كغم لكلا المستخلصين. الجـدير بالذكر ان الجرعة الاولى هي الجرعة المستخدمة من قبل الانسان والتي تم تحديدها بناءاً علـى اسـتفتاء شمل اكثر من 100 شخصاً من خلال الحياة اليومية بينما بقية الجرع هي زيادة تدريجية للجرعة الاولى، وقد اعتمد اختيار الجرعة المثلى بناء على نتائج معامل الانقسام الخيطي والزيغ الكروموسومي والنـوى الصغيرة فضلا"عن نسب التشوهات في رؤوس النطف لذكور الفئران وهذه النتائج موضحة بالجدول (1). فيما يتعلق باختيار معامل الانقسام اظهرت النتائج الموضحة بالجدول (1) ان مستخلص ثمار الهيل المائي والكحولي احدث انخفاضاً في نسب معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايـا الجنـسية وكـان الانخفاض مترافقاً مع زيادة تركيز الجرعة. تؤكد نتائج التحليل الاحصائي ان الانخفاض كـان ذا دلالـة معنوية وعند مستوى دلالة (أ<0.05) للجرعة (100) ملغم/ كغم وذلك عند المقارنة مع السيطرة الـسالبة غير المعاملة.

اما بالنسبة للزيغ الكروموسومي (شكل 1) وهو اجمالي (الكسور الكروماتيدية و الكروموسـومية والفجوة و قسماً من الشضايا الكروموسومية) والنوى الصغيرة، اظهرت نتائج المعاملـة بالمستخلـصين وبالجرع المشار اليها أنها لم تستحث الزيغ الكروموسومي ولا النوى الصغيرة بل العكس فقد اظهرت تلك الجرع مقدرة في خفض التردد التلقائي لهما وقد اكثرت نتائج التحليل الاحصائي ان التثبيط كان معنويـاً عند الجرعة (50) ملغم/كغم وللمستخلص الكحولي فقط بينما كان الانخفاض غير ذي دلالة معنوية بالنسبة للمستخلص المائي.

2. تحديد الجرعة والزمن الامثلين للفعل التطفيري والسمي للعقارين CP و MTX

اعتمدت الجرع و الزمن الاقلين التي توصل اليها حـسن (2002) و كانـت هـذه (الجـرع(100 ملغم/كغم لعقار CP و 3.25 ملغم/ كغم لعقار MTX و الزمن (24 و 72) ساعة للـ CP و MTX على التوالي، علما بان هذه الجرع والازمان اختيرت على اساس ظهور اعلى مستوى من التأثيرات التطفيرية للعقارين.



الشكل 1 : الزيغ الكروموسومي في خلايا نقي العظم X 1000
1. الكسور الكروموسومية 2. الكسور الكروماتيدية

3. **التداخل بين المستخلص المائي والكحولي لثمار الهيل وعقاري MTX , CP.**

بشكل عام اظهرت نتائج هذه الاختبارات ان العقارين MTX ,CP خفضا النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية وقد اكدت نتائج التحليل الاحصائي ان الانخفاض كان ذا دلالة معنوية عند المقارنة مع عينة السيطرة السالبة. وعند اجراء التداخل بين المستخلصين (المائي والكحولي) وعقاري MTX ,CP وبهيئة معاملتين (الاولى والثانية) اظهرت النتائج الموضحة بالجدولين السابقين ان المعاملة الاولى ادت الى زيادة نسب معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية وبشكل معنوي عند المقارنة مع السيطرة الموجبة المعاملة بالعقار فقط اما المعاملة الثانية فان الزيادة في معامل انقسام خلايا نقي العظم كانت ذات دلالة معنوية عند المعاملة بـ MTX اما بالنسبة للخلايا الجنسية فان التنشيط كان ذا دلالة معنوية عند المعاملة الاولى فقط ولكلا المستخلصين .

كما ان العقارين استحث الزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة في خلايا نقي العظم وبشكل معنوي عند المقارنة مع عينة السيطرة غير المعاملة.

وعند اجراء التداخل بين العقار CP والمستخلصين وبهيئة معاملتين اظهرت النتائج ان المستخلصين اظهرا كفاءة عالية في خفض نسب الزيغ الكروموسومي ومعدل النوى الصغيرة المستحثة بالعقار وبشكل معنوي عند المقارنة مع السيطرة الموجبة.

اما عند التداخل بين العقار MTX والمستخلصين فأن المستخلص المائي لم يؤدي الى خفض الكسور الكروموسومية، بينما استطاع المستخلص الكحولي من ذلك وبدرجة معنوية عند المعاملة الاولى فقط، بينما كانت نسبة الانخفاض ذات دلالة معنوية بالنسبة للكسور الكروماتيدية التي يحدثها العقار ولكلتا

المعاملتين الاولى والثانية. كما يلاحظ من النتائج ان المستخلصين المائي والكحولي خفضا نسب النوى الصغيرة المستحثة بالعقار وبشكل معنوي ولكلتا المعاملتين.

فيما يخص اختيار التشوهات في رؤوس النطف وهي (ذات رأسين، ذو رأس دائري، ذو ذيلين، رأس أصبعي ونطفة فاقدة للكلاب) فقد اظهرت النتائج الموضحة بالجدولين (2, 3) ان العقارين استحثا التشوهات في رؤوس النطف وذلك بعد خمسة اسابيع من المعاملة وقد اكدت نتائج التحليل الاحصائي ان الزيادة كانت ذات دلالة معنوية بالمقارنة مع السيطرة السالبة غير المعاملة وعند اجراء التداخل بين المستخلصين والعقارين اظهرت النتائج ان المستخلصين خفضا نسبة التشوهات التي يحدثها عقار CP وفي كلا المعاملتين الاولى والثانية بينما كان التثبيط معنوياً عند المعاملة الاولى فقط بالنسبة لتأثير العقار MTX.

أن الالية التي تعترض بها المثبطات (المستخلص) عملية التطفير من خلال اجراء معاملتين الاولى (اعطاء المستخلص قبل العقار) قد تعمل بوصفها مثبطات من النوع المباشر اذ تعترض تأثيرات المطفرات والمسرطنات بالالية الاتية :

1- منع تنشيط المطفر البدائي الى مطفر نشط .

2- زيادة فعالية الانزيمات المزيدة للسمية مثل Gst و Sod .

3- تكون المثبطات مع المطفرات معقداً يمنع الخلية من اخذه (Shanked et al., 1993) او ربما تتفاعل المادة المعتادة مع المواقع المستهدفة من قبل المطفر من خلال عملها بوصفها مادة غالقة تمنع المطفر من الوصول الى المواقع المستهدفة في الدنا او التفاعل معها مما يؤدي الى منع تأثير المطفر (Wattenberg, 1985) .

اما المثبطات التي تكون فعالة بعد اعطاء المطفر فتسمى مثبطات حيوية - اذ تعمل على اصلاح التلف بعد حدوثه من خلال ثلاثة محاور رئيسية هي : زيادة الدقة في تضاعف الـ Dna وزيادة كفاءة انظمة الاصلاح عن طريق زيادة الاصلاح الخالي من الخطأ وتقليل من الاصلاح الميال للخطأ فضلاً عن تقوية الجهاز المناعي وحث الخلايا على التمايز . (Ramel and Deflora, 1988 ؛ Bronzstti, 1997).

المناقشة

يتضح من نتائج هذا البحث والموضحة في الجدول (1) ان المستخلصين المائي والكحولي لثمار الهيل قد احدثا تثبيطاً لمعامل الانقسام ولكلا النوعين من الخلايا وقد كان الانخفاض ذا علاقة بزيادة تركيز الجرعة ، اذ لوحظ ان الجرعة (100) ملغم /كغم آلت الى خفض معامل الانقسام الخيطي وبشكل معنوي الامر الذي قادنا الى ترك هذه الجرعة عند دراسة التداخل بين المستخلصين بوصفه مضاداً للفعل

التطفيري للعقارين، وربما يرجع السبب الى خفض معامل الانقسام الى ان المستخلصات تحتوي على مركبات كيمياوية ذات طبيعة سامة ولا سيما عند التراكيز العالية من خلال تاثيرها اما على عملية بلمرة خيوط المغزل الامر الذي يؤدي الى خفض نسبة هذه المعامل او ربما تؤثر تلك المركبات بشكل مباشر او غير مباشر على البروتينات المحفزة لعملية الانقسام (Shiraishi, 1987). اذ اشار الباحثان Sukumaran و Kuttan (1995) الى ان بعض البهارات ومنها الهيل تحتوي على المركب الكيمياوي اليوجانول Eugenol، وقد اكد Jeng وجماعتة (1994) ان لهذا المركب تاثيرات سامة على الخلايا مما يؤدي الى قتلها ولا سيما عند التراكيز العالية، اذ لاحظوا ان التركيزين 3 مول / لتر و4 مول / لتر يؤدي الى نقص في Atp ونقص في فعالية انزيم Gst المزيل للسمية اذا وصل الانخفاض الى 45% و 77% للتركيزين على التوالي وذلك بعد ساعة كاملة من خضهما معاً، وفي المقابل وجد ان التركيز الاقل (1 ملي مول/ لتر) من المركب نفسه يحمي المادة الوراثية للخلية من هجوم جذور الاوكسجين الحرة من خلال تثبيط فعالية الانزيم Xanthine Oxidase.

كما تشير نتائج الاختبارات الخلوية الوراثية المتعلقة بالكشف عن السمية الوراثية الى ان المستخلصات المائية والكحولية لثمار الهيل وبالجرعة (50) ملغم/كغم خالية من التاثيرات السمية الوراثية بل على العكس من ذلك فقد ادت الى خفض التردد االتلقائي للزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة في خلايا نقي العظم والتى قد تحدث نتيجة التغيرات الحيوية داخل الجسم او نتيجة وجود مطفر وراثي بيئي غير مكتشف (Shubber, 1981) وربما هذا يفسر ما شاهدناه في تجاربنا هذه من ارتفاع المستويات التلقائية للزيغ الكروموسومي في الفار، او فيما يتعلق بمقدرة المستخلصين على خفض التردد التلقائي للزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة (Mn , CA) فقد يرجع السبب في ذلك الى ان المستخلصات النباتية تحتوي على مركبات كيمياوية نباتية تعمل على زيادة فعاليات الانزيمات المزيلة للسمية مثل Superoxide Dismutase (Sod) ,Glutathion S-Transferase (Gst) اذ لاحظ الباحث Wang وجماعتة (1989) ان مستخلص الشاي يؤدي الى تثبيط الارتباط التساهمي بين معظم المسرطنات والـ Dna في النسيج الهدف فضلا عن ذلك ربما ان المستخلص يعمل على تحسين مكانة او فعالية المواد المضادة للاكسدة من خلال زيادة فعالية انزيم Sod او ربما يعمل المستخلص على تقليل فعالية انزيم (Ahh) الذي يعمل على تثبيط عمل المطفرات.

اما على مستوى اختيارات التشوهات في رؤوس النطف فقد اظهرت النتائج ان مستخلص ثمار الهيل لا تستحث زيادة نسب هذه التشوهات سؤاء اجري الاختبار بعد اسبوع من المعاملة او بعد خمس اسابيع من المعاملة. وقد يرجع السبب في ذلك الى ان هذين المستخلصين خاليين من التاثيرات التطفيرية، اذ اشارا Wyrober وBruce (1975) الى ان المواد المطفرة تؤدي الى احداث التشوهات في رؤوس النطف. في حين لم تستحث المواد الكيمياوية غير المطفرة مثل هذه التشوهات اذ يعد هذا الاختبار حساساً للكشف عن المواد المطفرة 100%، كما تؤكد الاختبارات المستخدمة في قياس السمية الوراثية فعالية

المستخلص الكحولي في خفض الزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة بالموازنة مع نظيرة المائي، وربما يرجع السبب في ذلك الى ان المستخلصات الكحولية تحتوي على المركبات الموجودة في المستخلص المائي باعتبار ان الكحول المستخدم في عملية الاستخلاص كافي تركيزة (70%) . فضلا عن ذلك فان قدرة الكحول على استخلاص المواد الذائبة بالماء ولا سيما الاصباغ والفيتامينات والزيوت الطيارة والتى لايمكن استخلاصها بالماء والتى تعزى اليها معظم التاثيرات العلاجية المضادة للطفير. وتأكيداً لما ذكر اظهرت نتائج الكشف العام عن المركبات الفعالة ان المستخلص الكحولي لثمار الهيل يحتوي على الكومارينات والراتنجات في حين لا توجد في المستخلص المائي للنبات نفسه (حسن، 2002)، وتؤكد البحوث السابقة ان الكومارينات لها قدرة كبيرة في ازالة التأثيرات الرسمية والتطفيرية للاشعة فوق البنفسجية وبعض المركبات الكيميائية (Ohta et al., 1983).

التداخل بين المستخلصات المائية والكحولية وعقار CP :

اظهرت النتائج الموضحة في الجدول (2) ان المستخلصات الكحولية والمائية لثمار الهيل تمتلك فعالية لتأثيرات العقار (CP) وهذه الفعالية اختلفت بأختلاف نوع المستخلص ونوعية المعاملة اثناء اجراء الاختبارات المستخدمة في الدراسة، فيما يخص معامل الانقسام الخيطي اظهر المستخلصين وبالجرعة المثلى (50) ملغم/كغم كفاءة عالية في رفع معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية والمثبط انقسامهما بفعل العقار- وان الفروقات كانت ذا دلالة معنوية عند المعاملة الاولى وذلك عند المقابلة بالسيطرة الموجبة المعاملة بالعقار فقط، وربما يرجع السبب في ذلك ان المستخلصين يتحدان مع العقار او مركباته الفعالة مكونة معقدات تؤدي الى رفع امتصاصها من القناة الهضمية (Negishi, 1994) او ربما ان المستخلصات قد عملت على منع تثبيط انزيمات Cyto P450 او لربما تمنع تنشيط المجاميع الفعالة المحبة للالكترونات في المطفر او لربما تثبط عملية التنشيط التأيضي للمطفر (Zhang et al., 1989).

اما المعاملة الثانية فقد اظهرت نتائج التحليل الاحصائي ان الفروق كانت غير ذي دلالة معنوية بالمقارنة بسيطرتها الموجبة وذلك بسبب عملية الاصلاح فضلاً عن قدرة الكائن الحي على التخلص من المركبات السامة بعملية الاخراج (King et al., 1982). الجدير بالذكر ان الزمن المثالي لاظهارتأثير هذا العقار هو (24) ساعة وبعد ذلك يبدأ بالتناقص.

اما الاختبارات الخاصة بالزيغ الكروموسومي والنوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس النطف فقد اظهر مستخلصا ثمار الهيل كفاءة عالية الا ان فعالية المستخلصين التثبطية اتجاه خفض التشوهات في رؤوس النطف كان واضحاً بعد (35) يوماً من المعاملة وفي كلتا المعاملتين الاولى والثانية، وهذا يعني ان التأثيرات الواقية لهذين المستخلصين تكون على الخلايا الجذعية الجنسية Spermatogonia التي هي مصدر للنطف (Natarajan and Tates, 1976).

التداخل بين المستخلصين المائي والكحولي وعقار MTX :

اوضحت النتائج الموضحة بالجدول (3) ان المستخلصات النباتية اظهرت كفـاءة مـضادة لتـأثير العقار، فيما يتعلق بأختبار معامل انقسام الخطي اظهرت نتائج المعاملة الاولى كفاءة المستخلصين المـائي والكحولي في رفع معامل الانقسام لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية وبـشكل معنـوي عنـد مقارنتهـا للسيطرة الموجبة وقد يرجع السبب الى مقدرة المستخلصين على منع تأثيرات العقارين من خـلال منـع الخلية من امتصاصه او من خلال عملها بوصفها مواد مضادة للاكسدة او من خلال عملها كمواد غالقـة Blocking Agents بينما اظهرت المعاملة الثانية بالمستخلصين نفسيهما تأثيرات مختلفة اختلفت باختلاف نوعية الخلية اذ كانت كفاءة المستخلصين ذات دلالة معنوية بالنسبة لخلايا نقي العظم وربما يرجع السبب في ذلك ان انظمة الاصلاح في هذه الخلايا ذات كفاءة عالية بينما كانت كفاءة المستخلصين بالنسبة للخلايا الجنسية غير ذي دلالة معنوية وربما يرجع الى ان الخلايا الجنسية ذات حساسية عالية لهذا النـوع مـن العقاقير مما يؤدي الى تأثيرها بدرجة كبيرة مما يتطلب الى وقت اطول لكي تحث عمليـة الاصـلاح، او لربما ان وصول المادة المضادة الى خلايا الخصية تحتاج الى وقت اطول نتيجة وجود الحواجز الخلويـة (Siou, 1981).

في أختبار الزيغ الكروموسومي فقد اظهر مستخلص الهيل كفاءة منخفضة لم تصل الـى مـستوى الدلالة المعنوية في خفض الكسور الكروموسومية والكروماتيدية المستحثة بفعل عقار MTX بينما كانـت ذات كفاءة معنوية في خفض الكسور التي يحدثها العقار (CP) وقد يعزى سبب الاختلاف الى ان التفاعل بين مكونات المستخلصين والمطفرات تكون مختلفة (Edeuhardal et al., 1998). او قد يرجع السبب في ذلك الى اختلاف قدرة العقارين (MTX , CP) على التنافس مع المركبات المضادة في المستخلصين على مواقع في الدنا .

اما اختبار النوى الصغيرة فقد اظهر المستخلصين المائي والكحولي كفاءة في خفض تـردد النـوى الصغيرة وبشكل معنوي بالمقابلة مع سيطرتها الموجبة ولكلتـا المعـاملتين وهـذه النتيجـة تقتـرح ان المستخلصين يمتلكان قدرة على اختزال التلف في الدنا وزيادة بناءه (Tseng et al., 1992) .

لقد اظهر المستخلصان في اختبار التشوهات في رؤوس النطف كفاءة عاليـة فـي خفـض تلـك التشوهات وكان ذات دلالة معنوية عند المعاملة الاولى فقط وبعد الاسبوع الخامس من المعاملة وهذا يؤكد ان مستخلص ثمار الهيل عمل في هذا الاختبار مضاد بأتجاه تأثير عقار MTX من النوع المباشـر فقـط Desmutagens على الخلايا الجنسية المولدة.

الجدول 1 : تأثير الجرع المختلفة من مستخلصي ثمار الهيل المائي والكحولي .

نوع الاختبار والفترة الزمنية	تراكيز الجرع ملغم/كغم	المستخلص المائي		المستخلص الكحولي	
		الاولى	الثانية	الاولى	الثانية
معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم (MI%)	0	0.12±14.65	0.08±14.85	0.49±14.56	±14.89 0.50
	12.5	0.29±14.37	0.16±14.57	0.22±14.73	±14.87 0.23
	25	0.18±14.33	0.29±14.53	0.06±14.00	±14.00 0.27
	50	0.29±14.23	0.15±14.40	0.19±13.97	±13.83 0.34
	100	*0.23±13.13	*0.30±13.33	*0.15±12.50	±12.97 *0.09
معامل الانقسام الخيطي للخلايا الجنسية (MI%)	0	0.36±20.21	0.27±20.31	0.08±20.25	±20.22 0.24
	12.5	0.91±20.60	0.78±20.29	0.05±19.97	±20.07 0.07
	25	0.30±20.17	0.81±20.07	0.32±19.63	±19.72 0.10
	50	0.29±19.97	0.51±19.50	0.85±18.40	±18.76 0.61
	100	*0.41±18.67	*0.42±18.41	*0.17±17.16	±17.60 *0.23
نسبة الكسور الكروماتيدية (CA%)	0	0.22±2.45	0.15±2.48	0.07±2.74	0.22±2.45
	12.5	0.69±2.23	0.19±2.00	0.67±1.67	0.88±1.33
	25	0.19±1.67	0.38±2.00	0.33±1.33	0.58±1.00
	50	0.58±1.00	0.67±1.33	*0.58±1.00	0.33±0.67 *
	100	0.33±1.67	0.22±1.78	0.62±2.78	1.20±2.67
النوى الصغيرة MN/1000خلية	0	0.17±2.66	0.11±2.72	0.20±2.56	0.06±2.56
	12.5	0.76±2.50	0.27±2.17	0.73±1.67	1.09±1.83
	25	0.96±2.00	0.58±2.00	0.60±1.17	0.33±1.17
	50	0.73±1.67	1.00±1.50	*0.29±1.00	0.50±1.00 *
	100	0.44±2.16	0.76±2.00	0.17±2.17	0.58±2.00
التشوهات في رؤوس النطاف/ الاسبوع الاول	0	0.57±2.53	0.48±2.38	0.18±2.12	0.13±2.16
	12.5	0.12±2.40	0.19±2.13	0.12±1.83	0.24±1.83
	25	0.15±2.20	0.18±2.07	0.17±1.80	0.23±1.80
	50	0.14±2.00	0.03±1.97	0.27±1.40	0.25±1.50
	100	0.24±2.37	0.23±2.20	0.12±1.70	0.15±1.77
الاسبوع الخامس	0	0.25±2.52	0.26±2.52	0.11±2.37	0.25±2.36
	12.5	0.49±2.83	0.25±2.80	0.59±2.03	0.50±2.00
	25	0.23±2.47	0.47±2.50	0.47±2.00	0.34±2.03
	50	0.36±1.80	0.15±1.90	0.38±1.60	0.41±1.87
	100	0.48±2.77	0.36±2.70	0.31±2.00	0.06±2.00

- كل قراءة تمثل المتوسط الحسابي± الخط القياسي لثلاثة حيوانات
- يقصد بالمعادلة الاولى اعطاء المستخلص قبل لها PBS والعكس في الحالة الثانية
* معنوية عند مستوى دلالة أ <0.05
- الكسور الكروموسومية لم تشاهد في مجموعة السيطرة ولا المجموعة المعاملة

الجدول 2 : تأثير التداخل بين الجرعة المثلى من مستخلصي ثمار الهيل المائي والكحولي وعقارCP

نوع الاختبار والفترة الزمنية		نوع المستخلص	المعاملة الاولى			المعاملة الثانية		
			سيطرة سالبة	سيطرة موجبة	التداخل	سيطرة سالبة	سيطرة موجبة	التداخل
MI % خلايا نقي العظم		مائي	0.20±14.40	0.12±8.37	0.03±11.93 *	0.22±14.63	0.20±14.72	0.36±14.90
		كحولي	0.11±14.78	0.10±8.15	0.55±15.00 *	0.16±14.48	0.30±15.21	0.27±16.17
MI % الخلايا الجنسية		مائي	0.10±18.92	0.47±11.18	0.14±16.00 *	0.06±18.83	0.41±19.01	0.17±18.00
		كحولي	0.20±20.26	0.25±11.42	0.21±17.00 *	0.30±20.19	0.21±20.00	0.59±21.10
الكسور الكروموسومية		مائي	0	0.40±6.78	*1.21±4.67	0	0.11±4.11	*1.00±3.00
		كحولي	0	0.34±7.78	*1.00±3.00	0	0.29±4.56	*0.67±2.67
الكسور الكروماتيدية		مائي	0.19±2.00	0.33±13.33	*0.58±9.00	0.22±2.11	0.77±11.33	*1.53±8.00
		كحولي	0.19±2.00	0.78±16.89	*1.0±7.00	0.11±1.56	0.49±11.11	*1.53±7.00
النوى الصغيرة في نقي العظم		مائي	0.17±2.17	0.67±43.00	1.73±25.00 *	0.16±2.00	0.87±33.44	*1.20±26.33
		كحولي	0.20±2.56	1.47±43.33	0.76±20.00 *	0.06±2.89	0.51±33.33	*1.32±24.00
التشوهات في رؤوس النطف	الاسبوع الاول	مائي	0.44±2.52	0.50±3.14	0.05±2.90	0.66±2.42	0.38±3.52	0.21±3.20
		كحولي	0.62±2.16	0.52±3.26	0.35±2.30	0.60±2.16	0.63±3.37	0.46±2.67
	الاسبوع الخامس	مائي	0.27±2.53	0.45±12.40	*0.48±7.27	0.32±2.27	0.38±12.20	*0.58±8.13
		كحولي	0.34±2.10	0.51±13.30	*0.56±5.50	0.27±2.33	1.03±11.57	*0.82±7.50

كل قراءة تمثل المتوسط الحسابي ± الخطاء القياسي لثلاثة حيوانات

يقصد بالمعاملة الاولى اعطاء المستخلص قبل العقار اما المعاملة الثانية فيتم اعطاء العقار اولاً ثم المستخلص.

* المقرون معنوية وعند مستوى دلالة (أ < 0.05) عند المقارنة بعينة السيطرة الموجبة.

الجدول 3: تأثير التداخل بين الجرعة المثلى لمستخلصي ثمار الهيل المائي والكحولي وعقار MTX

نوع الاختبار والفترة الزمنية		المستخلص	المعاملة الاولى			المعاملة الثانية		
			سيطرة سالبة	سيطرة موجبة	التداخل	سيطرة سالبة	سيطرة موجبة	التداخل
MI % خلايا نقي العظم		مائي	0.17±14.34	0.15±6.76	*0.40±11.33	0.10±14.15	0.97±6.96	0.09±9.36 *
		كحولي	0.17±14.66	0.08±6.48	*1.38±11.40	0.16±14.81	0.15±7.07	±10.50 *0.40
MI % الخلايا الجنسية		مائي	0.28±19.56	±11.43 0.30	*1.43±15.27	0.20±19.52	0.39±11.72	±14.00 1.53
		كحولي	0.36±19.70	±10.74 0.38	*0.35±17.23	0.31±20.07	0.53±10.84	±13.87 0.59
الكسور الكروموسومية		مائي	0	0.11±2.78	0.67±1.67	0	0.11±2.56	0.58±2.00
		كحولي	0	0.11±2.89	*0.67±1.33	0	0.11±2.78	1.00±2.00
الكسور الكروماتيدية		مائي	0.22±1.78	0.11±7.56	1.20±5.33	0.21±2.11	0.22±7.22	1.16±6.00
		كحولي	0.11±1.78	0.33±6.67	*1.45±5.33	0.11±1.56	0.22±6.78	1.00±4.00 *
النوى الصغيرة		مائي	0.31±2.06	±20.78 0.61	*2.08±10.06	0.16±2.28	0.40±21.22	±16.00 *1.73
		كحولي	0.15±2.55	±22.67 0.33	*1.60±9.83	0.10±2.50	0.17±20.83	±13.00 *1.16
التشوهات في رؤوس النطاف	الاسبوع الاول	مائي	0.47±2.24	0.07±2.49	0.85±2.70	0.58±2.35	0.13±3.13	0.27±2.80
		كحولي	0.11±2.68	0.19±3.00	0.40±2.70	0.10±2.53	0.55±2.90	0.43±2.73
	الاسبوع الخامس	مائي	0.26±2.53	0.35±7.47	*0.29±4.50	0.32±2.27	0.45±7.13	0.50±5.90
		كحولي	0.21±2.10	0.66±8.00	*0.51±3.40	0.27±2.33	0.70±7.37	0.21±5.60

كل قراءة تمثل المتوسط الحسابي ± الخطأ القياسي لثلاثة حيوانات

* نسبة التثبيط معنوية وعند مستوى دلالة (أ < 0.05) عند مقارنتها بعينة السيطرة الموجبة المعاملة الاولى يقصد بها اعطاء المستخلص قبل العقار بينما العكس في المعاملة الثانية .

المصادر العربية

حسن، مفيد قائد أحمد، 2002 . استخدام بعض المستخلصات النباتية لتثبيط الاثر السمي الوراثي لبعض العقاقير المضادة للسرطان في الفأر، اطروحة دكتوراه, كلية العلوم, جامعة بابل.

المصادرالأجنبية

Abraham, S.K., Singh, S.P. and Kesavan, P.C., 1998. In vivo antigenotoxic effects of dietary agents and beverages coadministerd with urethane: assessment of the role of glutathione s-transferase activity. Mutat. Res., 413, pp.103-1 10.

Allen, J.W., Shuler, C.F., Mendes, R.W. and Latt, S.A., 1977. A simplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromo-deoxy uridine tablets. Cytogenet. Cell Genet., 18, pp.23 1-237.

Banerjee, S., Sharma, R., Kale, R.K. and Rao, A.R., 1994. Influence of certain essential oils on carcinogen metabolizing enzymes and acid soluble sulphydryls in mouse liver. Nutrition and Cancer, 21, pp.263 -269.

Borchers, A.H., Kennedy, K.A. and Straw, J.A., 1990. Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in Chinese hamster ovary cells following exposure to ultraviolet irradiation or ethyl methane sulfonate. Cancer Res., 50, pp.1786-1789.

Bronzetti, C., 1997. Forward: the role of antimutagenesis and anticarcinogenesis. J. Environ. Patho. Toxicol. and Oncol., 16, pp.259-262.

Chong, J., 1995. When seeds, barks and flowers spice up your life, fact file, Sunday, London, pp.54-5 5.

Crook, T., Souhami, R. and Mlean, A., 1986. Cytotoxicity: DNA cross-linking and single strand breaks induced by activated cyclophosphamide and acrolein in human leukemia cells. Cancer Res., 46, pp.5029-5034.

Deflora, S. and Ramel, C., 1988. Mechanisms of mutagenesis and carcinogensis, classification and over view. Mutat. Res., 202, pp.285-306.

Edenharder, R., Frangart, J., Hager, M., Hotmann, P. and Rauctter, K., 1998. Protective effects of fruits and vegetables against *in viva* clastogenicity of cyclophosphamide or benzo(a) pyrene in mice. Food and Chemical Toxicol., 36, pp.637-645. 9

El-Kadery, A.A. and Emara, M.M., 1997. Effect of *Nigella sat/va* crude oil on skin penetration and viability of *S'chistosoma rnansoni* cercariae. New Egypt. J. Med., 11, pp.431-436.

Evans, F.P., Breckon, G. and Ford, C.E., 1964. An air drying method for meiotic preparation from mammalian testes. Cytogenetics, 3, pp.284-294.

Harborne, J.B., 1984. Phytoehemical methods. Second edition, Chapman and Hall, 288p.

Huennekens, F.M., 1994. The methotrexate story: a paradigm for development of cancer chemotherapeutic agents. Adv. Enzyme. Regul., 34, pp.397-4 19.

Jaffer, Z.M.T., Shubber, E.K. and Amash, H.S., 2001. Cytogenetic analysis of Chinese hamster lung ftbroblasts, V-79, spontaneuosly resistant to MTX. Nucleus 44, pp.28-35.

Jeng, J.H., Hahn, L.J., Lu, F.J., Wang, Y.J. and Kuo, M.Y.P., 1994. Eugenol triggers different pathobiological effects on human oral mucosal fibroblasts. J. Dent. Res., 73, pp.1050-1055.

Kasahara, Y., Nakai, Y., Miura, D., Yagi, K., Hirabayashi, K. and Makita, T., 1992b. Mechanism of induction of micronuclei and chromosome aberrations in mouse bone marrow by multiple treatments of methotrexate. Mutat. Res., 280, pp.117-128.

Kasahara, Y., Wakata, A., Nakai, Y., Yuno, K., Miura, D., Yagi, K., Hirabayashi, K. and Makita, T., 1992a. The micronucleus test using peripheral blood reticulocytes from methotrexate-treated mice. Mutat. Res., 278, pp.145-15 1.

Ketterer, B., 1988. Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. Mutat. Res., 202, pp.343-36 1.

King, M.T., Wild, D., Gocke, E. and Eckhardt, K., 1982. 5-Bromodeoxy uridin tablets with improved depot effect for analysis *in viva* of SCEs in bone marrow and spermatogonial cells. Mutat. Res., 97, pp.117-129.

Maskaleris, T., Lialiaris, T. and Triantaphyllidis, C., 1998. Induction of cytogenetic damage in human lymphocytes *in vitro* and of anti neoplastic effects in ehrlich ascites tumor cells *in viva* treated by methotrexate, hyperthermia and/or caffeine. Mutat. Res., 422 , pp. 229-236.

Miski, M., Ulubele, A., Mabry, T.J., 1983. 6-Hydroxy flavones from *Thym bra spicata.* Phytochemistry, 22, pp.2093-2094.

Murcia, C.R. and Nombela, J.J.A., 1972. Cytological aberrations produced by methotr-exate in mouse ascites tumours. Mutat. Res., 14, pp.405-412.

Negishi, T., Nakano, H., Kitamura, A., Itome, C., Shiotani, T. and Hayatsu, H., 1994. Inhibitory activity of chlorophyllin on the genotoxicity of carcinogens in Drosophila. Cancer Lett., 83, pp.157-164.

Ohta, T., Watanabe, K., Moriya, M., Shirasu, Y. and Kada, T., 1983. Anti-mutagenic effects of coumarin and umbelliferone on mutagenests induced by 4-nitroquinolin 1-oxide or UV irradiatin in *E. colt* Mutat. Res., 117, pp.135-138.

Qiunto, 1., De-Marinis, F., Mallordo, M., Arcucci, A., Morte, R.D. and Staiano, N., 1989. Effect of DNOC, ferban and imidan exposure on mouse sperm morphology. Mutant. Res., 224, pp.405-408.

Raj, A.S., Heddle, J.A., Newmark, H.L. and Katz, M., 1983. Caffeic acid as an inhibitor of DMBA induced chromosomal breakage in mice assessed by bone marrow micronucleus test. Mutat. Res., 124, pp.247-253.

Samejima, K., Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G., 1995. Luteolin a strong antimutagen against dietary carcinogen, Trp-P-2, in peppermint, Sage, and Thyma. J. Agric. Food. Chem., 43, pp.410-414.

Sasaki, Y.F, Tmanishi, H., Ohta, T., Watanabe, M., Matsumoto. K. and Shirasa, Y., 1988. Suppressing effect of tannic acid on UV and chemically induced chromosome aberration in cultured mammalian cells. Agr. Biol. Chem. 52, pp.3423-3428.

Schmid, W., 1975. The micronucleus test. Mutat. Res., 31, pp.9-15.

Shankel, M.D., Kuo, S., Haines, C. and Mitscher, L.A., 1993. Extracellular interception of mutagens. Basic Life Sci., 61, pp.65- 74.

Shiraishi, Y., 1978. Chromosome aberrations induced germ cells of mice. Mutat. Res., 57, pp.313-324.

Shubber, F.K., 1981. The genetic hazard of ten antiparasitic drugs compared to radiation. Ph.D. thesis, Harvard Univ. Cambridge.U.S.A.

Shubber, F.K., Auda, H.M., Jaffer, Z.M.T. and Abdul-Rahman, M., 1999. Phenotypic expression of three genetic markers in human lymphoblastoid cells ,GM-7254, treated with MMC. Nucleus 42, pp.122-130.

Siou, G., Conan, L. and Haitem, M., 1981. Evaluation of the clastogenic action of benzene by oral administration with 2 cytogentic techniques in mouse and Chinese hamster. Mutat. Res., 90, pp.273-278.

Sukumaran, K. and Kuttan, R., 1995. Inhibition of tabacco induced mutagenesis by euguenol and plant extracts. Mutat. Res., 343 , pp.25-3 0.

Tates, A. and Natarajan, A., 1976. A correlation on the genetic damage induced by chemical mutagen in bone marrow and spermatogonia. Mutat. Res., 37, pp.267-278.

Tseng, T.H., Chu, C.Y. and Wang, C.J., 1992. Inhibition of penta-acetyl geniposide on AFB_1 induced genotoxicity in $C3H_{10}T_1/2$ cells. Cancer Lett., 62, pp.233-242.

Uragoda, C.G., 1992. Syptoms in spice workers. J. Trop. Med. Hyg., 95, pp.136-139., Abstract

Wang, Z.Y., Cheng, S.J., Zhou, Z.C., Athar, M., Khan, W.A., Bickers, D.R. and Mukhtar, H., 1989. Antimutagenic activity of green tea polyphenols. Mutat. Res., 223 , pp.273-285.

Wattenberg, L.W., 1985. Chemoprevention of cancer. Cancer Res., 45, pp.1-8.

Wyrobek, A.J. and Bruce, W.R., 1975. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Pro. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 72, pp.4425-4429.

Wyrobek, A.J., Gordon, L.A., Burkhart, J.G., Francis, M.W., Kappjr, R.W., Letz, C., Mailing, H.V., Topham, J.C. and Whorton, M.D., 1983. An evaluation of the Mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutant. Res., 115, pp.1-72.

Zhang, Y.S., Chen, Y.U. and YN, Y.U., 1989. Antimutagenic effect of garlic on (4NQO) induced mutagenesis in *Escherichia coli* WP2. Mutat. Res. 227, pp.215-219.

Zheng-Mu, M., Sakai, Y., Ose, Y., Sato, T., Nagase, H., Kito, H., Sato, M., Mizuno, M., Ono, K. and Nakane, H., 1990. Antimutagenic activity by the medicinal plants in traditional Chinese medicines. Shoyakuhak Zasshi, 44, pp.225-229.