وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء- كلية التربية

قسم علوم الحياة

دراسة النشاط المضاد للتطفير و الأكسدة لمستخلص نبات القرنفل في ذكور الجرذان البيض

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية التربية ، جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة ماجستير علوم

في علوم الحياة /فرع الحيوان

من قبل

رضية نجم عبد

بإشراف

أ. د.علي حمود السعدي

أ. م. د. ستار جاسم حتروش

نيسان 2011 م

جمادى الأول 1432 هـ

بِسْمِ ّاللهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

إِنِّي تَوَكَّلْتُ عَلَى ّاللهِ رَبِّي وَرَبِّكُم

مَّا مِن دَآبَّةٍ إِلاَّ هُوَ آخِذٌ بِنَاصِيَتِهَا إِنَّ

رَبِّي عَلَى صِرَاطٍ مُّسْتَقِيمٍ

صدق الله العلي العظيم

سورة هود-الآية (٥٦)

م/ إقرار المشرفين

إننا الدكتور علي حمود السعدي والدكتور ستار جاسم حتروش المشرفان على طالبة الماجستير رضية نجم عبد. بموجب الأمر الإداري المرقم ع / ٦ /٣٧٢٥ والمؤرخ في ٢٠٠٩/١١/١٨ قد اطلعنا على رسالة الطالبة المذكورة والتي أنجزت تحت إشرافنا نقر ونؤيد صلاحيتها للمناقشة لاستيفائها كافة المتطلبات العلمية لدرجة الماجستير.

الدكتور علي حمود السعدي — **الدكتور ستار جاسم حتروش**

أستاذ/كلية العلوم/جامعة بابل — **أستاذ مساعد /كلية التربية /جامعة كربلاء**

م/ توصية رئيس قسم علوم الحياة

بناءا على التوصيات المتوافرة أرشح هذه الرسالة للمناقشة.

الدكتور قيس حسين عباس

مدرس/ كلية التربية /جامعة كربلاء

م/قرار لجنة المناقشة

نشهد نحن أعضاء لجنة التقويم والمناقشة ، قد أطلعنا على الرسالة الموسومة **" دراسة النشاط المضاد للتطفير والأكسدة لمستخلص نبات القرنفل في ذكور الجرذان البيض "** وقد ناقشنا الطالبة **رضية نجم عبد** في محتوياتها وفيما له علاقة بها ، ونعتقد أنها جديرة بالقبول بتقدير **امتياز** لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة /فرع الحيوان.

التوقيع:

الاسم: د.خالد حمدان غثوان

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / /2011

رئيسا

التوقيع:

الاسم: د.زهير محمد علي جدوع

المرتبة العلمية: مدرس

التاريخ: / /2011

عضوا

التوقيع:

الاسم: د.إسماعيل حسين المياحي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /2011

عضوا

التوقيع:

الاسم:د. علي حمود السعدي

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / /2011

عضوا ومشرفا

التوقيع:

الاسم: د. ستار جاسم حتروش

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

التاريخ: / /2011

عضوا ومشرفا

مصادقة عمادة كلية التربية

التوقيع:

الاسم:

المرتبة العلمية:

م/ إقرار المقوم اللغوي

إني الدكتور خالد عباس حسين السيّاب المقوم اللغوي لرسالة طالبة الماجستير رضية نجم عبد الموسومة "دراسة النشاط المضاد للتطفير والأكسدة لمستخلص نبات القرنفل في ذكور الجرذان البيضاء " اقر وأؤيد سلامتها اللغوية وصلاحيتها للمناقشة لاستيفائها كافة متطلبات هذا الجانب.

الدكتور خالد عباس حسين السيّاب

قسم اللغة العربية / كلية التربية / جامعة كربلاء

2011/5/4

الإهداء

إلى من قرن الله رضاه برضاهما
والدي (رحمه الله)

والدتي (أطال الله عمرها)

إلى من جعله الله سكنا و مستقرا
زوجي العزيز

إلى من جعلهم الله زينة الحياة الدنيا
ولديّ (مثنى ورقيه)

إلى سندي وعضدي
إخوتي وأخواتي

إليهم جميعا اهدي

ثمرة جهدي

رضية

شكر وامتنــان

اللهم أني افتتح الثناء بحمدك وأنت مسدد للصواب بمنك،فله تعالى أولا وأخيرا الحمد والثناء والحمد حقه كما يستحقه حمدا كثيرا والصلاة على خير خلقه ورحمته للعالمين محمد وعلى آله ألطاهرين المنتجبين....

وبعد ....يطيب لي أن أتقدم بعد شكر الله بوافر الشكر والامتنان لأستاذيّ الفاضلين الدكتور علي حمود السعدي والدكتور ستار جاسم حتروش لما كان لهما من فضل في انجاز هذا العمل. كما أتقدم بالشكر الجزيل إلى الدكتور قيس عباس السماك رئيس قسم علوم الحياة / كلية التربية.

وشكري العميق للدكتور حيدر كامل زيدان في كلية العلوم / جامعة بابل ،على بذله جزء من وقته وجهده في تشخيص المقاطع النسيجية.ومن دواعي العرفان بالجميل أن أقدم شكر ي لكل من التدريسية كوكب عبد الله السعدي المدرس في قسم علوم الحياة / كلية العلوم والسيدة أنعام جودة المعيدة في قسم الكيمياء/ كلية التربية جزاهما الله خير الجزاء.

ولا يفوتني أن اشكر الدكتور ثامر كريم الجنابي في كلية الزراعة لمساعدته في إجراء التحليل الإحصائي لنتائج البحث، كما اشكر زملائي طلبة الدراسات العليا في القسم لما أبدوه لي من دعم ومساندة.

وفي الختام أتقدم بالشكر والعرفان للسيد مدين ناصر حسين لما بذله من جهد ومساعدة لإتمام البحث ، والى كل من قدم لي العون و فاتني ذكر اسمه شكري ودعائي.

الباحثة

الخلاصة

صممت هذه الدراسة للكشف عن الفعالية المضادة للأكسدة والتطفير للمستخلص الميثانولي المائي للبراعم الزهرية الجافة لنبات القرنفل*Syzygium aromaticum* (Myrtaceae) في الزجاج *in vitro* وفي الجسم الحي *in vivo* (ذكور الجرذان البيض)، لذا تضمنت عدة محاور:

- توصيف المستخلص النباتي باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC إذ بينت النتائج وجود أكثر من مكون عند استخدام طورين سائلين مختلفين. وعند فحص الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين لوحظ امتلاك المستخلص فعالية مضادة للأكسدة
- اختبارات التحليلات الوراثية الخلوية المتمثلة باختبار تحلل الـ DNA ومعامل الانقسام الخيطي (MI) والتشوهات الكروموسومية (CA) واختبار التشوه في النطف (SA)،إذ اجري التداخل مابين المستخلص بتركيز 500 ملغم/كغم وعقار المايتومايسين- سي بتركيز 2 ملغم /كغم وبثلاث معاملات هي المستخلص (قبل) و (مع) و (بعد) المطفر وبالتجريع الفموي لغرض اختبار فعالية المستخلص في منع أو تقليل فعل العقار ومعرفة الآلية التي تعمل بها المركبات الفعالة التي يحويها المستخلص، كما جرى اختبار معاملة المستخلص مع المطفر لمدد زمنية مختلفة وذلك لمعرفة التأثيرات التراكمية للمستخلص في التقليل من فعل العقار أو منعه .

أظهرت نتائج تحلل الـ DNA أن المعاملة بالمستخلص (قبل) و(مع) و(بعد) المطفر أعطت مستوى تحلل بحجم جزيئي 6000، 2000، 4000 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة الموجبة التي أعطت مستوى تحلل عالي بحجم جزيئي 9700 زوج قاعدي وكانت المعاملة (مع) هي الأفضل في خفض مستوى التحلل ، أما التجريع المستمر للمعاملة (مع) لخمسة أسابيع فقد أظهرت المعاملة للأسبوع الأول مستوى تحلل بحجم جزيئي 4000 زوج قاعدي، أما الأسبوع الثاني والثالث فقد بلغ مستوى التحلل 5000،5000 زوج قاعدي على التوالي بينما أعطت المعاملة للأسبوع الرابع والخامس مستوى تحلل بحجم جزيئي 2000،1000 زوج قاعدي على التوالي ما يدل على انخفاض مستوى تحلل الـ DNA باستمرار التجريع للمستخلص مع المطفر.

وقد أوضحت نتائج MI أن معاملة التداخل بالمستخلص(مع) و(بعد) المطفر كانت الأفضل في رفع متوسط MI إلى 2.43 ،2.13 على التوالي ولم تشكل المعاملة بالمستخلص (قبل) المطفر 1.68 فرقا معنويا عند المقارنة بالسيطرة الموجبة 1.16،أما نتائج المعاملة بالمستخلص مع المطفر لخمسة أسابيع فقد بينت أن الأسبوع الأول من التجريع رفع متوسط MI إلى 1.93 مقارنة بالسيطرة الموجبة 0.09 وبفرق معنوي أما الأسبوع الثاني والثالث من المعاملة التي بلغت قيم MI فيها 2.03 ،2.16 على التوالي فلم تشكل فروقا معنوية عند المقارنة فيما بينها أو مع متوسط MI

للأسبوع الأول بينما بلغت قيم MI للأسبوع الرابع والخامس 2.73 ،2.7 على التوالي والتي لم تعط أي فرق معنوي مقارنة بالسيطرة السالبة 3.2 .

كما بينت نتائج التشوهات الكروموسومية ارتفاعا معنويا في السيطرة الموجبة 26.0 مقارنة بالسيطرة السالبة 5.33 ، أما عند إجراء التداخل بين المستخلص والمطفر لوحظ انخفاض متوسط التشوهات للمعاملتين (مع) و(بعد) الى 14.0 ،14.0 على التوالي بينما لم تعط المعاملة (قبل) 19.66 اي فرق معنوي مع السيطرة الموجبة،كما إن متوسط التشوهات الكروموسومية لمعاملة التداخل (مع) للأسبوع الأول من المعاملة قد انخفض إلى 14.66 مقارنة بالسيطرة الموجبة 24.33، أما الأسبوع الثاني والثالث والرابع من المعاملة والتي بلغ متوسط CA فيها 12.0، 12.33، 12.66 على التوالي فلم تشكل فروقا معنوية عند المقارنة فيما بينها أو مع متوسط CA للأسبوع الأول من المعاملة ، ولم تعط المعاملة للأسبوع الخامس 9.0 أي فرق معنوي عند المقارنة بالسيطرة السالبة.

وبالنسبة لنتائج تشوهات النطف فقد أظهرت ارتفاعا بلغ 953.3 من 1000 نطفة مقارنة بالسيطرة السالبة 159.6 في الجرذان المعاملة بالمطفر، في حين أدى التداخل بالمعاملة (مع) و(بعد) إلى خفض متوسط التشوهات الى591.0 و630.6 على التوالي ،أما المعاملة (قبل) 883.0 فلم تشكل اي فرق معنوي مع السيطرة الموجبة، وأما نتائج هذه التشوهات للتداخل (مع) ولخمسة اسابيع فقد أظهرت إن عينات السيطرة الموجبة قد ارتفع فيها متوسط التشوهات الى 913.7 مقارنة بالسيطرة السالبة 159.7 ، اما متوسط التشوهات للأسبوع الأول من المعاملة فقد انخفض إلى 585.0 ، وأما الأسبوع الثاني والثالث والرابع من المعاملة فقد بلغ فيها متوسط التشوهات 420.3، 402.3، 360.7 على التوالي ولم تشكل فروقا معنوية عند المقارنة فيما بينها أو مع متوسط التشوهات للأسبوع الأول ، بينما لم تعط المعاملة للأسبوع الخامس 173.3 إي فرق معنوي مقارنة بالسيطرة السالبة .

- اختبار التغيرات النسجية المرضية : وقد دلت نتائج الفحص ألمجهري لنسج الكبد (Liver tissue) للجرذان المعاملة بالمطفر حدوث تنخر وارتشاح وتضرر في الخلايا الكبدية ونزف دموي في النسيج ، أما نتائج المعاملة بالتداخل (مع) لخمسة أسابيع فقد أظهرت تحسنا كبيرا وعدم حدوث تغيرات نسيجية مرضية.

قائمة المحتويات

	المحتويات	الصفحة
	الفصل الأول : المقدمة	
	المقدمة	1
	الفصل الثاني : استعراض المراجع	
1.2	نبات القرنفل (*Syzygium aromaticum*)	4
1.1.2	وصف عام لنبات القرنفل	4
2.1.2	تصنيف القرنفل والتوزيع الجغرافي للأنواع الموثقة	5
3.1.2	الأهمية الاقتصادية والاستعمالات الطبية	5
4.1.2	المركبات الفعّالة في نبات القرنفل	7
5.1.2	الفعالية المضادة للأكسدة لنبات القرنفل	9
6.1.2	الفعالية المضادة للتسرطن لنبات القرنفل	11
7.1.2	فعالية القرنفل ضد البكتيريا والفطريات	12
8.1.2	الفعاليات الفسيولوجية والتأثيرات الايضية الأخرى للقرنفل	14
2.2	عقار المايتومايسين – سي (Mitomycine – c)	15
3.2	التحليلات الوراثية الخلوية (Cytogenetic analysis)	17
1.3.2	اختبار معامل الانقسام (Mitotic Index Assay)	18
2.3.2	الانحرافات الكروموسومية (Chromosomal Aberration Assay)	18
3.3.2	اختبار تشوهات النطف (Sperms Abnormality Assay)	20
4.3.2	اختبار تحلل الـ DNA	21
	الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل	
1.3	المواد(Materials)	23
1.1.3	النبات المستخدم	23
2.1.3	حيوانات التجارب	23
3.1.3	الأجهزة والمواد المستخدمة	24
4.1.3	المواد الكيميائية	25

2.3	طرائق العمل (Methods)	26
1.2.3	تحضير المستخلص النباتي	26
2.2.3	توصيف المستخلص النباتي بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	26
3.2.3	اختبار الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص النباتي	27
4.2.3	تحديد الجرعة المناسبة للمطفر	27
5.2.3	تحديد الجرعة المناسبة للمستخلص	27
6.2.3	تحضير المحاليل	28
1.6.2.3	محلول دارئ الفوسفات الفسلجي (P.B.S)	28
2.6.2.3	محلول الكولجسين(Colchicine Solution)	28
3.6.2.3	محلول كلوريد البوتاسيوم (Potassium Chloride Solution)	28
4.6.2.3	المحلول المثبت (Fixative Solution)	28
5.6.2.3	دارئ سور نسن (Sorenson buffer)	28
6.6.2.3	محلول ملون كمزا (Giemsa stain solution)	29
7.6.2.3	محلول ملون ازرق المثيل (Methylene blue Stain)	29
8.6.2.3	ملون الآيوسين (Eosin stain)	29
9.6.2.3	ملون الهيماتوكسلين (Haematoxylin stain)	29
10.6.2.3	محلول بوين (Bouin’s solution)	29
11.6.2.3	دارئ TBE (Tris-borate EDTA buffer)	30
12.6.2.3	محلول ملون بروميد الأثيديوم (Ethidium bromide stain solution)	30
13.6.2.3	دارئ التحميل (Loading buffer)	30
7.2.3	الكشوف الكيميائية	30
1.7.2.3	الكشف عن الصابونيات (Saponins)	30
2.7.2.3	الكشف عن الفلافونيدات (Flavonoids)	31
3.7.2.3	الكشف عن الكلايكوسيدات (Glycosides)	31
4.7.2.3	الكشف عن الكومارين (Coumarins)	31
5.7.2.3	الكشف عن الراتنجات(Resins)	32
6.7.2.3	الكشف عن التانينات (Tannins)	32

7.7.2.3	الكشف عن القلويدات (Alkaloids)	32
8.7.2.3	الكشف عن الكاربوهيدرات (Carbohydrates)	33
9.7.2.3	الكشف عن الفينولات (Phenols)	33
10.7.2.3	الكشف عن التربينيدات الثلاثية (Triterpenoids)	33
11.7.2.3	قياس الأس الهيدروجيني (PH determination)	34
8.2.3	تصميم التجارب	34
9.2.3	اختبار تحلل الـ DNA	36
1.9.2.3	استخلاص الـDNA من الدم (DNA extraction from blood)	36
2.9.2.3	الترحيل الكهربائي للـDNA على هلام الأكاروز(Agaros gel electrophoresis)	37
10.2.3	تحضير كروموسومات خلايا نقي العظم	38
11.2.3	تحضير الخلايا الجنسية (النطف) لذكور الجرذان	39
12.2.3	تحضير المقاطع النسيجية	39
3.3	التحليل الإحصائي	40
	الفصل الرابع : النتائج	
1.4	الاختبارات المتعلقة بمستخلص القرنفل	41
1.1.4	توصيف المستخلص	41
2.1.4	اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين	45
3.1.4	الكشف الكيميائي العام للمركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	49
2.4	الاختبارات البيولوجية الجزئية والوراثية الخلوية.	51
1.2.4	تحلل DNA خلايا الدم البيض للجرذان المعاملة بالمايتومايسين ومستخلص القرنفل.	51
2.2.4	دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان.	54
1.2.2.4	تأثير التداخل بين المستخلص النباتي و المطفر في متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان.	54
2.2.2.4	تأثير تداخل المستخلص النباتي مع المطفر في متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان ولمدد مختلفة.	56
3.2.4	دراسة التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان	58

1.3.2.4	تأثير التداخل بين المستخلص النباتي و المطفر في متوسط التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان.	58
2.3.2.4	تأثير تداخل المستخلص النباتي مع المطفر في متوسط التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان ولمدد مختلفة.	60
4.2.4	دراسة التشوهات في الحيوانات المنوية للجرذان	64
1.4.2.4	تأثير التداخل بين المستخلص النباتي و المطفر في متوسط تشوهات النطف لذكور الجرذان.	64
2.4.2.4	تأثير تداخل المستخلص النباتي مع المطفر في متوسط تشوهات نطف ذكور الجرذان ولمدد مختلفة.	66
3.4	دراسة التغيرات النسجية المرضية.	71
	الفصل الخامس: المناقشة	
1.5	الاختبارات المتعلقة بالمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	75
1.1.5	توصيف المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة(TLC).	75
2.1.5	اختبار الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص بطريقة الرش بالبيتاكاروتين.	76
3.1.5	الكشف الكيميائي العام للمركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	77
2.5	الاختبارات البيولوجية الجزئية والوراثية الخلوية.	77
1.2.5	تحلل DNA خلايا الدم البيض للجرذان المعاملة بالمايتومايسين ومستخلص القرنفل.	77
2.2.5	دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان.	80
3.2.5	دراسة التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان.	82
4.2.5	دراسة التشوهات في الحيوانات المنوية للجرذان.	85
3.5	دراسة التغيرات النسجية المرضية.	88
	الاستنتاجات والتوصيات	
	الاستنتاجات	90
	التوصيات	91
	المصادر	
	المصادر العربية	92
	Foreign references	94

قائمة الجداول

رقم الجدول	عنوان الجدول	الصفحة
4-1	توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/ v) .	42
4-2	توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام الطور السائل(حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60: 25 :15 V/V/V).	44
4-3	نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/ v)	48
4-4	نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60:25:15 V/V/V)	49
4-5	الكشف الكيميائي العام للمركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل	50
4-6	مستوى تحلل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء لذكور الجرذان بعد المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل، مع، بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.	52
4-7	متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم /كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي للتداخلات الثلاثة.	55
4-8	متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم /كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص ولمدد مختلفة.	57
4-9	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.	59
4-10	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.	61
4-11	متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي في ثلاثة تداخلات.	65
4-12	متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي لمدة خمسة أسابيع.	67

قائمة الأشكال

رقم الشكل	عنوان الشكل	الصفحة
1-3	البراعم الزهرية الجافة للقرنفل	23
1-4	ترحيل المستخلص الميثانولي للقرنفل على صفائح TLC باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/ v)	43
2-4	ترحيل المستخلص الميثانولي للقرنفل على صفائح TLC باستخدام الطور السائل (حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60: 25 : 15 V/V/V).	45
3-4	فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v)	46
4-4	فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60:25:15 V/V/V).	47
5-4	نمط الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء لذكور الجرذان بعد المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل، مع،بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.	53
6-4	كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	62
7-4	كسر كروماتيدي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	62
8-4	كروموسوم حلقي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	63
9-4	فرط المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	63
10-4	قلة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	64
11-4	نطفة مشوهة القطعة الوسطية في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	68
12-4	نطفة فاقدة كلاّب الرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	68

4-13	نطفة فاقدة للرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	69
4-14	نطفة فاقدة للذنب في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	69
4-15	نطفة منحرفة كلاّب الرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	70
4-16	نطفة مفصصة الرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	70
4-17	نطفة مشوهة الذنب في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.	71
4-18	مقطع مستعرض لكبد جرذ طبيعي.	72
4-19	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمايتومايسين لأسبوع واحد يوضح تنخر النسيج ونزف دموي.	72
4-20	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمايتومايسين لأسبوع واحد يوضح نزف دموي وارتشاح وتضرر النسيج.	72
4-21	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمايتومايسين لأسبوع واحد يوضح نزف لوعاء دموي.	72
4-22	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لأسبوع واحد.	73
4-23	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لأسبوعين يظهر وضوح الفصيص الكبدي.	73
4-24	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لثلاثة أسابيع.	73
4-25	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لأربعة أسابيع.	74
4-26	مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لخمسة أسابيع.	74

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
CA	Chromosomal Aberration
CAT	Catalase
DNA	Deoxy Ribonucleic Acid
DPPH	1,2 diphenyl picryl hydrazyl
G1	The first gap of the cell cycle
GC-MS	Gas chromatography-Mass spectroscopy
GOX	Glutathione peroxidase
GST	Glutathione S transferase
H_2O_2	Hydrogen peroxide
MI	Mitotic Index
MMC	Mitomycin-C
R_f	Retardation Factor
ROS	Reactive Oxygen Species
SOD	Super Oxide Dismutase
TLC	Thin Layer Chromatography

SUMMARY

This study was designed to evaluation the antioxidant and anti mutagenic activity of methanolic water extract of clove dried flower buds (Myrtaceae) *in vivo* and *in vitro* (male rats) ,so this study was covered many subjects:

- extract has been described using thin layer chromatography TLC. The results showed the presence of more than one component of this extract when using multiple different liquid phases. When examining the activity of antioxidant by β-carotene spray process ,It was observed appearance of the antioxidant activity in several bands .
- Cytogenetic analysis tests in male rats which including DNA fragmentation test ,mitotic index (MI), chromosomal aberration (CA) in bone marrow and sperm abnormality. The interaction between 500mg/kg of plant extract and 2mg/kg of MMC was making in three forms of treatment of extract (before)(with)(after) mutagen MMC to assess extract activity in prevented or decreased the drug action , and to know the mechanisms which making it the active compound of the extract. Then the treatment of clove extract (with)drug have been tested for different periods to know the accumulative effects of clove extract in prevent or decreased the drug action.

It has shown the results for the DNA fragmentation that extracted from white blood cells of rats ,the interference treatment of extract (before), (with) and (after) the mutagen performed the level of fragmentation with molecular size 6000,2000,4000 base pair respectively compared with positive control 9700 base pair, that mean the all interferences lead to decreased the level of DNA fragmentation and the treatment (with) was the best . So the result of the oral gavage of mixing the extract with mutagen for five weeks had been showed, in the first week led to level fragmentation with molecular size 4000 base pair compared with positive control 9000 base pair, while during the second and third week of treatment the level of fragmentation of DNA were 5000, 5000 base pair respectively when compared between each other or with the first week of treatment. The fourth and fifth week of treatment the level of fragmentation of DNA were 2000, 1000 base pair respectively compared between each other. This indicates that the oral gavage of mixing the extract with mutagen reducing the level of the crash in the DNA.

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 at a significant differences 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 to 1.93 compared with positive control in a significant difference 0.09 , while during the second and third week of treatment the value of MI was reached to 2.03, 2.16 respectively without any significant difference when compared between each other or with the median MI to the first week of treatment . The fourth and fifth week , the value were 2.73 , 2.7 respectively did not give show any significant difference when compared with the negative control 3.2.

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) 14.0 ,14.0 respectively and in a significant differences to the positive control , 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 of first week to 14.66 compared with positive control at a significant differences 24.33 , while the second , third and fourth week the median CA was reached to 12.0 ,12.33 and 12.66 respectively and not posses any significant differences between each other or with median CA to the first week of treatment. also the fifth week of the treatment did not posses any significant difference 9.0 compared with negative control.

Also the result of mice sperm abnormality which treated with MMC had shown an increase to 953.3 from1000 sperms compared with negative control 159.6, where the interference with the treatment (with) and (before) to decrease the median abnormality to 591.0 , 630.6 respectively with a significant difference compared with the positive control. While the interference treatment (before) did not posses any significant difference 883.0 compared with positive control. While the results of abnormality to continuous oral gavage to the interference treatment (with) showed that the samples of positive control were decreased to 913.7 compared with negative control 159.7 this led to decrease the median abnormality of the first week of treatment (with) to 585, where the second , third and fourth week the

median abnormality was reached to 420.3 , 402.3 , 360.7 respectively and not posses any significant difference when compared between each other or with median abnormality of first week treatment , while the fifth week did not possessed any significant difference 173.3 compared with negative control.

- Finally the test of changing in pathological tissue, the results of microscopically examination of liver tissue mice which treated with mutagen showed necrosis , infiltration , lesion in liver cells and tissue hemorrhage , while the results of interference treatment (with) for five weeks was possessed a good improvement without any pathological tissue changing.

الفصل الأول

المقدمة Introduction

النباتات الطبيعية دواء طبيعي يتألف من عدة مكونات فعالة تعمل على أجهزة الجسم المختلفة ، ويجد العالم ضالته فيها عندما يبحث عن البدائل الطبيعية والعلاج الآمن بالنباتات والأعشاب بعد أن أرهقته الأدوية الكيميائية وما ينتج عنها من مضاعفات وآثار جانبية مرعبة. وتؤدي مختلف أجزاء وأنواع بعض النباتات دوراً مهما في التقليل من حدوث الطفرات الوراثية والوقاية من الأورام السرطانية المختلفة وقد تم إثبات ذلك في عدد كبير من الدراسات والبحوث وباستخدام أنظمة اختباريه مختلفة من الأحياء المجهرية والكائنات الراقية وذلك لفهم الدور الحقيقي للنباتات سواء عند استخدامها بصورة طبيعية أو تحويلها إلى مستخلصات بمذيبات كيميائية مختلفة (Deflora and Ramel, 1988).

لقد أثبتت البحوث الحديثة امتلاك المركبات الفعالة في النبات الفعل المضاد للطفرة الناتجة عن الكثير من العوامل الملوثة الداخلية والخارجية والتي تحث على تكوين أنواع مختلفة من الأضرار الوراثية والضعف المناعي والذي يسبب بدوره أمراضا عديدة في الإنسان والحيوان والنبات وتعمل هذه المركبات الفعاّلة بشكل مفرد أو تآزري إذ أنها قسمت على 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 ألـDNA وإحداث ضرر فيه ، والقسم الآخر مضاد للطفرة الحيوية (Bioantimutagens) والتي تعمل على منع تثبيت الطفرة بزيادة كفاءة أنظمة الإصلاح (DNA repair systems) في الخلية (Samejima *et al* ., 1995). وهناك الكثير من المنتجات النباتية تعمل مضادات أكسدة عن طريق حجز الجذور الحرة المختلفة و الشكل الفعاّل للأوكسجين الجزيئي ، وتبدي التوابل والبهارات فعالية عالية بوصفها مضادات للأكسدة والالتهاب كما تمتلك أيضا فعالية مضادة للتسرطن ويعد القرنفل احد أنواع التوابل الرئيسة (Shyamala *et al*., 2003). و ينتمي نبات القرنفل (Clove) *Syzygium aromaticum* إلى العائلة الآسية (Myrtaceae)، وهو من الأشجار دائمة الخضرة والتي تنمو إلى مديات عالية تتراوح من 10–20 متر وتمتلك أوراقا بيضوية كبيرة وأزهارا قرمزية اللون في مجاميع متعددة لعناقيد طرفية ، تكون البراعم

الزهرية في البداية شاحبة اللون ثم تصبح خضراء تدريجيا وعندما تنضج تكون ذات لون احمر مشع (Kim *et al.*, 1998). والقرنفل دواء شرقي قديم يستخدم في علاج قروح الجلد ورمد العين ويعد طارداً للبعوض وعث الثياب ، وهو يضاف أيضا إلى الطعام وعند عمل الحلوى وبعض المشروبات وتحضير بعض المحاليل العطرية ،كما يستعمل في معاجين الأسنان لرائحته الزكية وتأثيره المخدر(الزبيدي وبابان ، 1996).

وقد استخلصت العديد من المركبات الفعالة من هذا النبات كالتانينات (tannins) والتربينيدات الثلاثية (triterpenoids) (Umehara *et al* ., 1992). كما وجد Lee و Shibamoto (2001) أن لمستخلص القرنفل عدة مركبات فعالة تمتلك تأثيرا مضادا للأكسدة (antioxidant) ومضادا للورم (antitumor) . ويمتلك اليوجينول(eugenol) وهو المركب الفعال المستخلص من القرنفل فعالية عالية مثبطة للبكتيريا (Burt and Reinders, 2003). وله فعالية مضادة للالتهابات (Dip *et al.,* 2004) . كما يعد مضادا فطريا قويا (Chami *et al.*,2004) .إضافة إلى كونه مركبا مضادا للتسرطن(Dorai and Aggarwal,2004). وقد اظهر اليوجينول قابلية على توليد الجذور الحرة ROS(Reactive Oxygen Species) وهي أنواع الأوكسجين الفعالة في خط خلايا اللوكيميا HL-60 والتي تؤدي إلى زيادة نفاذية المايتوكوندريا ومن ثم ظهور الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) (Chae-Bin *et al* ., 2005). وعلى النقيض من ذلك فقد أفاد Nagababu وجماعته (2010) إن مركب اليوجينول يقلل من تولد أنواع الأوكسجين الفعّالة ROS داخل الخلايا الطبيعية وبذلك فانه يقلل من الفعل التطفيري لها. كما بين Abdel-Wahhab و Aly (2005) إن 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 كاسحات للجذور الحرة. وقد أشارت معظم الدراسات إلى أن المركبات الكيميائية النباتية التي لها خصائص مضادات أكسدة ومضادات التهاب تستطيع تثبيط الورم في مرحلة البدء (initiation) وفي مرحلة التعزيز(promotion) والمرحلة المتقدمة (progression) (Banerjee and Das,2005).

تهدف الدراسة الحالية إلى الكشف عن الفعالية المضادة للأكسدة و التطفير لمستخلص القرنفل في ذكور الجرذ الأبيض وقد تضمنت :

1 . توصيف المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (Thin Layer Chromatography).

2. فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص بطريقة الرش بالبيتاكاروتين .

3. دراسة تأثير الجرعة المطفرة لعقار المايتومايسين و التأثير الوقائي أو العلاجي المحتمل للمستخلص بإجراء ثلاثة تداخلات (قبل، مع، بعد) العقار ، في كروموسومات خلايا نقي العظم والـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيض والحيوانات المنوية لذكور الجرذان.

4. دراسة تأثير المستخلص مع المطفر في كروموسومات نقي العظم والـ DNA والحيوانات المنوية لذكور الجرذان ولمدد زمنية مختلفة .

5. دراسة دور المستخلص في تعديل أو منع التغيرات النسيجية المرضية الحاصلة نتيجة استخدام العقار في نسيج الكبد .

الفصل الثاني

استعراض المراجع Literature Review

1.2 نبات القرنفل (*Syzygium aromaticum*)

1.1.2 وصف عام لنبات القرنفل :

القرنفل شجرة دائمة الخضرة ، صغيرة إلى متوسطة الحجم يتراوح طولها من 8–20 مترا ، ذات فروع عديدة وشبه قائمة ، أوراقها عديمة الشعيرات وتمتلك غددا زيتية على السطح السفلي لها (Orwa *et al.,* 2009) . هذه الأوراق بيضوية وكبيرة ، أما الأزهار فهي قرمزية اللون وتكون على شكل مجاميع عديدة لعناقيد نهائية ، والبراعم الزهرية (flower buds) تكون شاحبة اللون في البداية بعدها تصبح خضراء تدريجيا ثم تنضج لتصبح ذات لون احمر مشع وعندها تكون جاهزة للحصاد ، يبلغ طول هذه البراعم من 1.5–2 سم وتتكون من كأس طويل ينتهي بأربع أوراق كأسيه منبسطة (sepals) وأربع أوراق تويجية غير متفتحة تكوّن بدورها كرة صغيرة في المركز (Bin mdderos, 2008) .أما الثمار فهي زيتونية الشكل وذات بذرة واحدة تسمى محليا أم القرنفل(Mother of clove)، أغلب أجزاء النبات عطرية ، والبراعم الزهرية غير المتفتحة الجافة والبنية اللون تسمى الفصوص (cloves) وقد جاءت هذه التسمية من الكلمة الفرنسية clou والتي تعني المسمار(nail) ، أما اسم الجنس فمشتق من المصطلح اليوناني Syzygios يعني زوج ، وأما الوصف الدقيق للنبات فهو العطري (aromatic) (Orwa *et al.,* 2009).

شجرة القرنفل أحادية المسكن ،أزهارها خنثيه (hermaphrodite) وذاتية التلقيح، تصبح الشجرة ناضجة بين 8–10 سنوات بعد زراعتها أما الثمار فتنضج بعد 9 أشهر من بدء التزهير وتعد ناضجة وظيفيا عندما يتحول لون exocarp إلى ارجواني– محمر، ويختلف موعد التزهير باختلاف المناطق (Orwa *et al.,* 2009).

2.1.2 تصنيف القرنفل والتوزيع الجغرافي للأنواع الموثقة :

Kingdom: Plantae

Division: Magnoliophyta.

Class: Magnoliopsida.

Order: Myrtales

Family: Myrtaceae

Genus: Syzygium

Species: *Syzygium aromaticum*

وقد تم تصنيف النبات في معشب جامعة بابل (Bin mdderos, 2008)

موطن القرنفل الأصلي هي جزر مولوكا في اندونيسيا وجنوبي الفلبين ، ويزرع اليوم على نطاق واسع في البرازيل وهايتي والهند وغينيا ومدغشقر وماليزيا وموريشيوس والمكسيك وسري لانكا وتنزانيا ، ويوجد القرنفل عموما في الغابات وغابات الأمطار الاستوائية (Orwa *et al.*, 2009).

3.1.2 الأهمية الاقتصادية والاستعمالات الطبية :

يحتوي نبات القرنفل على الزيوت الطيارة إضافة إلى المركبات غير الطيارة كالتانينات والفلافونويدات والستيرولات والكلايكوسيدات وهذا ماجعل له أهمية طبية كبيرة ، واليوجينول هو المركب الفعّال لزيت القرنفل والذي يشكل نسبة 70– 95 % من الوزن الكلي للزيت وله استعمالات واسعة ، منها استعماله في طب الأسنان كمخدر موضعي (Curtis, 1990) . وقد أستخدم القرنفل منذ آلاف السنين خاصة في جنوب شرق آسيا ، وتعد خاصية القرنفل المطهرة مفيدة لمعالجة بعض الالتهابات الفيروسية وغالباً ما يعطى في بعض مناطق آسيا المدارية لعلاج الأمراض مثل الملاريا (Malaria) والكوليرا (Cholera) والسل الرئوي (Tuberculosis)، كذلك يعد القرنفل منبها للعقل و الجسم فهو ينشط الذاكرة و الجسم ، وقد أستخدم للإعداد للولادة إذ يعمل على تنبيه تقلصات الرحم وتقويتها في أثناء الولادة ، ويعد كذلك مزيلا للحمى ومطهراً للجسم ومعقما للمعدة والأمعاء ويشفي من آلام الرأس والصرع ويقوي المناعة ويخفف التهابات

الحساسية ويستعمل مع زيت الزيتون في حالة الضعف العضلي والشلل (الزبيدي وبابان ، 1996) .

والقرنفل يستعمل مضادا فطريا في مزارع تربية اسماك المياه الدافئة ويستعمل أيضا لشل حركة الأسماك عند محاولة الإمساك بها لأجراء عملية التلقيح الاصطناعي للبيوض (Hussein *et al* ., 2000) .كذلك يستعمل الزيت الأساس للقرنفل مسكنا لآلام الأسنان وأيضا مضادا جيدا للجراثيم و مضادا للطفيليات و ترياقا ومانعا للتعرق ومزيلا للروائح (Duke *et al* ., 2003) . وقد بين Elujoba وجماعته (2005) إن زيت القرنفل يستعمل في صناعة العطور والصابون ومساحيق التنظيف ، واستخدمه لمدة طويلة أطباء الأسنان بوصفه ضمادا لمعالجة جروح الفم الحديثة وأمراض التجويف ألفمي و ألبلعومي . وأيضا ذكر Lans وجماعته (2008) أن زيت القرنفل يستعمل في علاج اضطرابات الجلد المختلفة مثل حب الشباب والبثور ويستعمل كذلك لمعالجة الحروق الشديدة والتهابات الجلد ولخفض حساسية الجلد كما يستعمل مرهما لتخفيف الآلام ولمعالجة مشاكل الأذن عند القطط والكلاب في بريطانيا وكولومبيا وكندا ، كما إن القرنفل من المواد التي تستعمل معطرا في صناعة المنكهات. وقد أشار Lee و Shibamoto(2001) إلى أن مشتقات اليوجينول تستخدم في صناعة المثبتات ومضادات الأكسدة للّدائن والمطاط.

أما الأجزاء الأساسية لنبات القرنفل كبراعم الأزهار والأوراق الحديثة والجذوع فتستخدم توابل تضاف إلى الأطعمة أو مشهيات أو مواد مساعدة على الهضم (مثل النبيذ الحار للقرنفل ونقيع القرنفل) ، وتستخدم أيضا ضد أمراض سوء الهضم وانتفاخ البطن، وعند خلطه مع أدوية أخرى فانه يستخدم مرهما لمعالجة التهابات أصابع الأقدام والسيقان ، كما إن خلطه مع مواد عطرية أخرى مثل الحمضيات والقرفة والزنجبيل يكتسب أهمية عالية في الكثير من الطب الصيني الشعبي TCM (traditional china medicine) حيث يستخدم في العديد من الحقول العلاجية كمعالجة أمراض المعدة والكلى والأمراض المعوية كما ويستخدم ضد العجز الجنسي وآلام الجهاز التناسلي والعقم (Jirovetz, 2010).

4.1.2 المركبات الفعّالة في نبات القرنفل:

تمتلك الزيوت الأساسية للنباتات فوائد كبيرة ولها استعمالات واسعة في الطب الشعبي وفي الصناعات الدوائية (Alma *et al* ., 2004).

والزيوت الأساسية في القرنفل هي المركبات الفعالة فيه وهي كما ذكرها Zheng وجماعته (1992) eugenol و caryophyllene و alpha-humulene و alpha-terpinylacetate و methyleugenol eugenyl و actyleugeno و naphthalene و chavicol و heptanone و sesquiterpenes و pinene methyl salicylate و vanillian ، ومن بين هذه المركبات المختلفة يعد اليوجينول العنصر الأساس لزيت براعم القرنفل ويوجد بمقدار 81.1 % بالإضافة إلى مركبي trans-caryophyllene و isoeugenol واللذين يوجدان بنسبة 7% و10.1% على التوالي . وقد ذكر Cai و Wu (1996) إن هناك عدة مركبات استخلصت من القرنفل ووجد أن لها فعالية مثبطة لنمو المسببات المرضية الفموية Oral pathogens وهذه المركبات هي Kaempferol و Rhamnocitrin و Biflorin و Myricetin و Gallic acid و 5-7–dihydroxy – 8–*β*-D-glycopyranoside -2-methylchromone و Ellagic acid إضافة إلى Oleanolic acid.

كما استطاع Son وجماعته (1998) عزل سبعة مركبات من البراعم الزهرية الجافة للقرنفل وهي eugenol و (7- 0 – methyl ether) kaempferol و oleanolic acid و 3,3,4 –tri - o- methylellagic acid و maslinic acid و *B*- sitosterol- 3-0- glucoside ومركب isorhamnetin 3-0-glucoside ، ويعد اليوجينول ذا فعالية مثبطة للـCOX-2 (2- cyclo oxygenase) وهو إنزيم محفز لسرطان القولون. أما Charles وجماعته (1998) فقد ذكر مركب آخر تم عزله من القرنفل وهو Orsellinic acid glucoside .

ويمكن الحصول على مكونات زيت القرنفل بطرق مختلفة منها طريقة كروماتوغرافيا الغاز – طيف الكتلة (GC-MS)، إذ انه أمكن تمييز 23 مركبا من زيت القرنفل من ضمنها eugenol

و eugenol acetate و β - caryophyllene ، وغالبا ما تكون مكونات زيت القرنفل المستخلصة بعدة طرق متشابهه إلا إن نسبة تراكيزها تكون مختلفة ، فزيت القرنفل المحصل عليه بتقطير البخار SD (steam distillation) يحتوي نسبة عالية من اليوجينول 85.2 % أما الزيت المحصل عليه بواسطة SFE (Supercritical fluid extraction) فيحتوي على اليوجينول بنسبة (53.8 –55.9 %) ، وأما الزيت المحصل عليه بواسطة HD (hydro distillation) فيحوي نسبة واطئة من اليوجينول (48.82 %)، كما إن الزيت المحصل عليه بواسطة SFE يحوي نسبة عالية من خلات اليوجينول (20.32 –21.75 %) وهو يعد أيضا من المكونات الرئيسة التي لها فعالية مضادة للأكسدة (Lee and Shibamoto ,2001) . وتعد طريقة SFE هي الطريقة الفضلى للحصول على النسبة المئوية العالية من المكونات ذات الفعالية المضادة للأكسدة والتي هي اليوجينول وخلات اليوجينول , وبالإضافة إلى هذين المركبين يحوي زيت القرنفل على نسبة من β – caryophyllene والذي يستخلص بالطرق الثلاث المختلفة والتي تم ذكرها بالإضافة إلى طريقة الاستخلاص Soxhlet وكانت هذه النسبة أعلى من 20.59 % و 36.94 % و 13.99–17.77 % و 17.5 % على التوالي وقد عرف عن هذا المركب فعاليته المضادة للالتهاب في تجارب عديدة (Ghelardini *et al* ., 2001).

وقد وجد Alma وجماعته (2007) إن البراعم الزهرية للقرنفل تحتوي على 18 مركبا تمثل حوالي 99.95 % منها زيوت أساسية (Essential oils) وأما المكونات الرئيسة لهذه الزيوت فهي Eugenol وكانت نسبته (87.00 %) ، Eugenol acetate بنسبة (8.01 %) و β – Caryophyllene ونسبته(3.56 %). وفي الوقت الحاضر تم عزل مركب آخر وهو Flavonoide triglycosides ويمتلك هذا المركب فعالية مضادة للأكسدة (Nassar 2006,). كما إن هناك 16 مركبا تم عزلها من المستخلص الهكساني لبراعم أزهار القرنفل بطريقة GC-MS ومنها eugenol (71.56 %) و eugenol acetate (8.99 %) ، وقد أعطى مستخلص ثنائي كلوروميثان (dichloromethane) لبراعم الأزهار الجافة للقرنفل مركبات Limonin و Ferulic aldehyde بالإضافة إلى اليوجينول وأما المستخلص الايثانولي للقرنفل فقد تم عزل عدة مركبات أخرى منه وهذه المركبات هي flavonoids و tamarixetin3-0-*B* -D-glucopyranoside و Ombutin3-0-*B*-D-

glucopyranoside إضـافة إلـى quercetin (Nassar *et al.* ,2007) . وأشـار Chaieb وجماعته (2007) إلى إن العناصر الرئيسة في القرنفل هي polypropopenoids و تشتمل على thymol و carvacol و cinnamaldyhyde و eugenol.

5.1.2 الفعالية المضادة للأكسدة لنبات القرنفل :

لقد عرف عن العديد من النباتات العطرية والتوابل وخصوصا البراعم الزهرية للقرنفل وزيوتها الأساسية امتلاكها فعاليات بيولوجية عديدة منها فعاليتها بوصفها مضادات أكسدة ومضادات التهابات إذ أن فعلها الكاسح للجذور الحرة يعود إلى قدرتها على وهب ذرات الهيدروجين ، فعند تفاعلها مع مركب DPPH (1,2 diphenyl picryl hydrazyl) أدت إلى قصر لونه من البنفسجي الغامق إلى الأصفر الفاتح (Fu *et al* ., 2007) . بالإضافة إلى ذلك فان اليوجينول والايزويوجينول المستخلصان من القرنفل يمتلكان تأثيرا مثبطا لبيروكسدة اللسيثين الحاصل بواسطة نظام Fe^{2+}-H_2O_2 (Toda *et al* ., 1994).

وأيضا بيّن Shahidi وجماعته (1995) إن الفعالية المضادة للأكسدة التي يمتلكها القرنفل(Clove) والزنجبيل(Ginger) والميرمية(Sage) والزعتر (Thyme) وإكليل الجبل(Rosmaria) في دهنيات اللحوم كانت مرتبطة بتراكيز هذه المواد وكان القرنفل أكثرها تأثيرا يتبعه الميرمية ثم إكليل الجبل ، أما الزعتر والزنجبيل فكانا الأضعف تأثيرا، ويعتقد أن القرنفل يمتلك فعل مضاد للأكسدة يمكن أن يقضي على فعالية الجذور الحرة المؤدية إلى تكون السرطان . كما كشفت الدراسات وجود المركبات الفلافونيدية في نبات القرنفل وهذه المركبات هي التي تمتلك فعالية مضادة للالتهاب وتحمي الغشاء المخاطي المعدي (gastric mucosa) من مختلف العوامل المسببة للقرح (ulcerogenic) في أنواع مختلفة من الثدييات (Magaji and Yaro , 2006). وأيضا وجد أن النباتات الحاوية على الفلافونيدات مؤثرة في منع الإصابة بالقرح المعدية ، والسبب الرئيس هو امتلاكها للفعالية المضادة للأكسدة (Harborne and Williams, 2000). كذلك لاحظ كل من Abdel-Wahhab و Aly (2005) إن العلاج باستعمال القرنفل والهيل يقلل من مستويات إنزيمات الكبد في المصل ، وينسب هذا الفعل إلى وجود مضادات الأكسدة في كل من القرنفل والهيل واللذين يحتويان على مركبات فينولية تعمل كاسحات للجذور الحرة ، كما عرف عن القرنفل انه كاسح للجذور الحرة المتكونة في حالة

التسمم بالافلاتوكسين (aflatoxicosis) . ويعد القرنفل كذلك من مضادات الأكسدة التي تمنع الشد العصبي والعطل الوعائي المستحث بواسطة عقار Streptozotoecin ، والحاث أيضا لسكري الجرذان وان هذه الفعاليات تعود إلى وجود الزيوت في القرنفل وخصوصا اليوجينول ، لذا فان مضادات الأكسدة يمكن أن تفيد في منع الإجهاد الحاث للتغيرات المرضية (Nangle *et al* ., 2006).

وقد اظهر مستخلص القرنفل الهكساني والثنائي كلوروميثاني و الايثانولي و بتراكيز مختلفة من 50–400 مايكرو غرام /مل فعل تثبيطي ومضاد للأكسدة ضد الجذور الحرة لمركب ألـ DPPH (Nassar *et al* ., 2007). كما اظهر المستخلص الميثانولي للقرنفل والزنجبيل والفلفل الأسود و الهيل فعالية قريبة لفعالية حامض الاسكوربيك (ascorbic acid) بوصفه مضادا للأكسدة بسبب احتوائها على مواد كاسحة للجذور الحرة مثل الفينولات المتعددة والفلافونيدات والأحماض الفينولية (Khalaf *et al* ., 2008) . كذلك وجد أن المستخلص الكحولي المائي للقرنفل يمتلك فعالية عالية مضادة للإجهاد (anti-stress) ، فالجرعة العالية للمستخلص حالت دون تطور القرح المعوية في مجموعة الفئران التي تعرضت لإجهاد ضبط النفس (cold- restraint stress) الحاث للقرحة المعوية ، كما أدى إلى انخفاض مستويات الدلائل الكيميوحيوية (biochemical markers) على تضرر الخلايا ، ولوحظ أيضا انخفاض التأثيرات الناجمة عن إجهاد نقص تجهيز الأوكسجين (anoxic –stress) الحاث للتشنجات في الفئران المعاملة بمستخلص القرنفل (Singh *et al.,* 2009).كما لوحظ إن جميع مستخلصات القرنفل و الفلافونويدات المعزولة منها مضادات أكسدة قوية في اختبار DPPHوكان المستخلص الايثانولي لبراعم أزهار القرنفل هو الأفضل في كبح الجذور الحرة مقارنة بمضادات الأكسدة المصنعة مثل butylated hydroxyl toluene (BHT) (Nagababu *et al*., 2010) .

6.1.2 الفعالية المضادة للتسرطن لنبات القرنفل :

يعد مركب اليوجينول من المركبات المهمة في عدم حدوث السرطان أو الطفرات الوراثية (Maura *et al* ., 1989) . وهو عامل مضاد للتسرطن ومضاد للتطفير (Zheng *et al*., 1992). ويعد القرنفل من مضادات التسرطن لاحتوائه على الفلافونيدات، وان فعالية المركبات الفينولية ومنها الفلافونيدات تتمثل بامتلاكها فعل مضاد للأكسدة ومضاد للتسرطن إذ تعمل على إزالة الجذور الحرة المتولدة وبذلك توجه الخلية للدخول في مرحلة الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis) ، ومن الأمثلة على الخلايا السرطانية التي تكون حساسة للمركبات الفينولية خارج الجسم *in vitro* هي خلايا سرطان الحنجرة Hep-2 وخلايا سرطان عنق الرحم والقولون وسرطان البروستات (Forkman and Martens, 2001).

واليوجينول المركب المعروف بخصائصه المضادة للأكسدة والمضادة للتسرطن يستخلص من زيت القرنفل، وأما نظائره الخمسة فيتم الحصول عليها من تفاعلات الاستلة(acetylation) والنيترة (nitration) ، وقد تم اختبار اليوجينول ونظائره خارج الجسم *In vitro* باستعمال خطين من خلايا السرطان البشرية وهما KB (oral squamous carcinoma cells) و DU-145 (androgen – insensitive prostate cancer cells) وقد وجد أن لليوجينول ونظائره فعلا مثبطا على كلا الخطين بتركيز اقل من 50×10^{-6} مول/لتر ، ويعتقد أن احتواء اليوجينول على مجاميع الهيدروكسيل والنيترو(nitro and hydroxyl groups) لها الأثر الفعال في تأثيره المضاد للسرطان ، بالإضافة إلى أن النتائج دلت على ظهور الموت المبرمج للخلايا (Apoptosis) في خلايا KB و DU-145 (Carrasco *et al* ., 2008). و أما في سرطان المعدة المستحث بواسطة *Helicobacter pylori* فيلعب القرنفل دورا مهما في تثبيط نمو المسببات المرضية وبذلك يقلل من خطر الإصابة بسرطان المعدة (Bhamarapravati *et al* ., 2003) .

لوحظ أيضا من خلال الدراسة التي أجراها Banerjee و Das (2005) على جلد الفئران السويسرية أن النقيع المائي للقرنفل استطاع إعاقة عملية تكوّن السرطان(carcinogenesis) ، فقد وجد أن هذا النقيع سبب اختزالا في مدى حدوث سرطان الجلد(skin papilloma) بشكل كبير ، وأوضحت النتائج إن الفعل الوقائي لنقيع القرنفل المائي ضد corton oil و DMBA (9,10- dimethyl benz (a) anthracene) الحاثة لتكوين سرطان الجلد في الجرع المعتمدة

والتجريع الفموي للنقيع ، لا يؤخر فقط تكوين سرطان الجلد الحليمي ولكن يقلل أيضا مدى تأثير الورم ألحليمي في الجلد إضافة إلى العدد المتراكم للورم . وأما في الفئران التي استحث فيها سرطان الرئة كيميائيا لوحظ أن المستخلص المائي للقرنفل قلل وبشكل معنوي مدى حدوث عدم التنسج (dysplasia) و التنسج البعدي (metaplasia) والسرطان (carcinoma) موضعيا (Banerjee *et al* ., 2006) . كما ذكر Hussain وجماعته (2009) إن العلاج الكيميائي بعقار الـ Gemcitabine لخلايا السرطان العنقي المقاوم للعلاج الكيميائي والإشعاعي ، كان عالي السمية على كل من الخلايا السرطانية والخلايا الطبيعية بينما وجد أن مستخلص القرنفل بتركيز (0.7−8) ملغم/ مل كان أكثر سمية اتجاه الخلايا السرطانية فقط ، وان إعطاء الجرعة الواطئة للعلاج مع مستخلص القرنفل الايثانولي بتركيز (2−3) ملغم / مل كان لها تأثير سمي واضح على الخلايا السرطانية مقارنة بالجرعة المفردة للعلاج بالعقار لوحده ، مما يدل على إن المستخلص قد زاد من كفاءة عقار الـ gemcitabine .

7.1.2 فعالية القرنفل ضد البكتيريا والفطريات:

يعد القرنفل مضادا فعّالا لأنواع مختلفة من الأحياء المجهرية ، حيث انه يثبط أنواع من البكتريا مثل بكتريا *Staphyllococcus aureus* و *Campylobacter jejuni* و *Salmonella enterides* و *Escherichia coli* (Al-Khayant and Blank, 1985). كما أثبتت عدة بحوث فعالية القرنفل ومركباته ضد الفيروسات ، فمركب اليوجنين (eugenin) المستخلص من القرنفل له تأثير مضاد لفيروس هربس (herpes–virus) حيث انه يثبط عملية تخليق الحامض النووي الفايروسي (Montes-Belmont and Carvajal, 1998). كذلك وجد أن المستخلص المائي للقرنفل يمتلك فعالية مثبطة لإنزيم protease لفيروس التهاب الكبد الفايروسي من النوع C (Shiraki *et al* ., 1998) . وقد وجد El- Hag وجماعته 1999 إن النقيع المائي للقرنفل قد ثبّط نمو السبورات الجرثومية لبكتيريا *Bacillus subtilis* .

وفي دراسة أجريت لمعرفة تأثير القرنفل المجرع بطريقتين مختلفتين على نمو فطر *Candida albicans* تم إعطاء مستحضر القرنفل داخل التجويف الفمي للفئران المصابة بالفطر حيث لوحظ تحسن إعراض الفم وانخفاض الخلايا القابلة للنمو للـ *Candida* ، وبالمقابل عندما أعطي مستحضر القرنفل داخل التجويف المعدي (intragastrically) لوحظ إن أعراض

الفم لم تتحسن ولكن أعداد الخلايا القابلة للنمو قد انخفضت مما يدل على إن القرنفل يكبح نمو فطر *Candida* في القناة الهضمية (Taguchi *et al*., 2005).

ويمتلك القرنفل فعالية مثبطة لأنواع مختلفة من الأحياء المجهرية منها البكتريا و الخمائر والاعفان وقد أوضحت النتائج إن زيت القرنفل امتلك فعالية مثبطة لهذه الأحياء وكانت الفعالية التثبيطية العالية ضد بكتيريا *Escherichia coli* وفطر *Aspergillus niger* حيث كانت نسبة التثبيط عالية جدا ولذلك يستعمل القرنفل وزيته مضادات ميكروبية ومطهرات (Sulieman *et al*.,2007). وأيضا بين Saeed و Tariq (2008) إن فعالية نقيع القرنفل المائي ومستخلصه وزيته الأساس قد اختبرت ضد 100 عزلة تعود لعشرة أنواع مختلفة من البكتيريا السالبة لصبغة غرام بطريقة انتشار القرص القياسية وأظهرت النتائج إن الفعالية القصوى لنقيع القرنفل والمستخلص كانت ضد بكتيريا *Pseudomonas aeruginosa* أما الزيت الأساس للقرنفل فقد أعطى فعالية قوية مضادة لكل أنواع البكتيريا المعزولة . كذلك وجد إن المستخلصات المائية لكل من القرنفل والقرفة والزنجبيل والتي استخدمت بتراكيز مختلفة 10% و15% و20% ضد نمو فطر *Aspergillus niger* إن التركيز 20% كان التركيز الأكثر فعالية في تثبيط نمو هذا الفطر ونمو الهايفات وان نسبة التثبيط لهذا الفطر كانت عالية جدا عند استخدام مستخلص القرنفل ، يتبعه مستخلص القرفة بنسبة 24.73% أما مستخلص الزنجبيل فانه لم يمتلك أي فعالية تثبيطية مضادة للفطر، أي إن الفعالية الأكثر تأثيرا للمستخلصات المائية والمضادة للفطريات كانت للقرنفل ويعتقد أن مركب اليوجينول في هذه النبات هو المسئول عن هذه الفعالية (Gautam *et al* ., 2010).

8.1.2 الفعاليات الفسيولوجية والتأثيرات الايضية الأخرى للقرنفل:

أصبح العلاج بالمستخلصات النباتية يستخدم بكثرة لمعالجة أنواع مختلفة من الأمراض ومنها أمراض تصلب الشرايين وداء السكري و مرض السرطان (Hemnani and Parihar, 1998) . حيث أشار Srivastava و Justesen (1987) إلى إن المستخلص الايثري (ethereal extract) للقرنفل يمنع وبشكل قوي تجمّع الصفائح الدموية (platlets) عن طريق خفض تخليق prostanoid وهي مجموعة من المركبات الدهنية الذائبة التي تنتجها معظم الخلايا الجسمية . وقد تم عزل مركبي اليوجينول وخلات اليوجينول من القرنفل بوصفها مركبات فعالة مضادة لتجّمع الصفائح الدموية (antiplatlet)، إذ تثبط هذه المركبات حامض الاراكيدونك والادرنالين والكولاجين الحاثة لتجّمع الصفائح الدموية ، كما تسلك هذه المركبات الفعالة سلوك مانع تخثر(anti aggregation) عن طريق منع تكون ثرومبوكسين الصفائح وزيادة تكّون إنزيم Lipoxygenase – 12 ، ووجد أنها كانت أكثر فعالية من الأسبرين في منع التخثر الحاصل بواسطة حامض الاراكيدونك والأدرنالين والكولاجين (Srivastava and Mustafa , 1993).

وقد ذكر Shyamala وجماعته (2003) أن مستوى الكلوتاثيون GSH قد انخفض وبشكل متميز في كبد وكلى مجموعة الجرذان ذات الفرط ألدهني (Hyperlipidemic) أي الحيوانات التي أخذت غذاء عالي المحتوى ألدهني ، بينما أظهرت مستويات اليوريا والليبيدات وأنزيمات AST (Aspartate aminotransferase) و ALT (Alanine aminotransferase) الموجودة في المصل والكبد والكلى ارتفاعا معنويا ، كما ارتفعت مستويات (thiobarbitaric acid reactive substances) TBARS و CD (diene conjugates) وهذا ما أدى إلى التولد المفرط للجذور الحرة ونشاط عملية بيروكسدة الدهون، وقد لوحظ إن مستويات هذه المركبات قد سجلت ميلا للرجوع إلى الحالة الطبيعية في المجاميع التي تم تجريعها مستخلص القرنفل ، وأوضحت النتائج أيضا إن أنزيمات الأكسدة مثلCAT (catalase) و GOX (glutathione peroxidase) و SOD (super oxide dismutase) و GST (glutathione S transferase) في مجموعة الجرذان التي جرعت المستخلص قد أظهرت تحسنا في فعالياتها. كذلك وجد أن مستخلص القرنفل له فعل مماثل لفعل الأنسولين في الخلايا الكبدية (hepatocytes) وخلايا الورم الكبدي (hepatoma) بخفض التعبير الجيني لـ

PEPCK(phosphoenol pyruvate carboxy kinase) و G6Pase (glucose-6-phosphatase) والتي تتضمن إنزيمات تسيطر على عملية تخليق الكلوكوز الكبدي (Prasad *et al.*, 2005) . لوحظ أيضا إن مركب اليوجينول المستخلص من القرنفل أدى إلى تثبيط amyloid – β – peptide الحاثّ للتدفق المفرط لأيونات الكالسيوم إلى الخلايا العصبية مؤديا بذلك إلى الموت العصبي وبذلك يعطي دعما للعلاج بالأعشاب الحاوية على المركبات الفعالة لعلاج مرض الزهايمر (Lee *et al.*, 2005) . وبينت النتائج في الآونة الأخيرة إمكانية استخدام اليوجينول كدواء لعلاج هذا المرض (Irie ,2006).

إن القرنفل في غذاء الفئران المعاملة برابع كلوريد الكاربون CCl4 قد خفض التغييرات النسيجية المرضية لأنسجة الكبد وأعادها إلى الحالة الطبيعية ، كما أعاد نشاط إنزيمات الكبد مثل catalase ، وقد لوحظ تأثير الغذاء المكمل بالقرنفل وعشبة الصابون وقشور الرمان على كبد الفئران المعاملة بـ CCl4 حيث أدى إلى زيادة مستوى الألبومين وخفض مستوى الإنزيمات AST وALT و ALP (alkaline phosphatase) و bilirobin (Abdel-Rahman and Abd El-Megeid 2006). كذلك فان استخدام جرع مختلفة من المستخلص الايثانولي للقرنفل قد حسّن قابلية التعلم واستدعاء الذاكرة الطويلة الأمد والقصيرة الأمد لدى الفئران مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة وكان الفرق معنويا عند استعمال التراكيز 100 و 200 ملغم/كغم (Dashti and Morshedi ,2009).

2.2 عقار المايتومايسين– سي (Mitomycine-C) :

المايتومايسين هو احد المضادات الحياتية والذي ينتج بواسطة بكتيريا *Streptomyces caesprtous* ، اكتشف لأول مرة في سنة 1956(Hata *et al* ., 1956). ويعد من أدوية التثبيط المناعي والذي استخدم لمدة طويلة لزيادة عمر الرقعة المتباينة وراثيا (Allograft) سواء في الحيوان أو الإنسان ولسوء الحظ فان كثيرا من هذه الأدوية تمتلك آثارا جانبية سامة (Bieber *et al* .,1962). فبالرغم من كون المايتومايسين دواءً فعّالاً إلا انه في نفس الوقت مركب عالي السمية ، و يعد العقار دواءً مضاداً للسرطان(anti neoplastic) إذ يكوّن ارتباط تساهمي مع شريط DNA المكمل وبذلك يثبط تخليق الـ DNA (Iyer and Szybalski 1963,). لذا فان الخلل في بنية الحامض النووي منقوص الأوكسجين هو المسئول عن كبح

النمو السرطاني بعد استعمال العقار (Layer and Saybaiski ,1964) . وبسبب تأيضه إلى عامل الكيلي (alkilating agent) فقد استخدم علاجاً كيميائياً منذ سنة 1960 ضد الأورام الصلدة مثل سرطان الثدي و سرطان الرئة و سرطان البنكرياس وسرطانات الطبقات الخارجية للمثانة (Tomsaz and Palom ,1997) .

وقد كان أول استخدام بشري له لمنع انتشار الخلايا الليفية في سنة 1988 في جراحة العيون ، إذ لوحظ أن العقار خفض وبدرجة كبيرة نسبة تكرار الظفرة القرنية (Pterygium) (Singh *et al* .,1997) ومنذ ذلك الحين استخدم بكثرة في عمليات ترشيح الماء الأسود (Kitazawa *et al* ., 1993) . وهو مركب سام وراثيا وله خاصية انتقاء الجينات المعينة التي يعمل عليها *In vitro* , *In vivo* لأنه لا يعمل بشكل عشوائي في المادة الوراثية (Yu and Pan, 1993) .أي إن المايتومايسين يؤثر بشكل انتقائي على بعض الخلايا بسبب كونه دواءً محترفاً (prodrug) وهي إحدى التعديلات ضمن الخلية قبل عمله كعامل ألكيلي. يتطلب العقار إنزيمات نوعية بين خلوية لتوليد فعاليته المعتدلة والتي تتأثر بمستوى الـ PH الموضعي أيضا ، وهذا ما يوضح انتقائيته لبعض الأورام الصلدة وقدرته على تثبيط نمو الخلايا الليفية (fibroblast) (Cumming *et al* ., 1998) .

أما الإشكال الايضية للمايتومايسين فهي: 2-7- diminomitosene و Trans-1-hydroxy و Cis-1-hydroxyl و 1-phosphate ويرتبط المايتومايسين تساهميا مع الموقع N2 لقاعدة الكوانين (Door,1988) . وهذا الارتباط إما أن يكون في شريط الـ DNA نفسه (inter strand) في الموقع CPG أو بين شريطي الـDNA (intra strand) في موقع CPG (Warren *et al* ., 1998).وأما التركيب الكيميائي للمايتومايسين فهو C_{15} H_{18} N_4O_5 (Vilar *et al* ., 2009).

إن السبب في استخدام المايتومايسين دواءً مضاداً للأورام تعود إلى فعله المباشر على الـDNA ، وهناك على الأقل عمليتان مختلفتان تكونان مسئولتين عن تأثيراته البيولوجية وهما أولا: الكلة الحامض النووي منقوص الأوكسجين (والتي تقود إلى ارتباطات عبورية cross links) وثانيا : توليد الجذور الحرة مثل superoxide و hydroxyl radicals (والتي تؤدي إلى كسور في شريط الـ DNA) (Kang *et al*., 2006). وقد وجد الخياط (1999) إن

المايتومايسين قد رفع من معدل التغييرات الكروموسومية والتبادل الكروماتيدي ألشقيقي كما انه خفض من معدل الانقسام وثبط آليات تضاعف الخلية . وفي دراسة أجريت لمعرفة التأثير السلبي للعقار في الحبال الصوتية للكلاب ، لوحظ انه حث على ضمور الحبال الصوتية لدى هذه الحيوانات(Spector *et al*., 2001) . كما دلت نتائج دراسة الأثر السام و المطفر للعقار على زيادة نسبة التشوهات الكروموسومية (الحلقي وثنائي السنترومير والفجوة والكسور والحذف) في نخاع العظم والطحال وبنفس الوقت انخفاض نسبة Mitotic Index و Blastogenic Index في نخاع العظم والطحال مما يدل على السمية الوراثية للعقار (Bakr ,2006) .

3.2 التحليلات الوراثية الخلوية Cytogenetic analyses:

استخدمت قدرة المواد الفيزيائية والكيميائية على أحداث الطفرات الوراثية في الخلية الحيّة في التحليلات الوراثية الخلوية بشكل واسع بوصفه نظاماً لتقييم قابلية هذه المواد على أحداث التغيرات الوراثية وعدها دليلا على خطورتها على الصحة العامة وإحداث الأمراض السرطانية ، إذ أن معظم هذه الأمراض تنتج عن تغيرات جينية في الكر وموسومات (Katler ,1975). وقد أشار Singh وRiemer (1984) إلى أن اختبار التبادل الكروماتيدي ألشقيقي والذي يعد من أكثر الطرق الشائعة لتقدير المخاطر الوراثية الممكنة للكيميائيات.

وقد ذكر Longstaff (1986) إن الطرق المتبعة في تشخيص القدرة على إحداث التطفير والتسرطن تقسم إلى اختبار الطفرة الجينية (Gene mutation) واختبار الانحرافات الكروموسومية (Chromosomal Aberration) واختبار تداخل الـDNA (DNA Interaction) واختبار تحوّل الخلايا (Cell transformation) ويعد اختبار تشوهات رؤوس النطف من اختبارات النوع الأخير. كما إن اختبار Alkaline comet assay (اختبار ترحيل الخلية المفردة) من التقنيات البسيطة والسريعة والحساسة ولها استعمالات متعددة إذ تستخدم في الكشف عن السمية الوراثية للمواد الكيميائية المصنعة والمبيدات الحياتية والمواد الكيميائية الزراعية (Tice,1995) .حيث أن هذه التقنية تفيد في معرفة واكتشاف مدى الضرر الحاصل في شريط الـDNA مثل كسور الشريط المفرد للـ DNA وكسور الشريط المزدوج وتضرر القواعد النيتروجينية (Tice *et al*., 2000) .

1.3.2 اختبار معامل الانقسام Mitotic Index Assay :

إن اختبار معامل الانقسام الخيطي من الاختبارات التي تستخدم للكشف عن التأثير السمي الوراثي (Genotoxic) للعوامل الفيزيائية والكيميائية في الخلايا اذ ان المواد المطفرة والمسرطنة غالبا ما تؤثر في الانقسامات ومعامل الانقسام (Yassen *et al*., 1998b). كما يستخدم هذا الاختبار للكشف عن التأثير الوراثي لبعض الأدوية و الإشعاعات عند العاملين بهذين المجالين (Shubber and Salih , 1988).

وقد عرّف Barbeito وجماعته (2000) معامل الانقسام بأنه نسبة الخلايا في الطور الاستوائي (Metaphase) الى 1000 خلية ذات نواة في الاطوار الاخرى . وقد بين Ataya وجماعته (1989) تأثير عقار السايكلوفوسفامايد في الخلايا الحبيبة لمبيض الجرذ وتثبيطه معامل الانقسام لخلايا نقي العظم عند الكشف عن القدرة السمية و التطفيرية لهذا العقار. وفي دراسة لمعرفة مدى تأثير جرعات مختلفة من المايتومايسين C في خلايا نقي العظم للفئران تبين ان الجرعة 4 ملغم / كغم من العقار تسبب انخفاض ملحوظ في قيمة معامل الانقسام (Podder *et al*., 2008).

2.3.2 اختبار الانحرافات الكروموسومية Chromosomal Aberration Assay :

هو احد التحليلات الخلوية الوراثية الذي يستخدم للكشف عن قدرة المؤثرات الفيزيائية والكيميائية على إحداث التغيرات الكروموسومية التركيبية والعددية والتي يمكن ملاحظتها عندما تكون الخلية في الطور الاستوائي من الانقسام (Evans, 1976). وتكون هذه التغيرات على نوعين ، النوع الأول ويشمل الكروموسوم بكامله إذ يحدث خلل أو كسر في كلا الكروماتيدين ، اما النوع الثاني فان الكسر أو الخلل يحدث في احد الكروماتيدين فقط (Evans and Oriordan , 1977).

وقد توصل Wolff (1982) الى ان انواع الانحرافات المتكونة والمرحلة الحساسة في دورة حياة الخلية تختلف باختلاف الطفرات ، فعلى سبيل المثال إن الأشعة المؤينة التي تستحث كسور الأشرطة وضرر القواعد النيتروجينية للـ DNA تؤثر في كل المراحل ومن الملاحظ ان الضرر المستحث في طور G1 من دورة انقسام الخلية (Cell cycle) هو انحراف الكروموسوم

بينما يؤدي التاثير في طور آخر الى إنتاج الانحرافات الكروماتيدية .وقد تكون هذه الانحرافات عددية (Numerical changes) او تركيبية (Structural changes) مثل الكروموسوم الحلقي والكروموسوم الثنائي الجسم المركزي (Dicentric chromosomes) أو قد تشمل حدوث انقلاب في الكروموسوم (Inversion) أو انتقال(Translocation) (الخياط ، 1999).

وهناك بعض الفرضيات التي توضح حدوث مثل هذه التغيرات تحت تاثير عوامل معينة حيث تظهر عن طريق التحطيم المباشر للعمود الفقري للـ DNA بفعل الاشعة المؤينة (Ionizing Radiation) او نتيجة لحدوث التشوهات في الحلزون المزدوج للـ DNA الناتجة عن المواد الداخلة بين شريطي الـ DNA (Crook *et al* ., 1986) . ويعتقد ان المسلك الشائع لكثير من العوامل المطفرة يكون في قدرتها على تدمير الاجسام الحالّة مع تحرر الانزيمات المحللة للـ DNA والتي لها القدرة على احداث الكسور الكروموسومية والكروماتيدية (حسن , 1997) .وقد لاحظ Vorshinin وجماعته (1978) ان التراكيز الواطئة من مادة الخارصين أظهرت زيادة في معدل الكسور الكروموسومية وان اغلب حالات الكسر حدثت في مراحله الأولى G1 من دورة حياة الخلية .

وفي دراسة قام بها Stahl وجماعته (1984) عن اختبار القابلية التطفيرية للمستخلصات العضوية لأربعة أنواع من الفحم مختلفة المحتوى الكبريتي باستعمال اختبار *Salmonella* Microsomal اختبرت أضرارها الوراثية وسميتها الخلوية باستعمال مبيض الهامستر الصيني كانت الأنواع ذات المحتوى الكبريتي العالي أكثر تطفيرا وإضرارا بالكروموسومات من الأنواع ذات المحتوى الواطئ وقد سببت كسوراً وفجوات وتبادلات كروماتيدية . كما أشارت العديد من الدراسات إلى أن السايكلوفوسفامايد والعديد من العوامل العلاجية الكيميائية تسبب حدوث طفرات جينية وكسور كروموسومية وإعادة ترتيب الكروموسومات في الخلايا الجسمية فضلاً عن زيادة تكرار الأورام الثانوية المرتبطة بالمعالجة في الأشخاص المصابين بالسرطان (Ben-Yehuda *et al*., 1996) .

3.3.2 اختبار تشوهات النطف Sperms Abnormality Assay :

يعد اختبار تشوهات النطف من الاختبارات التي تستخدم للكشف عن السمية الوراثية التي تحدثها العوامل الفيزيائية والكيميائية في المادة الوراثية للخلايا الجرثومية الذكرية لانها اكثر حساسية للمواد المطفرة اثناء تكوين النطف والتي تكون عملية متواصلة ومستمرة لذا تظهر تغيرات في الشكل المظهري لرأس النطفة والناتجة من حدوث خلل في تمايز النطف والذي يقع تحت سيطرة وراثية (Topham,1980) . ان اهمية فحص تشوهات النطف تكمن من خلال تحديده للمرحلة التي تكون فيها الخلايا الجرثومية اكثر حساسية للمواد المطفرة في اثناء تكون النطف ، فعلى سبيل المثال اذا ظهرت التشوهات في نهاية الاسبوع الاول من تعرض الفئران للمادة المطفرة فأن ذلك يعني ان الخلل الوراثي قد حدث في مرحلة توليد ارومات النطف (spematids) ، اما اذا ظهرت التشوهات بعد ثلاثة اسابيع من التعرض فان هذا يعني ان العامل قد احدث الضرر في الخلايا الاولية للنطف (spermatocytes) ، واما اذا ظهرت التشوهات بعد خمسة اسابيع من التعرض فان هذا العامل قد احدث الضرر في سليفات النطف (spermatogonia)(Zdienicka *et al* ., 1982).

وقد افاد يوسف وجماعته (1989) ان اي تاثير قد يصيب عملية نشأة النطف يؤدي الى نطف شاذة ومشوهة ، ويظهر ذلك جليا في النطف اثناء مرورها في البربخ والاسهر، ويلاحظ ذلك ايضا على النطف المقذوفة . كذلك أشير في دراسة حول تأثير الإعطاء طويل الأمد للـ Triptolide في عملية تكوين النطف والخصوبة لذكور الجرذان ، الى ظهور تشوهات واضحة على النطف مثل انفصال الرأس عن الذيل وحدوث عدم تكثف كروماتيني قبل النضج لأنوية النطف وغياب كامل في الأغشية البلازمية للقطعة الوسطية للنطف مع اختلالات تنظيمية في أغشية المايتوكوندريا وتجمع لذيول النطف (Hua *et al*., 2000). وقد وجد Yang وجماعته (2004) ان معظم المواد التي تسبب تشوهات في اشكال رؤوس الحيوانات المنوية هي مواد مطفرة ، اثبت ذلك من خلال اختبارات اخرى على مستوى الخلايا الجنسية (Germ cells) وان زيادة هذه التشوهات تكون مرتبطة عادة باختزال الخصوبة وحصول العقم في الحيوان و الإنسان . وفي دراسة تجريبية وجدت ان فيتامين C استخدم مضاداً لأكسدة DNA النطف إنها زادت على (250%) عندما كانت مستويات التغذية الحاوية على فيتامين C كفوءة لحفظ السائل المنوي بينما تقل نسبة حركة النطف في المدخنين (Ames *et al*., 1993).

4.3.2 اختبار تحلل الـ DNA :

يعد الـ DNA من الجزيئات الحياتية التي تتأثر بالعديد من العوامل الكيميائية والفيزيائية التي قد تسبب له العديد من التحويرات الكيميائية مثل تكسير الشريط المزدوج إلى شريط مفرد وتكوين الوحدات الثنائية للبيرميدين (Pyrimidine dimmers) والتجزؤ إلى قطع نيوكليوتيدية متعددة (Kumari *et al.*, 2008) . ويرجع سبب تحلل الـ DNA إلى ما ذكره Henglein وجماعته (1969) في أن تحلل الـ DNA نتج عن إحداث كسور بفعل تكوين الجذور الحرة الناتجة عن الأشعة المؤينة من خلال ازالة ذرة هيدروجين من السكر الخماسي للـ DNA أو بسبب ارتباط هذه الجذور مع قواعد الـ DNA الثنائية الاواصر.

كما وجد ايضا ان بعض المواد المضافة للأغذية المصنعة تحث على تضرر الـ DNA في البكتيريا والفطريات و الحشرات وخلايا الثدييات داخل الجسم وخارجه *in vivo,in vitro*، كما تسبب ايضا تشوهات كروموسومية في خلايا الثدييات ومن ضمنها خلايا الانسان (IARC,1983) . وقد وجد Yahagi وجماعته (1988) ان العديد من الاصباغ النايتروجينية ومشتقاتها يمكن ان تكون مواد مطفرة او مسرطنة ويعتقد ان تأثيراتها تتضمن تحويرات في شريط الـ DNA . ولوحظ ايضا إن زيادة الإجهاد ألتأكسدي تؤدي إلى زيادة واضحة في تضرر الـ DNA وان استخدام النطف المتأثرة بسبب زيادة الإجهاد ألتأكسدي للتلقيح داخل السايتوبلازم ICSI (intra cytoplasmic sperm injection) يسبب أضراراً خطيرة للجنين بعد عملية الغرس(post-Implantation) (Twigg *et al.*, 1998).

إن كسور الشريط المزدوج للـ DNA تعد ذات علاقة وطيدة مع موت الخلية لكونها تؤدي إلى تشوهات كروموسومية وفقدان في المادة الوراثية (Myllyperkio *et al.*, 1999). وقد اثبت Sasaki وجماعته (2002) باستخدام اختبار comet assay إن مادة ترترازين وبتركيز 10 ملغم /كغم من وزن الجسم تحث أيضا تضرر الـ DNA في قولون الجرذان بعد تجريعها عن طريق الفم لهذه المادة . وقد أفاد Andrade وجماعته (2008) أيضا إن الجرع العالية لمستخلص *Musa paradisiacal* تحث الزيادة المعنوية في معدل تضرر الـDNA لخلايا الدم المحيطي في الفئران السويسرية ، ويمكن قياس مدى تضرر الـ DNA عن طريق غياب الانقسام الكروموسومي الفعاّل .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل Materials and Methods :

1.3 المواد Materials :

1.1.3 النبات المستخدم :

استخدمت في هذه الدراسة البراعم الزهرية الجافة (dried flower buds) لنبات القرنفل المتوفرة في السوق المحلية لدى العطارين وبائعي الأعشاب الطبية شكل(3-1).

شكل (3-1) البراعم الزهرية الجافة للقرنفل

2.1.3 حيوانات التجارب:

استخدمت ذكور الجرذان البيض Albino rats بعمر (8-10) أسابيع وبمعدل وزن 175 غم ، وتم الحصول عليها من البيت الحيواني التابع لمعهد أبحاث الأجنة والعقم في مدينة الكاظمية وتم إيوائها في البيت الحيواني التابع لكلية التربية / جامعة كربلاء ووضعت في أقفاص معدنية وأعطيت العليقة الغذائية و الماء اللازم لها ، فضلا عن تبديل أرضية الأقفاص بين فترة وأخرى للمحافظة على نظافة الحيوانات، وتركت لمدة أسبوعين لتتكيف مع ظروف البيت الحيواني قبل أجراء التجارب عليها.

3.1.3 الأجهزة والمواد المستخدمة

ت	اسم الجهاز	الشركة المصنعة والبلد المنشأ
.1	نابذة Centrifuge	Hermale (Germany)
.2	جهاز المبخر الدوار Rotary evaporator	Hermale (Germany)
.3	حاضنة Incubator	Gallenkamb(England)
.4	حمام مائي Water bath	Labtech(Korea)
.5	خلاط كهربائي Blender	Tjl Assco(India)
.6	خلية الترحيل الكهربائي وملحقاتها Electrophoresis cell	Labnet(Taiwan)
.7	صفائح السيليكا جيل (TLC) Silica gel plates	Sigma (USA)
.8	صفيحة ساخنة Hot plate	Glassco(India)
.9	فرن كهربائي Oven	QL-Lab-Chicago (USA)
.10	مازج Vortex	Vwr (India)
.11	ماصة باستور pasture pipette	Brand (Germany)
.12	ماصة دقيقة Micropipette	Brand(Germany)
.13	مجهر ضوئي Microscope	Motic (Malaysia)
.14	مصدر الأشعة فوق البنفسجيةUV-Translluminator	Labnet(USA)
.15	ميزان حساس Sensitive balance	Sartorius (Germany)

4.1.3 المواد الكيميائية:

المادة الكيميائية	الشركة المنتجة
حامض الخليك Acetic acid	BDH(England)
اكاروز Agarose	Sigma(USA)
بيتا كاروتين β-Carotene	BDH(England)
حامض البوريك Boric acid	BDH(England)
صبغة بروموفينول الزرقاء Bromophenol blue stain	Sigma(USA)
كلوروفورم Chloroform	BDH(England)
كولجيسين Colchicine	Kahira(Egypt)
عدة تنقية واستخلاص تحلل الـ DNA DNA purification kit	Promega(USA)
كحول اثيلي Ethanol	BDH(England)
خلات الاثيل Ethyl acetate	BDH(England)
Ethylene diamine tetra acetic acid(EDTA)	BDH(England)
فورمالين Formalin	BDH(England)
صبغة گمزا Giemsa stain	Sigma(USA)
هكسان Hexane	BDH(England)
حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric acid(HCl)	BDH(England)
KH_2PO_4Anhydrous	BDH(England)
حامض اللينوليك Linoleic acid	BDH(England)
كحول مثيلي Methanol	BDH(England)
صبغة ازرق المثيل Methyl blue stain	Sigma(USA)
مايتومايسين- سي Mitomycine-C	Kyowa-Japan
Na_2HPO_4Anhydrous	BDH(England)
كلوريد البوتاسيوم Potassium chloride(KCl)	BDH(England)
اوكزالات البوتاسيوم Potassium oxalate	BDH(England)
كلوريد الصوديوم Sodium chloride(NaCl)	BDH(England)
سكروز Sucrose	BDH(England)
قاعدة ثلاثية Tris-base	BDH(England)

2.3 طرائق العمل Methods :

1.2.3 تحضير المستخلص النباتي :

حضر المستخلص حسب طريقة Sato وجماعته (1990) مع بعض التحوير إذ تم اخذ وزن معين من البراعم الزهرية الجافة (dried flower buds) والتي طحنت جيدا وخلطت مع المذيب (20% كحول مثيلي : 80% ماء مقطر ، V/V) بمعدل 1غم من البراعم : 3 مل من المذيب ، تم مجانسة الخليط بواسطة الخلاط الكهربائي ولمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة ثم رشّح المحلول الناتج بشاش طبي ، بعدها ركّز بجهاز المبخر الدوار(Rotary evaporator) ووضع في الحاضنة بدرجة 50 م للحصول على المستخلص الجاف والذي حفظ في مكان جاف لحين الاستعمال .

2.2.3 توصيف المستخلص النباتي بطريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) :

نشطت صفائح السيليكاجل بوضعها في الفرن لمدة ساعة كاملة عند درجة حرارة 105 م بعدها تركت لتبرد ، ثم وضع ما يقارب (50 – 100) مايكروليتر من مزيج المستخلص ومحلول الطور السائل المستخدم في التجربة (بنسبة 1غم من المستخلص : 3 مل من المذيب) على بعد 2 سم من حافة الصفيحة ، وضعت الصفيحة في جار الترحيل الحاوي على الطور السائل وقد استخدم نظامان من المذيبات كطور سائل لعملية الفصل وهي :

- حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول بنسبة (V/V/V 60:25:15)(Smith ,1958).
- خلات الاثيل : هكسان بنسبة (V/V/V 3:1) (Carrasco *et al* ., 2008).

تمت مراقبة عملية ارتفاع الطور السائل على الصفائح حتى وصوله قرب الحافة العليا تقريبا، أخرجت الصفائح من جار الترحيل وتركت لتجف ثم فحصت بالضوء المرئي وبالأشعة فوق البنفسجية لتحديد عامل الإعاقة R_f(Retardation Factor) للحزم المتكونة إضافة إلى ألوان تلك الحزم وعددها (Vekiari *et al* ., 1993) علما أن :

المسافة التي قطعتها الحزمة

الـ R_f = ——————————————————— .

المسافة التي قطعها الطور السائل

3.2.3 اختبار الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص النباتي :

اجري اختبار الفعالية المضادة للأكسدة باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين على صفائح TLC والمشار إليها من قبل Pratt و Miller (1984) حيث تم إذابة 9 ملغم من البيتاكاروتين في 30 مل من الكلوروفورم ثم أضيفت قطرتان من حامض اللينوليك (Linoleic acid) النقي و 60 مل من الأيثانول ، رشّت الصفائح بهذا الخليط ثم تم تعريضها إلى الضوء الاعتيادي ليتم قصر لون الأرضية في مدة تتراوح مابين (2– 6) ساعات إذ مثلت الحزم التي احتفظت باللون الأصفر مكونات مضادة للأكسدة وتتناسب كثافتها اللونية مع الفعالية المضادة للأكسدة .

4.2.3 تحديد الجرعة المناسبة للمطفر :

استخدمت الجرعة البالغة 2 ملغم/كغم من وزن الجسم المناسبة من عقار المايتومايسين (Vancleve *et al.,* 1987) وقد حضرت بإذابة الوزن المناسب من العقار لوزن الحيوان المجرع في 0.5 مل من الماء المقطر وأعطيت الجرعة فمويا لحيوانات التجربة.

5.2.3 تحديد الجرعة المناسبة للمستخلص :

استخدمت الجرعة500 ملغم/كغم من وزن الجسم من المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (Tajuddin *et al* ., 2004) وقد حضرت بإذابة الوزن المناسب من المستخلص لوزن الحيوان المجرع في0.5 مل من الماء المقطر وأعطيت الجرعة فمويا لحيوانات التجربة.

6.2.3 تحضير المحاليل :

1.6.2.3 محلول دارئ الفوسفات الفسلجي (P.B.S) Phosphate Buffer Solution

حضـر المحلـول بإذابـة 8 غـم مـن NaCl و0.2 غـم مـن KCl و 0.015 غـم من NaH_2PO_4 و 0.2 غم من KH_2PO_4 في 500 مل من الماء المقطر المعقم ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل وعدّل pH المحلول الى7.2 وحفظ في الثلاجة بدرجة 4 م لحين الاستعمال (Cruickshank *et al.*, 1975).

2.6.2.3 محلول الكولجسين Colchicine Solution

حضر المحلول بإذابة قرص واحد من الكولجسين بتركيز 0.5 ملغم في 0.5 مل من الماء المقطر، حقن كل حيوان 0.25 مل من المحلول في التجويف ألخلبي (Intra pretonialy) (Allen *et al.*,1977).

3.6.2.3 محلول كلوريد البوتاسيوم Potassium Chloride Solution

حضـر المحلـول بإذابـة 0.279 غـم مـن KCl فـي 50 مـل مـن المـاء المقطـر المعقـم للحصول على محلول واطئ الشد بتركيز 0.075 مولا ري واستخدم آنيا (Allen *et al.*,1977) .

4.6.2.3 المحلول المثبت Fixative Solution

حضر المحلول بإضافة حجم واحد من حامض ألخليك الثلجي إلى ثلاثة حجوم من الميثانول المطلق واستخدم آنيا بدرجة 4 م (Allen *et al.*,1977).

5.6.2.3 دارئ سور نسن Sorenson buffer

حضر المحلول بإذابة 7.68 غم من Na_2HPO_4 مع 6.74 غم من KH_2PO_4 في 1000 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في الثلاجة بدرجة4 م(Yaseen *et al* ., 1998a).

6.6.2.3 محلول ملون گمزا Giemsa stain solution

حضر المحلول بإذابة 2غم من مسحوق الصبغة في 100 مل من الميثانول المطلق وترك لمدة 24 ساعة على جهاز المحرك المغناطيسي ، رشح المحلول بورق الترشيح وعند الاستعمال خفف بمحلول سورنسن بنسبة 4:1 (Yaseen *et al* ., 1998a) .

7.6.2.3 محلول ملون ازرق المثيل Methylene blue Stain

حضر المحلول بإذابة 0.5 غم من الصبغة و1.6 غم من اوكزالات البوتاسيوم و 1 مل من الفورمالين في 70 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ بدرجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال (Coles, 1980).

8.6.2.3 ملون الآيوسين Eosin stain

اخذ 5 غم من مسحوق الآيوسين وأضيف إليه 95 مل من الماء المقطر ووضع عليه عدة بلورات من الثايمول لمنع التعفن ثم تم ترشيح المحلول وحفظ لحين الاستعمال (Humason , 1997) .

9.6.2.3 ملون الهيماتوكسلين Haematoxylin stain

حضرت بإذابة 1غم من مسحوق الهيماتوكسلين في 5 مل من الكحول المطلق وأضيف 20 غم من مادة شب الامونيا المذابة في 200 مل من الماء المقطر المغلي ،تم غلي المزيجان لمدة دقيقة واحدة ، بعدها رفع عن النار وأضيف0.6 غم من اوكسيد الزئبقيك إلى المزيج ، ترك ليبرد وأضيف إليه 3 مل من حامض الخليك الثلجي (Humason , 1997).

10.6.2.3 محلول بوين Bouin's solution

حضر المحلول بإضافة 4 غم من مسحوق حامض البكريك إلى 750 مل من الماء المقطر، أضيف إلى المحلول 50 مل من حامض الخليك الثلجي و200 مل من الفورمالين(Humason, 1997).

11.6.2.3 دارئ Tris-borate EDTA buffer (TBE)

حضر كخزين بتركيز X10 بإذابة 162 غم من Tris - base و 27.5 غم من حامض البوريك (boric acid) و 40 مل من EDTA بتركيز 0.5 مولاري في 900 مل من الماء المقطر ،عدّل PH إلى 8.3 ثم أكمل الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر وعقم بالأوتوكليف وحفظ بدرجة 4 م° (Sambrook *et al.*,1989).

12.6.2.3 محلول ملون بروميد الأثيديوم Ethidium bromide stain solution

حضر المحلول بإذابة 0.25 غم من بروميد الأثيديوم في 50 ملي لتر من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 5 ملغرام/ مللتر (Sambrook *et al.*,1989).

13.6.2.3 دارئ التحميل Loading buffer

حضر 10 مل منه بإذابة 0.25 غم من صبغة البروموفينول الزرقاء و 4 غم من السكروز في 5 مل ماء مقطر وأكمل الحجم إلى 10 مل (Sambrook *et al.*,1989).

7.2.3 الكشوف الكيميائية :

1.7.2.3 الكشف عن الصابونيات Saponins

تم الكشف حسب الطريقة الواردة في (Shihata, 1951) وكما يلي:

1.حضر محلول مائي من المسحوق النباتي وذلك بأخذ 1غم في أنبوبة اختبار وإضافة 10 مل ماء مقطر وبعد رج المزيج بشدة لوحظ ظهور رغوة كثيفة تبقى لمدة طويلة كدليل على ايجابية الكشف.

2.أضيف 3 مل من محلول كلوريد ألزئبقيك إلى 5 مل من المستخلص النباتي المائي، ودل ظهور راسب ابيض على وجود الصابونيات .

2.7.2.3 الكشف عن الفلافونيدات Flavonoids

وضع 1 مل من المستخلص النباتي في اختبار وأضيفت له قطرات من حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 إذ يدل ظهور اللون البني المحمر على ايجابية الكشف (Cannell, 1998).

3.7.2.3 الكشف عن الكلايكوسيدات Glycosides

1. كاشف فهلنك : حضر هذا الكاشف كما يأتي:

أ. أذيب 3 غم من كبريتات النحاس في 100 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 500 مل.

ب. أذيب 7 غم من هيدروكسيد الصوديوم مع 175 غم من ملح روشيل في 100 مل من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 500 مل.

2. مزجت حجوم متساوية من المحلول (أ) والمحلول (ب) في أنبوبة اختبار ، ثم أضيف 5 مل من الكاشف إلى 5 مل من المستخلص النباتي المائي ، وضع المزيج في حمام مائي بدرجة 100م ولمدة 10 دقائق ، دل تكون راسب احمر على ايجابية الكشف .كاشف بندكت : حضر هذا الكاشف بإذابة 173 غم من سترات البوتاسيوم و 100 غم من كربونات الصوديوم اللامائية في 800 مل من الماء المقطر مع التسخين ، ترك المحلول ليبرد ثم رشح بورق الترشيح ، أضيف إلى الراشح محلول كبريتات النحاس المحضر بإذابة 17.3 غم كن كبريتات النحاس في 100 مل من الماء المقطر، بعدها أكمل الحجم إلى 1000 مل بالماء المقطر ، ثم أضيف 5 مل من كاشف بندكت إلى 1 مل من المستخلص النباتي المائي ، دل ظهور الراسب الأحمر على ايجابية الكشف (Shihata , 1951).

4.7.2.3 الكشف عن الكومارين Coumarins

وضع 5 مل من المستخلص النباتي في أنبوبة اختبار وغطيت بورقة ترشيح مرطبة بمحلول هيدروكسيد الصوديوم 1 مولاري ثم وضعت الأنبوبة في حمام مائي يغلي لمدة 5 دقائق ، بعدها عرضت ورقة الترشيح إلى مصدر للأشعة فوق البنفسجية ، دل ظهور لون اصفر مخضر على ورقة الترشيح على ايجابية الكشف (Geisman , 1962).

5.7.2.3الكشف عن الراتنجات Resins

اعتمدت طريقة (Shihata, 1951) في الكشف عن الراتنجات بإضافة 50 مل من الايثانول 95 % إلى 10 غم من المستخلص النباتي ، ثم وضع المزيج في حمام مائي بدرجة 50 م ،ترك يغلي لفترة ثم رشح المحلول وأضيف إليه 100 مل من الماء المقطر المحمض بحامض الهيدروكلوريك 4 % ، دل ظهور العكورة على ايجابية الكشف.

6.7.2.3 الكشف عن التانينات Tannins

اتبعت طريقة الشامي (1982) بغلي10 غم من المسحوق النباتي في50 مل ماء مقطر ثم رشح المحلول وترك ليبرد ، قسم الراشح بعدها إلى قسمين ،أضيف إلى القسم الأول منه محلول كلوريد ألحديديك بتركيز 1% ودل ظهور اللون الأخضر المز رق على ايجابية الكشف ، أما القسم الثاني فقد أضيف إليه محلول خلات الرصاص بتركيز 1% ودل ظهور راسب هلامي القوام على ايجابية الكشف .

7.7.2.3 الكشف عن القلويدات Alkaloids

اتبعت طريقة Smolensk و وجماعته (1972) في الكشف عن القلويدات بوضع10 غم من المستخلص النباتي في 50 مل من الماء المقطر المحمض بحامض الهيدروكلوريك 4% ، ترك المحلول ليغلي مدة 10 دقائق ، رشح بعدها ووضع 0.5 مل من الراشح في زجاجة ساعة مع :

1. كاشف ماير: حضر هذا الكاشف بإذابة 1.36 غم من كلوريد الزئبقوز $HgCl_2$ في 60 مل من الماء المقطر و5 غم من يوديد البوتاسيوم في 10 مل من الماء المقطر، مزج المحلولين معا وأكمل الحجم إلى 100 مل بالماء المقطر، دل تكون راسب ابيض على ايجابية الكشف .
2. كاشف واكنر: حضر هذا الكاشف بإذابة 1.3 غم من اليود مع 2 غم من يوديد البوتاسيوم في 100 مل من الماء المقطر، دل تكون راسب بني على ايجابية الكشف.

8.7.2.3 الكشف عن الكاربوهيدرات Carbohydrates

1. كشف الفينول مع حامض الكبريتيك المركّز:

حضّر كاشف الفينول بإذابة 25 غم من بلورات الفينول في 500 مل من الماء المقطر ، ثم أضيف 0.5 مل من هذا الكاشف إلى 0.5 مل من المستخلص في أنبوبة اختبار ورجّت جيدا ثم أضيف 2.5 مل من حامض الكبريتك المركز إلى المحلول ، دلّ ظهور اللون الأحمر البني على وجود الكاربوهيدرات (Meyer and Walther , 1988).

2. كشف مولش Molish test :

أذيب 0.01 غم من المستخلص في 5 مل من الماء المقطر ، ثم وضع 1 مل من المحلول في أنبوبة اختبار وأضيف إليها 5 قطرات من محلول ألفا – نفثول الكحولي 1% ، رجّت الأنبوبة جيدا وأضيف إليها 0.5 مل من حامض الكبريتيك المركز ، دلّ ظهور حلقة بنفسجية اللون على ايجابية الكشف (Saadalla , 1980).

9.7.2.3الكشف عن الفينولات Phenols

كاشف كلوريد الحديديك Ferric chloride reagent :

حضر هذا الكاشف بإذابة 1غم من كلوريد ألحديديك $FeCl_3$ في 100 مل من الماء المقطر ، رطبت ورقة ترشيح بالمستخلص النباتي ، ثم أضيفت قطرات من الكاشف إلى الورقة وعرضت إلى بخار الامونيا ، فكان ظهور اللون الأزرق دليلا على وجود الفينولات(Adedayo *et al* ., 2001).

10.7.2.3 الكشف عن التربينيدات الثلاثية Triterpenoids

أضيف 1 مل من حامض الكبريتيك المركز إلى 1 مل من الكلوروفورم ، ثم أضيف المحلول الناتج إلى 2 مل من المستخلص ، دل ظهور اللون الأحمر أو الأرجواني على ايجابية الكشف (Harborne ,1984).

11.7.2.3 قياس الأس الهيدروجيني pH determination

مزج 10 غم من المسحوق النباتي مع 50 مل ماء مقطر بوساطة مازج مغناطيسي لمدة 10 دقائق، رشح المحلول وتم قياس الأس الهيدروجيني باستخدام جهاز قياس الدالة الحامضية (pH-meter) (Shihata , 1951).

8.2.3 تصميم التجارب

1- دراسة التداخل بين المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل و عقار المايتومايسين.

خصص لهذا الاختبار 15 جرذ بواقع ثلاثة حيوانات لكل مجموعة :

1.السيطرة السالبة : تم تجريعها الماء المقطر فقط وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة من التجريع .

2.السيطرة الموجبة : تم تجريعها المادة المطفرة المتمثلة بالمايتومايسين- سي فقط وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة من التجريع.

3.المجموعة الثالثة : تم تجريعها المستخلص النباتي والمادة المطفرة معا في آن واحد وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة من التجريع.

4. المجموعة الرابعة : تم تجريعها المستخلص النباتي بعد المادة المطفرة بـ24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد 48 ساعة من التجريع.

5. المجموعة الخامسة : تم تجريعها المستخلص النباتي قبل المادة المطفرة بـ24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد 48 ساعة من التجريع.

2- دراسة تأثير المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل مع عقار المايتومايسين لمدد مختلفة.

خصص لهذا الاختبار 18 جرذ بواقع ثلاثة حيوانات لكل مجموعة :

1. المجموعة الأولى : تم تجريعها المادة المطفرة فقط يوميا لمدة أسبوع واحد وقتلت الحيوانات في اليوم الثامن من التجريع.

2.المجموعة الثانية : تم تجريعها المطفر مع المستخلص يوميا لمدة أسبوع واحد وقتلت الحيوانات في اليوم الثامن من التجريع.

3. المجموعة الثالثة : تم تجريعها المطفر مع المستخلص يوميا لمدة أسبوعين وقتلت الحيوانات في اليوم الخامس عشر من التجريع.

4. المجموعة الرابعة : تم تجريعها المطفر مع المستخلص يوميا لمدة ثلاثة أسابيع وقتلت الحيوانات في اليوم الثاني والعشرين من التجريع.

5. المجموعة الخامسة : تم تجريعها المطفر مع المستخلص يوميا لمدة أربعة أسابيع وقتلت الحيوانات في اليوم التاسع والعشرين من التجريع.

6. المجموعة السادسة : تم تجريعها المطفر مع المستخلص يوميا لمدة خمسة أسابيع وقتلت الحيوانات في اليوم السادس والثلاثين من التجريع .

وقد أجريت على كل مجموعة الاختبارات الآتية :

1.اختبار تحلل الـ DNA DNA Fragmentation Test.

2.اختبار معامل الانقسام Mitotic Index Assay.

3.اختبار التشوهات الكروموسومية Chromosomal Aberration Assay.

4.اختبار تشوه الحيوانات المنوية Sperms Abnormality Assay.

5.الاختبارات النسجية المرضية Histopathological tests.

9.2.3 اختبار تحلل الـ DNA :

1.9.2.3 استخلاص الـDNA من الدم DNA extraction from blood :

تم تخدير الحيوان بالكلوروفورم ثم ثبت في طبق التشريح ، قص الجلد في منطقة البطن وأزيحت الأحشاء الداخلية للحيوان على جهة لاستخراج الوريد البابي الكبدي ،ثم سحب مقدار من الدم بواسطة محقنه طبية ووضع في أنبوبة حاوية على مادة EDTA لمنع تخثر الدم.

اتبعت طريقة استخلاص الـDNA حسب دليل شركة Promega و كالأتي :

1. أضيف1 مل من دم الحيوان إلى 3 مل من محلول محلل الخلايا (Cell lysis solution) في أنبوبة اختبار سعة 15 مل معقمة و مزجت المحتويات بلطف.

2. تركت الأنبوبة بدرجة حرارة الغرفة لمدة 10 دقائق ثم نبذت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق.

3. أهمل مقدار من الراشح دون إتلاف طبقة الخلايا البيضاء مع إبقاء من 50-100 مايكروليتر من الراشح في الأنبوبة ،مزجت المحتويات بالمازج من 10-15 ثانية لتعليق الخلايا .

4. أضيف 1 مل من محلول محلل الانوية (Nuclei Lysis Solution) إلى الأنبوبة وحضنت بدرجة 37 م لمدة ساعة واحدة مع التحريك المستمر.

5. أضيف5 مايكروليتر من محلول RNase إلى الأنبوبة وحضنت لمدة ربع ساعة بدرجة 37 م ثم تركت لتبرد بدرجة حرارة الغرفة .

6. أضيف 330 مايكروليتر من محلول محلل البروتين(Protein Precipitation Solution) ومزجت محتويات الأنبوبة بالمازج لمدة 20 ثانية .

7. نبذت الأنبوبة بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق .

8. نقل الراشح إلى أنبوبة حاوية على 1 مل من الآيزوبروبانول ، مزج الخليط بلطف حتى لظهور خيوط الـ DNA .

9. نبذت الأنبوبة مركزيا بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة .

10. أهمل الآيزوبروبانول وأضيف 1 مل من ايثانول 70% إلى الـ DNA المتركز على جدران الأنبوبة ثم رجّت لغسل الـ DNA .

11. نبذت الأنبوبة بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة دقيقة واحدة.

12. أهمل الايثانول بلطف ثم قلبت الأنبوبة على ورقة ترشيح نظيفة وتركت لتجف من 10 – 15 دقيقة .

13.أضيف 150 مايكروليتر من محلول إعادة الهدرجة (DNA Rehydration Solution) إلى الـDNA ووضع في حمام مائي بدرجة 65 م لمدة ساعة ، حفظ الـ DNA في الثلاجة عند درجة 2–8 م .

2.9.2.3 الترحيل الكهربائي للـ DNA على هلام الأكاروز Agaros gel electrophoresis

اتبعت طريقة Prifer (1984) لترحيل الـ DNA على هلام الاكاروز إذ أذيب 0.7 غم من الاكاروز في 90 مل من محلول الـ TBE وبعد التسخين إلى درجة 100 م برد في حمام مائي إلى درجة 50 م تقريبا وأكمل الحجم بالمحلول نفسه إلى 100 مل وأضيف إليه 5 مايكروليتر من محلول صبغة بروميد الاثيديوم (Ethidium Bromide) (بتركيز 5 ملغم / مل) . حضرت صفيحة إسناد الاكاروز (Tray) الزجاجية ثم أضيف الهلام بعد غمس مشط الحفر (Comb) قرب إحدى نهايتي الصفيحة وترك الاكاروز ليتصلب بوضع أفقي لمدة 30 دقيقة تقريباً ، رفع المشط من الهلام المتصلب ثم ثبتت الصفيحة على مساندها في وحدة الترحيل الأفقية غطى الاكاروز المتصلب بمحلول الـ TBE ثم بوشر بتحميل DNA داخل الحفر المتكونة كالآتي : مزج 7 ما يكروليتر تقريباً من الـ DNA مع 3 ما يكروليتر من محلول دارئ التحميل (Loading buffer) , مزجت المحتويات بشكل جيد ثم ملئت في الحفر المخصصة ،رحّلت العينات بجهد كهربائي يقارب 7 فولت / سم ولمدة 1–2 ساعة حتى بلوغ الصبغة الدالة قرب

نهاية الهلام ، تم التقصي عن الـ DNA بعد تعريض الهلام إلى الأشعة فوق البنفسجية بوساطة جهاز UV transilluminator , وتم حساب مستوى التحلل حسب طريقة Risso–De Faverney وجماعته (2001) .

10.2.3تحضير كروموسومات خلايا نقي العظم :

لتحضير كروموسومات خلايا نقي عظم الجرذان والبالغ عددها 42 كروموسوم اتبعت طريقة Tolliver و Robbins (1991) وكالآتي :-

1. حقن الحيوان 0.25 مل من مادة الكولجسين بتركيز (1 ملغم / مل) في التجويف ألخلبي (Intrapretonialy) قبل ثلاث ساعات من عملية القتل للحصول على كروموسومات الطور الاستوائي ومنع الخلايا من إكمال الانقسام الخلوي.

2. ثبت الحيوان على ظهره فوق طبق التشريح وقص الجلد عند منطقة البطن .

3. استخرجت عظام الأطراف الخلفية (عظم الفخذ والساق) عن طريق قطع ارتباط المفصلين وإزالة العضلات .

4. غسل داخل كل عظم بواسطة محقنه حاوية على 3 مل من محلول كلوريد البوتاسيوم المحضر آنيا في أنبوبة اختبار وتم تحريك المحلول بلطف بواسطة ماصة باستور للحصول على معلق خلوي متجانس .

5. حضنت الأنبوبة لمدة ربع ساعة بدرجة 37 م في الحاضنة .

6. نبذت الأنبوبة بسرعة 1500 دورة / دقيقة لمدة دقيقتين .

7. أهمل جزء من الراشح دون إتلاف الطبقة البيضاء وترك حوالي 0.5 مل من الراشح الذي تم تحريكه بلطف بواسطة ماصة باستور.

8. أضيف 3 مل من المحلول المثبت المبرد والمحضر آنيا إلى الأنبوبة حيث يسال على جدران الأنبوبة ببطء بعدها ترك ليركد لمدة 30 ثانية.

9. نبذت الأنبوبة بسرعة 1500 دورة / دقيقة ، أهمل الراشح باستخدام ماصة باستور.

10. أعيدت عملية التثبيت كما في الخطوتين 8 و 9 مرتين .

11. علّقت الخلايا بـ 1 مل من المثبت .

12. حضرت شرائح زجاجية نظيفة ومبردة وتم تقطير من 2−4 قطرات من المحلول على كل شريحة ومن ارتفاع مناسب.

13. تركت الشرائح لتجف بعدها لونت بملون گمزا لمدة عشر دقائق ، غسلت الشرائح بالماء المقطر وتركت لتجف ثم فحصت بوساطة العدسة الزيتية X100 لحساب معامل الانقسام إذ تم تقديره حسب المعادلة الآتية :

معامل الانقسام (%) = (عدد الخلايا المنقسمة ÷ العدد الكلي للخلايا) × 100 (Stich and Sana,1981). كما تم حصر التشوهات الكروموسومية لكل 1000 خلية.

11.2.3 تحضير الخلايا الجنسية (النطف) لذكور الجرذان .

اتبعت طريقة Coles (1980) مع بعض التحوير إذ قص الجلد أسفل التجويف البطني للحيوان ، واستخرج البربخ وقطع في طبق بتري وتم عمل مسحة شريحية منه وثم تركت لكي تجف في الهواء وثبتت بوساطة قطرة من الميثانول لمدة دقيقتين , ولونت الشريحة بوساطة ملون ازرق المثلين (Methylene blue) لمدة من 10 − 12 دقيقة ومن ثم تركت الشريحة لتجف،غسلت بعدها بوساطة دارئ الفوسفات الملحي لإزالة الصبغة وفحصت الشرائح تحت المجهر الضوئي لحصر التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لكل 1000 خلية.

12.2.3 تحضير المقاطع النسيجية .

تم تحضير مقاطع نسجية لكبد الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر ولمدة خمسة أسابيع وقد اتبعت طريقة التحضير التي استعملها Luna (1968) وهي كالآتي :−

1.عملية غسل النماذج (Washing): غسلت النماذج المثبتة بمحلول بوين بالكحول الاثيلي 70% عدة مرات لحين اختفاء اللون الأصفر.

2.عملية سحب الماء من النماذج (Dehydration): مررت النماذج بسلسلة متصاعدة التركيز من الكحول الاثيلي (75%،85%،95%،100%) ولمدة ساعتين لكل تركيز لغرض سحب الماء الموجود داخل النسيج .

3.عملية الترويق (Clearing): مررت النماذج بمحلول الزايلين (xylene) لمدة 1.5 ساعة ولمرتين.

4.عملية الطمر (Embedding): تم طمر النماذج في شمع البارافين (paraffin) ذي درجة انصهار بين 55–60 درجة مئوية ،اذ سكب الشمع في قالب خاص ونقلت النماذج إلى القالب لغرض تقطيعها إلى مقاطع نسجية رقيقة، ثبتت النماذج بابرة ساخنة بعدها برد القالب بسرعة بالماء البارد.

5.عملية الصب (Blocking): أعدت قوالب من الشمع المطمور به النسيج باستعمال قوالب حديدية خاصة مع ملاحظة درجة حرارة البرافين بحيث لا تزيد عن 60 م ، تركت القوالب لليوم التالي لتتصلب بشكل جيد. تم بعد ذلك تقطيع القوالب الجاهزة الحاوية على الأنسجة بسمك سبعة مايكروميتر باستعمال جهاز المقطاع الدوار.

نقلت الأنسجة المقطعة إلى حمام مائي 45 م لغرض بسطها ثم سحبت على شرائح زجاجية مسح سطحها بمادة لاصقة حضرت بطريقة ماير مكونة من بياض البيض مع الكليسرين بنسبة 1:1 ثم تركت لتجف وتلتصق بشكل جيد ، وبعدها تم إذابة الشمع الزائد فيها بعد لصقها مباشرة وذلك بوضعها في الفرن المستعمل في عملية التشبيع الذي درجة حرارته بين (57–60) م لمدة 15 دقيقة ووضعت الشرائح بشكل عمودي في سلة خاصة ووضع تحتها ورقة ترشيح لامتصاص الشمع السائح من المقاطع ، ثم تركت لتبرد بعدها مررت الشرائح بالكحوليات النازلة التركيز لغرض إرجاع النسيج للوسط المائي إذ وضعت لمدة دقيقة ونصف في الزايلول لإذابة بقايا الشمع من النسيج ثم وضعت لمدة دقيقتين بشكل متتالي في الكحوليات النازلة (كحول مطلق، 95%، 70%، ماء مقطر) وبعدها تم تلوينها بملونات ثنائية من الهيماتوكسلين والآيوسين ، ثم إجراء عملية التغطية (Mouting) وباستعمال كندا بلسم وغطاء الشريحة الزجاجية(cover slide) لغرض فحصها بواسطة المجهر.

3.3 التحليل الإحصائي :

تم التحليل الإحصائي باستعمال البرنامج SAS (2001) بتصميم عشوائي كامل (CRD)، كما تم استعمال اختبار دنكن متعدد المدى (Duncan s Multiple Range Test) بحسب Steel و Torrie (1980) على مستوى احتمال0.01.

الفصل الرابع

النتائج Results

1.4 الاختبارات المتعلقة بمستخلص القرنفل :

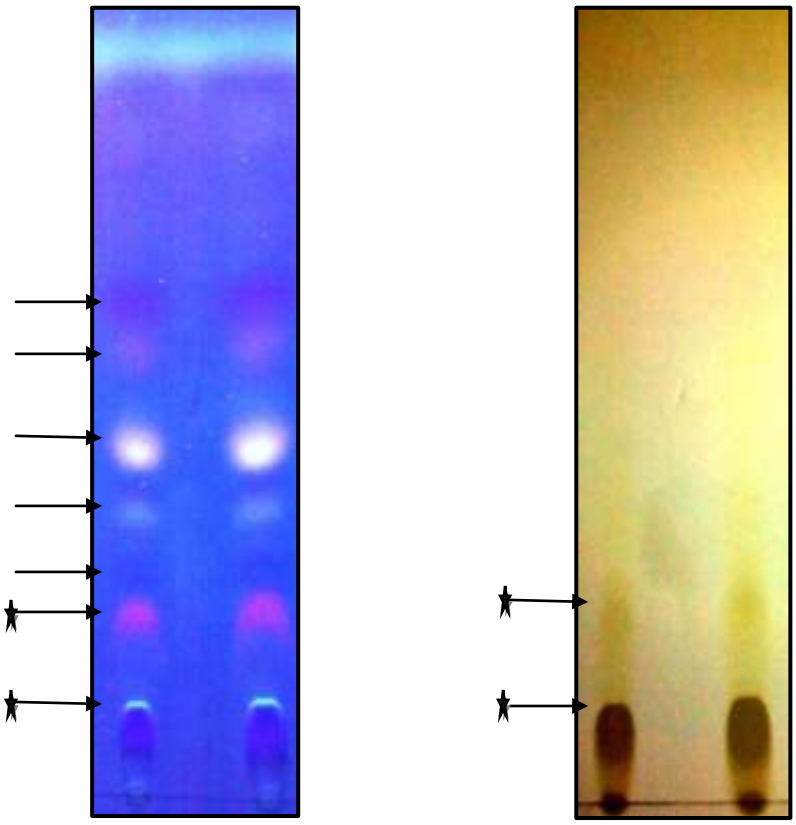
1.1.4 توصيف المستخلص :

يبين الشكلان (4 – 1) ، (4 – 2) نمط ترحيل الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل عند الفحص بالضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية والتي تم تلخيصها في الجدولين (4 – 1) ، (4 – 2) ويبين كل جدول خصائص الحزم من حيث معامل الإعاقة R_f واللون وعدد الحزم الظاهرة ، إذ لوحظ ظهور حزمتين عند الفحص بالضوء المرئي للطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 3 : 1 V/V) وكان R_f = 0.123 , 0.217 وسبعة حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية وتراوحت قيم الـ R_f لها بين 0.123 – 0.833 ، وأما عند استخدام الطور السائل(حامض الخليك : ماء مقطر : بيوتانول 3: 5: 12 V / V / V) لوحظ ظهور أربعة حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي وتراوحت قيم الـ R_f لهذه الحزم بين 0.65 – 0.8 في حين لوحظ ظهور ستة حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية وتراوحت قيم الـ R_f لها بين 0.6 – 0.84 ، وتشير هذه النتائج إلى وجود أكثر من مكون مختلف في المستخلص الميثانولي المائي للبراعم الزهرية للقرنفل عند استخدام أكثر من طور سائل .

جدول (4−1): 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**



(ب) (أ)

شكل (4-1) يوضح ترحيل المستخلص الميثانولي للقرنفل على صفائح TLC باستخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/ v) .

تشير الأسهم إلى الحزم المفصولة .

أ- عند الفحص بالضوء المرئي.

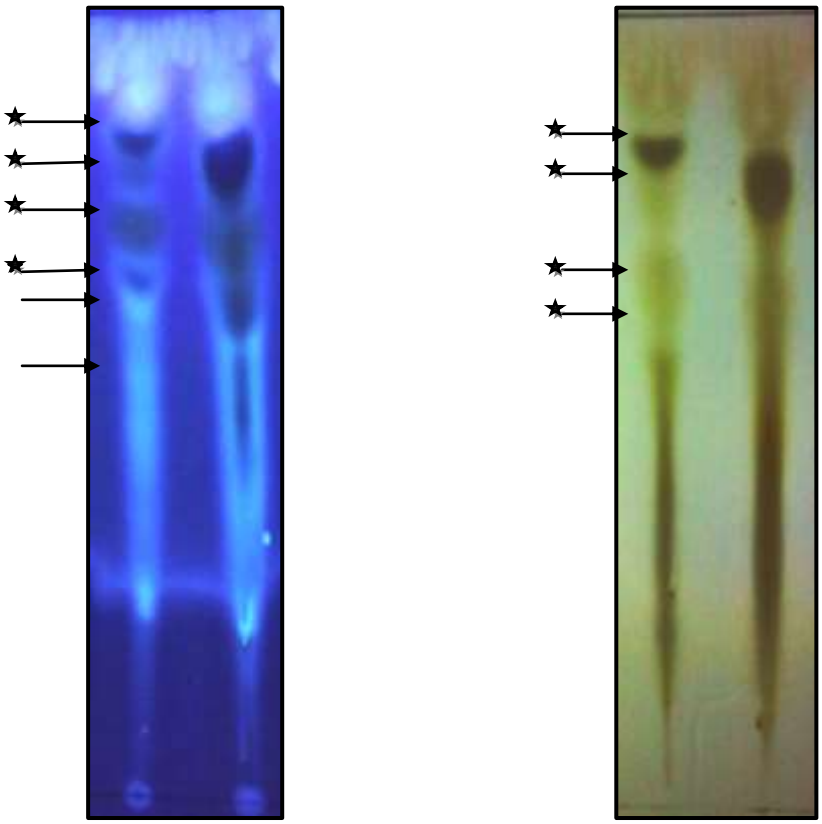
ب- عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية.

★ الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية.

جدول (4−2): توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام الطور السائل (حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60: 25 : 15 V/V/V).

طريقة الفحص	خصائص الحزم		العدد
	R_f	اللون	
الضوء الاعتيادي (المرئي)	0.64*	بني فاتح	4
	0.73*	برتقالي	
	0.80*	بني غامق	
	0.84*	بني غامق	
الأشعة فوق البنفسجية	0.52	ازرق غامق	6
	0.60	ازرق غامق	
	0.64*	ازرق غامق	
	0.73*	بني	
	0.80*	نيلي	
	0.84*	بني فاتح	

*** الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية.**



(ب) (أ)

شكل (4–2) يوضح ترحيل المستخلص الميثانولي للقرنفل على صفائح TLC باستخدام الطور السائل (حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60: 25 : 15 V/V/V).

تشير الأسهم إلى الحزم المفصولة .

أ– عند الفحص بالضوء المرئي.

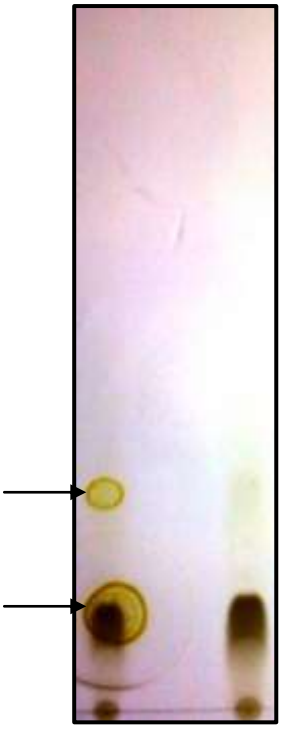
ب– عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية.

★ الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والأشعة فوق البنفسجية.

2.1.4 اختبار الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين:

يوضح الشكلان (4–3) و (4–4) نتائج فحص الفعالية المضادة للأكسدة لمستخلص القرنفل باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين وقد أظهرت النتائج وجود فعالية جيدة للمستخلص مضادة للأكسدة في حزمتين الـ R_f ـ 0.12 , 0.21 عند استخدام الطور السائل (هكسان :

خلات الاثيل 1:3 v/ v)، وفي ثلاث حزم الـ R_f ـ 0.65 , 0.73 , 0.84 عند استخدام الطور السائل (حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60:25:15 V/V/V) ، والمشار اليها في الجدولين (4−3) و (4−4) ، وقد تم تعيينها من خلال احتفاظها باللون الاصفر في حين اظهرت الحزم الباقية نتيجة سلبية للفحص وبذلك فان هذه النتائج تشير الى امتلاك مستخلص القرنفل فعالية مضادة للأكسدة .

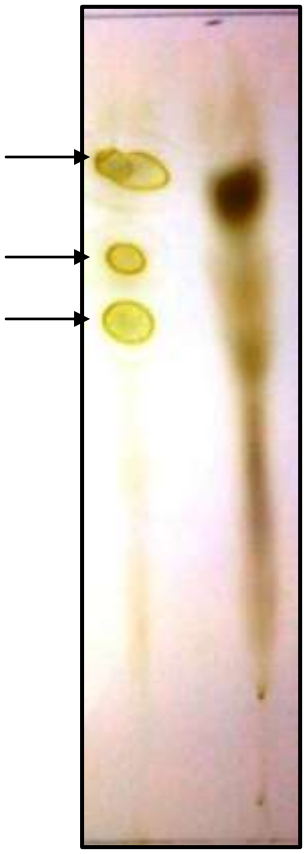


(أ) (ب)

شكل (4−3) فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(هكسان : خلات الاثيل 1:3 v/v)

(أ) قبل الرش (ب) بعد الرش

- **الأسهم تشير إلى الحزم ذات الفعالية المضادة للأكسدة (التي احتفظت باللون الأصفر)**



(ب) (أ)

شكل(4-4) فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60:25:15 V/V/V).

(أ) قبل الرش (ب) بعد الرش

- **الأسهم تشير إلى الحزم ذات الفعالية المضادة للأكسدة (التي احتفظت باللون الأصفر)**

جدول(4−3):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 الأصفر)

− : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة

جدول(4-4):نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بطريقة الرش بالبيتاكاروتين باستخدام الطور السائل(حامض الخليك: ماء مقطر: بيوتانول60:25:15 V/V/V).

الحزمة R_f	نتيجة الفحص
0.52	-
0.60	-
0.64	+
0.73	+
0.80	-
0.84	+

+ : وجود فعالية مضادة للأكسدة (الحزم التي احتفظت باللون الأصفر)

- : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة

3.1.4 الكشف الكيميائي العام للمركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل :

يوضح جدول (4-5) نتائج الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة الموجودة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل إذ دل على احتواء المستخلص على عدد من المركبات الفعالة المهمة جدا والتي تعد منتجات ايض ثانوي ، حيث احتوى المستخلص على الصابونيات والفلافونيدات والكلايكوسيدات والراتنجات والتانينات والقلويدات والكاربوهيدرات وكذلك التربينويدات الثلاثية ، فيما لم يحتوي المستخلص على الفينولات والكومارينات .

جدول (4–5): الكشف الكيميائي العام للمركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.

المركبات الفعالة	الكاشف المستخدم	دليل الكشف الموجب	النتيجة
التانينات	• خلات الرصاص1% • كلوريد الحديديك1%	راسب هلامي لون اخضر مزرق	+ +
الراتنجات	مستخلص كحولي مضاف إليه 4% HCl	عكورة	+
الصابونيات	• الرج الشديد للمستخلص • كلوريد ألزئبقيك 1%	رغوة كثيفة راسب ابيض	+ +
الكومارين	ورقة ترشيح مشبعة بالمستخلص +NaOH ثم تعرض إلىU.V	لون اخضر مصفر	–
الفلافونيدات	• هيدروكسيد البوتاسيوم الكحولي • حامض الكبريتيك المركز	لون اصفر لون اصفر غامق	+ +
الكاربوهيدرات	• الفينول مع حامض الكبريتيك المركز • موليش	لون احمر بني حلقة بنفسجية	+ +
القلويدات	• واكنر • ماير	راسب بني راسب ابيض أو عكورة	+ +
الكلايكوسيدات	• فهلنك • بندكت	راسب احمر راسب احمر	+ +
الفينولات	كلوريد ألحديديك 1%	لون اخضر مزرق	–
التربينيدات الثلاثية	حامض الكبريتيك المركز + كلوروفورم	لون احمر أو ارجواني	+
الأس الهيدروجينيpH	pH - meter		4.9

(+) تشير إلى أن الكشف موجب أي وجود مادة فعالة.

(–) تشير إلى أن الكشف سالب أي عدم وجود مادة فعالة.

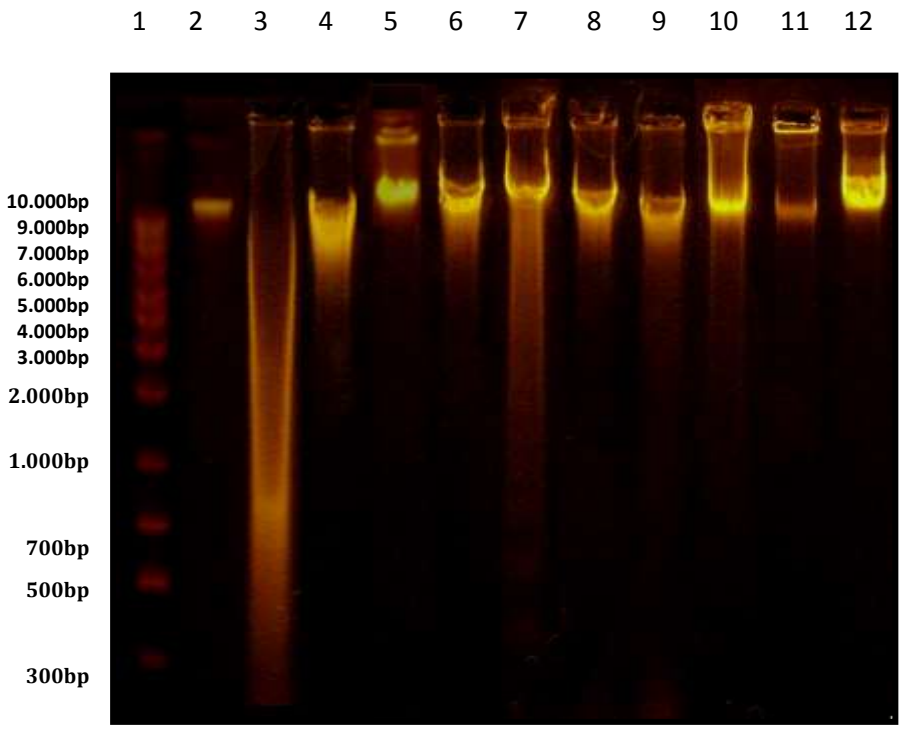
2.4 الاختبارات البيولوجية الجزئية والوراثية الخلوية:

1.2.4 تحلل DNA خلايا الدم البيض للجرذان المعاملة بالمايتومايسين ومستخلص القرنفل:

يبين الجدول (4–6) مستوى التحلل الحاصل في الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيض للجرذان ، إذ لوحظ أن الجرذان المعاملة بالمايتومايسين بجرعة 2 ملغم/كغم أظهرت مستوى عالي من التحلل للـ DNA بمسحة تراوحت من 300–10000 زوج قاعدي وبحجم جزيئي 9700 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة السالبة التي أعطت حزمة بحجم جزيئي 10000 زوج قاعدي إذ بلغ مستوى التحلل 0 زوج قاعدي ، أما عند إجراء التداخل بين المستخلص بجرعة 500 ملغم/كغم (قبل) ،(مع) ،(بعد) المطفر بجرعة 2 ملغم/كغم لوحظ انخفاض في مستوى تحلل الـ DNA فقد أعطت المعاملة (قبل) مسحة تراوحت من 4000–10000 وبمستوى تحلل 6000 زوج قاعدي ، أما المعاملة (مع) فقد أظهرت مستوى تحلل بحجم جزيئي 2000 زوج قاعدي وبمسحة تراوحت من 8000–10000 زوج قاعدي ومعاملة التداخل (بعد) أظهرت مستوى تحلل بحجم جزيئي 4000 زوج قاعدي وبمسحة تراوحت من 6000–10000 زوج قاعدي . وبالنسبة للمعاملة بالمستخلص مع المطفر بالجرع المعتمدة ولمدة خمسة أسابيع لوحظ أيضا انخفاض مستوى تحلل الـ DNA، فالأسبوع الأول من التجريع بالمستخلص مع المطفر أعطى مسحة تراوحت من 6000–10000 زوج قاعدي وبحجم جزيئي 4000 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة الموجبة التي أعطت مسحة من 1000–10000 زوج قاعدي وبمستوى تحلل بلغ 9000 زوج قاعدي، أما الأسبوع الثاني والثالث فقد أعطت مسحة تراوحت من 5000–10000 زوج قاعدي وبمستوى تحلل 5000 زوج قاعدي لكليهما ، بينما اظهر الأسبوع الرابع مستوى تحلل بحجم جزيئي 2000 زوج قاعدي وبمسحة تراوحت من 8000–10000 زوج قاعدي ، واظهر الأسبوع الخامس مستوى تحلل بلغ 1000 زوج قاعدي وبمسحة تراوحت من 9000–10000 زوج قاعدي .

جدول(**4–6**): **يبين مستوى تحلل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء لذكور الجرذان بعد المعاملة** بالمايتومايسين **والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل لثلاثة تداخلات (قبل ،مع، بعد) وللتداخل (مع) لمدد مختلفة.**

رقم المجال في الشكل (4–5)	التداخل	bp الحجم الجزيئي التقريبي (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	مايتومايسين أسبوع واحد	1000–10000	9000
8	التداخل (مع) أسبوع أول	6000–10000	4000
9	التداخل (مع) أسبوع ثاني	5000–10000	5000
10	التداخل (مع) أسبوع ثالث	5000–10000	5000
11	التداخل (مع) أسبوع رابع	8000–10000	2000
12	التداخل (مع) أسبوع خامس	9000–10000	1000



شكل (4–5) يبين نمط الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء لذكور الجرذان بعد المعاملة بالمايتومايسين و المستخلص 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 المايتومايسين (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 لمدة أسبوع واحد.
8. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر أسبوع أول.
9. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر أسبوع ثاني.
10. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر أسبوع ثالث.
11. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر أسبوع رابع .
12. DNA دم الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر أسبوع خامس.

2.2.4 دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان :

1.2.2.4 تأثير التداخل بين المستخلص النباتي و المطفر في متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان.

يوضح الجدول (4−7) معدل معامل الانقسام MI لخلايا نقي العظم للجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين و500 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل في ثلاثة تداخلات ، إذ لوحظ ظهور انخفاض في معدل انقسام الخلايا عند المعاملة بعقار المايتومايسين (السيطرة الموجبة) والذي بلغ 1.16 وكان الانخفاض عالي المعنوية (P<0.01) عند المقارنة مع متوسط معامل الانقسام للسيطرة السالبة والذي بلغ 3.2 في حين لوحظ زيادة معامل الانقسام الخيطي عند إجراء التداخلات الثلاثة بين المستخلص و المطفر(قبل،مع ،بعد) . وقد كانت المعاملة بالمستخلص مع وبعد المطفر الأفضل في رفع قيمة معامل الانقسام فقد ارتفعت إلى 2.43 و2.13 على التوالي مقارنة بالسيطرة الموجبة 1.16 إذ كان الفرق معنويا (p< 0.01)، كما إن المعاملة بالمستخلص مع المطفر لم تعط أي فرق معنوي بالمقارنة مع السيطرة السالبة (p> 0.01) بينما أعطت المعاملة بالمستخلص بعد المطفر فرقا معنويا عند المقارنة بالسيطرة السالبة (p>0.01).أما المعاملة بالمستخلص قبل المطفر والتي بلغ فيها متوسط معامل الانقسام 1.68 فقد أعطت فرقا معنويا عند المقارنة مع السيطرة السالبة كما أنها لم تعط أي فرق معنوي بالمقارنة مع السيطرة الموجبة(p< 0.01).

جدول (4–7): 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 قبل المطفر	1.68 ± 0.24 CD
المستخلص مع المطفر	2.43 ± 0.01 AB
المستخلص بعد المطفر	2.13 ± 0.01 BC

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

M :المعدل

SE :الخطأ القياسي

2.2.2.4 تأثير تداخل المستخلص النباتي مع المطفر في متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان ولمدد مختلفة.

أظهرت النتائج الموضحة في جدول (4–8) إن هناك اختلافاً في قيمة متوسطات معامل الانقسام الخيطي MI لخلايا نقي عظم الجرذان خلال خمسة أسابيع من التجريع المستمر بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي ، إذ بلغت قيمة MI لحيوانات السيطرة الموجبة المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من المطفر ولمدة أسبوع واحد 0.96 وبفارق معنوي (P<0.01) عن السيطرة السالبة التي كانت قيمة MI 3.2 ، كما إن المعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الأول قد رفعت قيمة متوسط MI إلى 1.93 وبفارق معنوي مقارنة مع السيطرة الموجبة 0.96 ولكنها لم تصل إلى السيطرة السالبة إذ كانت هناك فروقا معنوية ، كذلك فان قيمة متوسط MI للمعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الثاني التي بلغت 2.03 لم تعطي فروقا معنوية (P>0.01) بالمقارنة مع قيمة متوسط MI للمعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الأول، وأيضا لم يشكل قيمة متوسط MI للمعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الثالث وهي 2.16 أي فارق معنوي بالمقارنة مع قيمة متوسط معامل الانقسام MI للمعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الثاني ، أما المعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الرابع فقد رفعت قيمة متوسط MI والتي بلغت 2.73 بشكل معنوي (P<0.01) بالمقارنة مع المعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الثالث في حين لم تعط فرقا معنويا مع السيطرة السالبة ، بينما لم ترتفع قيمة متوسط معامل الانقسام في المعاملة بالمستخلص مع المطفر للأسبوع الخامس والتي كانت 2.7 بالمقارنة مع قيمته للأسبوع الرابع من التجريع حيث لم تعط اي فرق معنوي كما لم تعط فرقا معنويا مع السيطرة السالبة .

جدول (4-8): 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±0.1 A
السيطرة الموجبة (مطفر أسبوع)	0.96 ±0.09 C
المستخلص مع المطفر (أسبوع أول)	1.93±0.01 B
المستخلص مع المطفر (أسبوع ثاني)	2.03±0.0 B
المستخلص مع المطفر (أسبوع ثالث)	2.16±0.03 B
المستخلص مع المطفر (أسبوع رابع)	2.73±0.01 A
المستخلص مع المطفر (أسبوع خامس)	2.7 ±0.21 A

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

M :المتوسط

SE :الخطأ القياسي

3.2.4 دراسة التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان .

1.3.2.4 تـأثير التـداخل بـين المسـتخلص النبـاتي و المطفـر فـي متوسـط التشـوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان.

أظهرت خلايا نقي عظم الجرذان تغيرات كروموسومية مختلفة عند معاملة الحيوانات بعقار المايتومايسين وبتركيز 2 ملغم/كغم كما موضح في جدول (4–9) إذ بلغ متوسط التشوهات الكروموسومية في حيوانات السيطرة الموجبة 26.0 مقارنة بالسيطرة السالبة التي بلغت 5.33 وبفارق معنوي ($P<0.01$) ، كما أظهرت التداخلات الثلاثة (قبل ،مع ، بعد) انخفاضا في متوسط التشوهات ، حيث أدت المعاملة بالمستخلص مع و بعد المطفر إلى خفض متوسط التشوهات إلى 14.0، 14.0 على التوالي وبفرق معنوي ($P<0.01$) بالمقارنة مع السيطرة الموجبة 26.0 كما إنها لم تصل إلى متوسط التشوهات للسيطرة السالبة 5.33 إذ شكلت أيضا فرقا معنويا معها . بينما لم تعط المعاملة بالمستخلص قبل المطفر والتي بلغ فيها متوسط التشوهات 19.66 فرقا معنويا ($P>0.01$) بالموازنة مع السيطرة الموجبة ، كما لم تعط فرقا معنويا مقارنة مع متوسط التشوهات الكروموسومية للمعاملتين السابقتين(مع ، بعد).

جدول (4−9): 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	2.0 ± 0.57 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	6.33 ± 0.8 AB	2.0± 1.0 A	5.33± 0.88 A	26.0± 1.0 A
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
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

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

M :المتوسط

SE :الخطأ القياسي

2.3.2.4 تأثير تداخل المستخلص النباتي مع المطفر في متوسط التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان ولمدد مختلفة .

بينت نتائج تحليل التباين لدراسة تأثير تداخل المستخلص النباتي مع المطفر في متوسط التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان كما في جدول (4–10) أن الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص ولمدة سبعة أيام قد انخفض فيها متوسط التشوهات الكروموسومية إذ بلغت 14.66 وبفارق معنوي ($p<0.01$) بالمقارنة مع متوسط التشوهات للجرذان المعاملة بعقارالمايتومايسين ولمدة سبعة أيام والتي مثلت السيطرة الموجبة إذ بلغ متوسط التشوهات 24.33 كما إنها لم تصل إلى السيطرة السالبة التي بلغت 5.33 إذ كان هناك فرق معنوي ، أما متوسطات التشوهات الكروموسومية للأسبوع الثاني والأسبوع الثالث والأسبوع الرابع من التجريع بالمستخلص مع المطفر بالجرعة المنتخبة ، والتي بلغت 12.0 ، 12.33 ، 12.66 على التوالي فلم تعط أي فرق معنوي ($p>0.01$) بالمقارنة فيما بينها أو بالمقارنة مع متوسط التشوهات للأسبوع الأول أو بالمقارنة بالسيطرة السالبة 5.33 ، كما لم تعط المعاملة للأسبوع الرابع من التجريع بالمستخلص مع المطفر 12.66 فرقا معنويا بالمقارنة مع متوسط التشوهات للأسبوع الخامس من المعاملة ، بينما لم تشكل المعاملة بالمستخلص مع المطفر ولمدة خمسة أسابيع أي فرق معنوي مع السيطرة السالبة ($p>0.01$) إذ كان متوسط التشوهات الكروموسومية 9.0 .

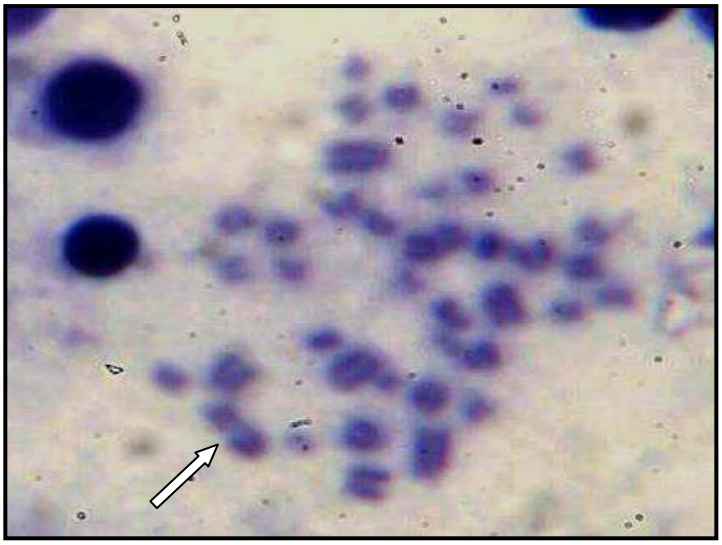
جدول (4−10): متوسط التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي ولمدد مختلفة.

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 أسبوع)	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 (أسبوع أول)	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 (أسبوع 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 (أسبوع 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 (أسبوع 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 (أسبوع 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

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

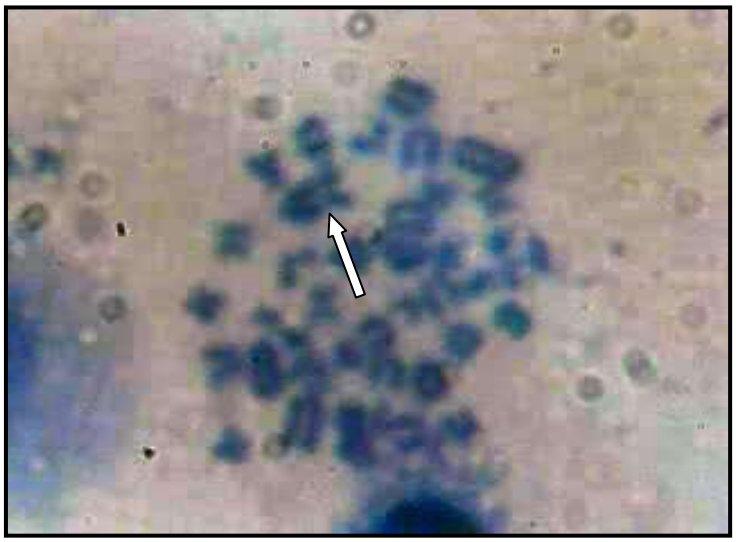
M :المتوسط

SE :الخطأ القياسي



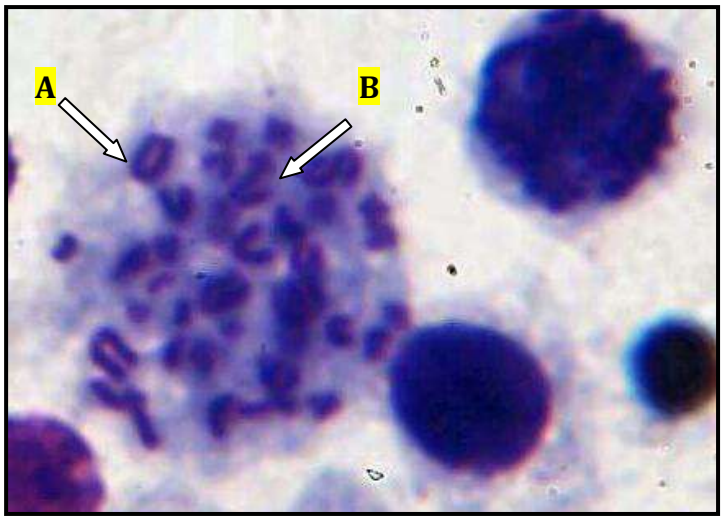
شكل (4–6) كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

يشير السهم إلى كسر كروموسومي .



شكل (4–7) كسر كروماتيدي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

يشير السهم إلى كسر كروماتيدي .



شكل (4–8) كروموسوم حلقي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

A يشير السهم إلى كروموسوم حلقي.

B يشير السهم إلى كسر كروماتيدي.

شكل (4–9) فرط المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

شكل (4–10) قلة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (1000X ، صبغة گمزا) .

4.2.4 دراسة التشوهات في الحيوانات المنوية للجرذان .

1.4.2.4 تأثير التداخل بين المستخلص النباتي و المطفر في متوسط تشوهات النطف لذكور الجرذان.

بينت نتائج الدراسة الحالية عند تحليل التباين أن متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان المعاملة بعقار المايتومايسين وبتركيز 2 ملغم/كغم (السيطرة الموجبة) كما موضح في جدول (4–11) كان مرتفع بشكل عالي المعنوية ($p<0.01$) إذ بلغ 953.3 من 1000 خلية مقارنة مع متوسط تشوهات النطف في السيطرة السالبة الذي كان159.6 ، كما أوضحت النتائج أيضا إن معاملة تداخل المستخلص مع المطفر والمستخلص بعد المطفر أدت إلى انخفاض متوسط التشوهات وبشكل معنوي ($p<0.01$) مع السيطرة الموجبة وكانت 630.6،591 على التوالي ولكن كليهما لم يصل إلى السيطرة السالبة إذ كانت بينهما فروق معنوية، ولم تشكل معاملة تداخل المستخلص قبل المطفر أي فرق معنوي ($p>0.01$) مع السيطرة الموجبة بينما شكلت فرقا معنويا($p<0.01$) عند المقارنة مع السيطرة السالبة .

جدول (4-11): متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين وجرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي في ثلاثة تداخلات.

التشوه / المعاملة	فاقد الذنب M± SE	فاقد الرأس M± SE	مشوه القطعة الوسطية M± SE	مشوه الذنب M± SE	فاقد كلاب الرأس M± SE	منحرف كلاب الرأس M± SE	رأس مفصص M± SE	مجموع التشوهات M± SE
السيطرة السالبة	87.33±21.18 C	24.33±3.28 C	12.0±0.57 C	5.0±1.73 B	22.3±5.1 B	8.0±3.2 C	0.66±0.66 C	159.6±14.14 C
السيطرة الموجبة	318.66±63.8 AB	285.0±54.6 A	44.0±6.8 A	174.0±88.0 A	91.33±67.4 AB	15.0±1.15 ABC	25.3±9.0 A	953.3±12.9 A
المستخلص قبل المطفر	403.0±62.5 A	241.66±51.9 AB	20.66±2.3 BC	56.6±20.2 AB	114.0±25.0 AB	28.66±10.3 AB	18.3±5.0 AB	883.0±42.5 A
المستخلص مع المطفر	256.3±29.7 AB	131.33±34.9 BC	33.0±8.0 AB	111.33±25.8 AB	46.0±10.5 B	11.66±3.5 BC	5.66±3.66 BC	591.0±43.55 B
المستخلص بعد المطفر	207.0±392 BC	93.66±7.1 C	47.66±5.2 A	34.0±3.0 AB	200.3±16.8 A	33.3±4.9 A	14.6±2.8 ABC	630.6±68.5 B

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

M :المتوسط

SE :الخطأ القياسي

2.4.2.4 تـأثير تـداخل المسـتخلص النبـاتي مـع المطفـر فـي متوسـط تشـوهات نطـف ذكـور الجرذان ولمدد مختلفة .

يوضح الجدول (4−10) متوسطات التشوهات الحاصلة في نطف ذكور الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص ولمدد مختلفة ، إذ أوضحت النتائج أن متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان المعاملة بالجرعة المنتخبة من العقار (السيطرة الموجبة) والذي بلغ 913.7 من 1000 خلية قد ارتفع وبشكل عالي المعنوية ($p<0.01$) ، بالمقارنة مع متوسط التشوهات في السيطرة السالبة وهو 159.7 ، كما أدت المعاملة بالمستخلص مع العقار للأسبوع الأول إلى خفض متوسط التشوهات الذي بلغ 585 وبشكل معنوي ($p<0.01$) مقارنة مع متوسط التشوهات للسيطرة الموجبة إلا انه لم يصل إلى السيطرة السالبة إذ كان هناك فارق معنوي عند المقارنة فيما بينهما ، بينما لم تشكل متوسطات المعاملات بالمستخلص مع العقار للأسبوع الثاني والأسبوع الثالث والأسبوع الرابع والتي بلغت قيمها 420.3، 402.3، 360.7 على التوالي أية فروق معنوية ($p>0.01$) عند المقارنة فيما بينها أو بينها وبين متوسط التشوهات للأسبوع الأول ، كما لم تعط المعاملة بالمستخلص مع العقار للأسبوع الخامس والتي بلغ فيها متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان 173.3 أي فرق معنوي($p>0.01$) مع المعاملات السابقة الذكر كما لم تعط فرقا معنويا مع السيطرة السالبة.

جدول (4-12): متوسط التشوهات في نطف ذكور الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم / كغم من عقار المايتومايسين مع جرعة 500 ملغم / كغم من المستخلص النباتي لمدة خمسة أسابيع.

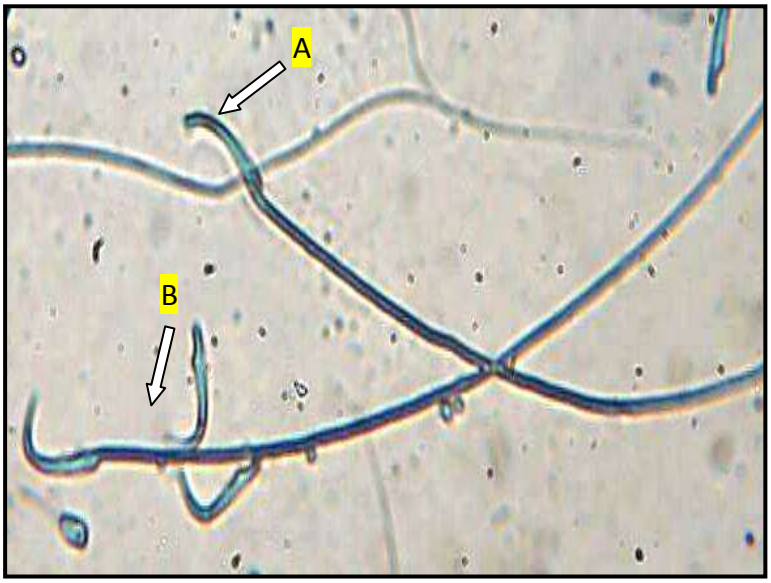
التشوه / المعاملة	فاقد الذنب M± SE	فاقد الرأس M± SE	مشوه القطعة الوسطية M± SE	مشوه الذنب M± SE	فاقد كلاب الرأس M± SE	منحرف كلاب الرأس M± SE	رأس مفصص M± SE	مجموع التشوهات M± SE
السيطرة السالبة	87.3±21.1 A	24.3±3.2 B	12.0±0.5 B	5.0±1.7 B	22.0±5.1 B	8.0±3.2 B	0.6±0.6 B	159.7±14.1 C
السيطرة الموجبة (مطفر أسبوع)	194.0±48.5 A	134.6±3.75 AB	223.0±16.16 A	59.0±4.0 A	122.6±2.02 A	135.0±24.8 A	12.0±1.15 A	913.7±32.5 A
المستخلص مع المطفر (أسبوع أول)	194.66±86.7 A	220.0±80.77 A	15.0±4.1 B	38.33±11.5 A	63.3±20.3 B	44.66±9.73 B	9.0±4.0 A	585.0±179.7 B
المستخلص مع المطفر (أسبوع ثاني)	190.0±92.7 A	83.0±27.09 B	21.0±2.51 B	39.6±13.69 A	61.66±11.8 B	24.0±13.01 B	2.0±0.5 B	420.3±119.8 CB
المستخلص مع المطفر (أسبوع ثالث)	117.6±18.6 A	92.3±55.95 B	27.0±9.53 B	64.33±11.66 A	79.0±40.14 AB	19.0±1.15 B	2.66±1.4 B	402.3±106.6 CB
المستخلص مع المطفر (أسبوع رابع)	104.6±24.7 A	59.6±27.33 B	27.6±13.67 B	65.0±11.67 A	40.6±8.66 B	26.6±1.2 B	3.0±1.52 B	360.7±50.1 CB
المستخلص مع المطفر (أسبوع خامس)	58.0±0.5 A	14.3±1.7 B	10.6±3.3 B	41.3±7.4 A	22.6±5.8 B	23.6±2.4 B	2.6±1.4 B	173.3±9.2 C

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

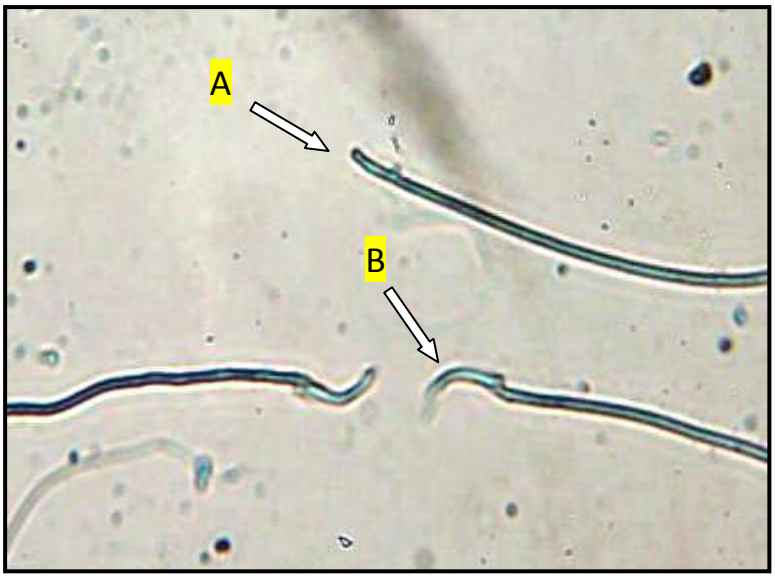
M :المتوسط

SE :الخطأ القياسي

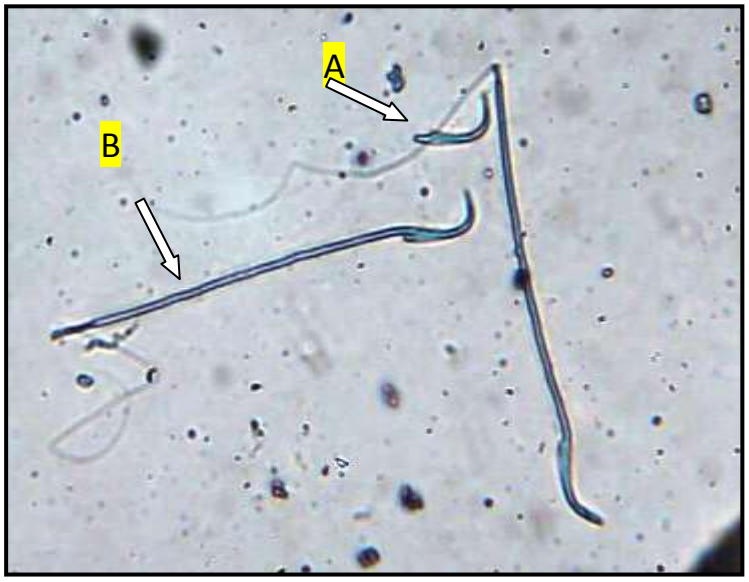
شكل (4-11) نطفة مشوهة القطعة الوسطية في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).
تشير الأسهم إلى نطف مشوهة القطعة الوسطية.



شكل (4-12) نطفة فاقدة كلاّب الرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).
A يشير السهم إلى نطفة فاقدة كلاّب الرأس.
B يشير السهم إلى نطفة طبيعية.



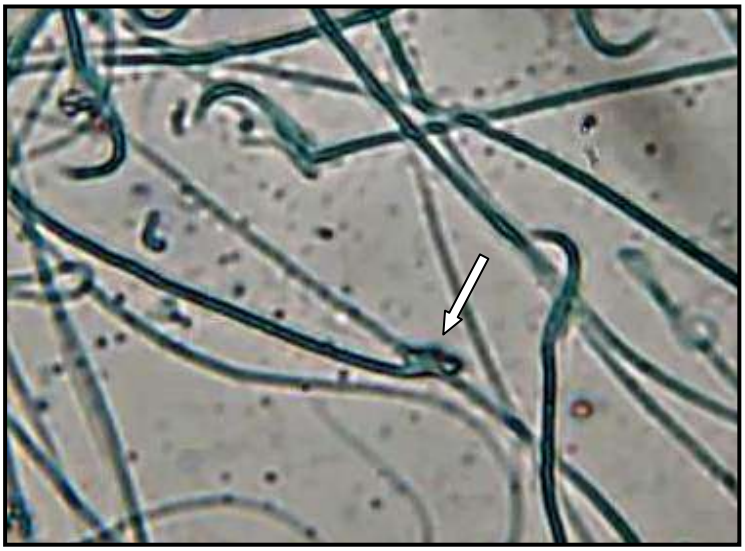
شكل (4-13) نطفة فاقدة للرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).
A يشير السهم إلى نطفة فاقدة للرأس.
B يشير السهم إلى نطفة منحرفة كلاّب الرأس.



شكل (4-14) نطفة فاقدة للذنب في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).
A يشير السهم إلى نطفة فاقدة للذنب .
B يشير السهم إلى نطفة مشوهة الذنب.

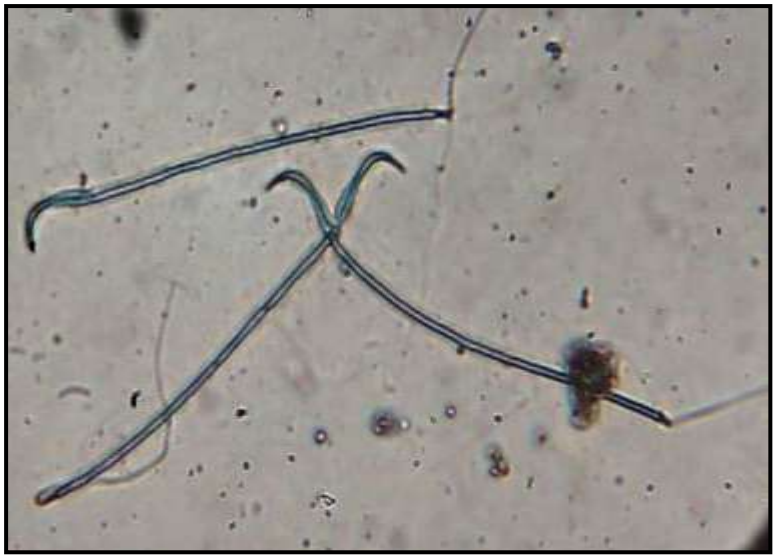
شكل (4-15) نطفة منحرفة كلاّب الرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).

يشير السهم إلى نطفة منحرفة كلاّب الرأس.



شكل (4-16) نطفة مفصصة الرأس في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).

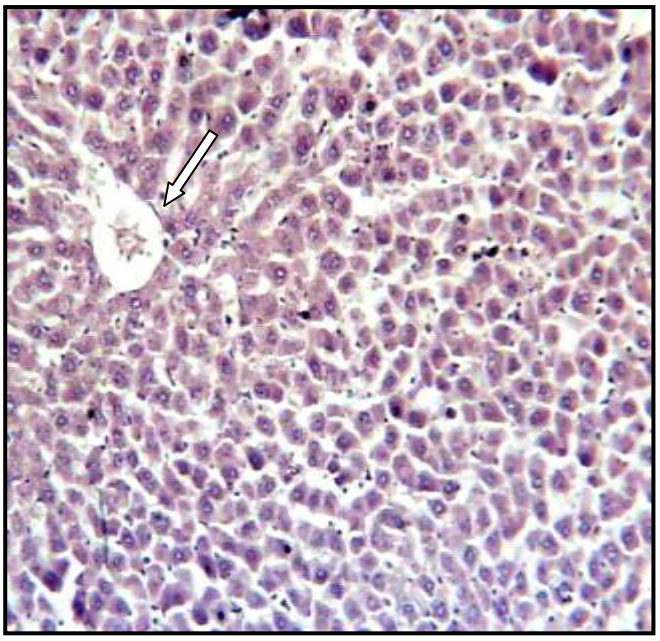
يشير السهم إلى نطفة مفصصة الرأس.



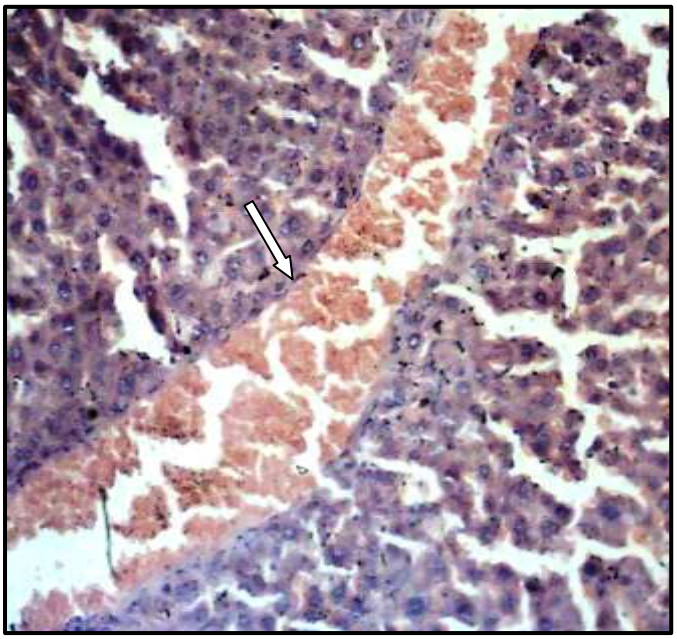
شكل (4–17) نطف مشوهة الذنب في ذكور الجرذان المعاملة بالمايتومايسين والمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل (400X ، صبغة ازرق المثيلين).

3.4 دراسة التغيرات النسجية.

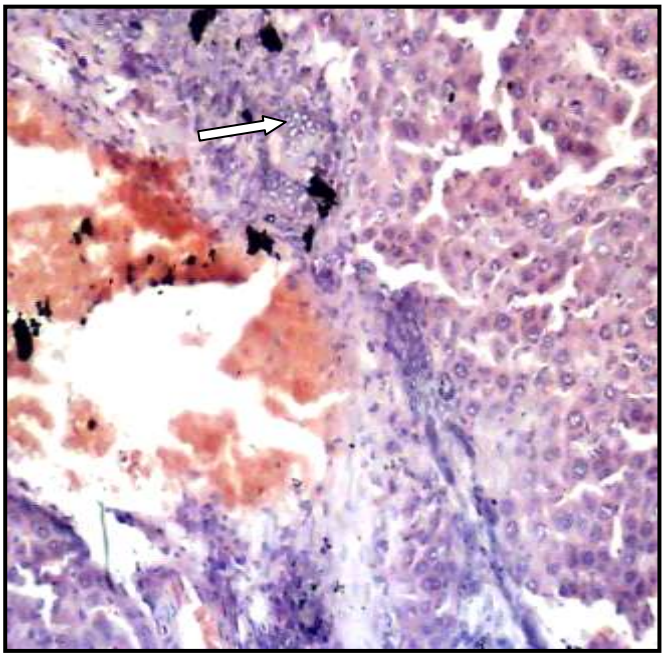
أظهرت نتائج الفحص ألمجهري لكبد الجرذان المعاملة بعقار المايتومايسين بجرعة 2 ملغم/كغم ولمدة أسبوع واحد (السيطرة الموجبة) بالمقارنة مع السيطرة السالبة شكل(4–18) حدوث تغيرات نسيجية واضحة ومختلفة ، فقد أدى إلى حدوث تنخر(Necrosis) ونزف دموي (Hemorrhage) في نسيج الكبد كما في شكل(4–19) كما أدى إلى حدوث ارتشاح (Infiltration) وتضرر للنسيج كما في شكل (4–20) ويلاحظ في شكل (4–21) أن العقار سبب عدم انتظام الحبال الكبدية حول الوريد المركزي (central vein) ، بينما أظهرت نتائج الفحص ألمجهري لكبد الجرذان المعاملة بالمستخلص مع المطفر وللجرعة المنتخبة وللأسبوع الأول تحسن مظهري واضح للنسيج ،إذ يلاحظ وجود الوريد المركزي وقناة الصفراء ووضوح الحبال الكبدية والخلايا والجيوب الكبدية شكل (4–22) ، ويبين شكل (4–23) نسيج الكبد للجرذان المعاملة للأسبوع الثاني وضوح الوريد المركزي والفصيص الكبدي مع تراص الخلايا الكبدية ، أما المعاملة للأسبوع الثالث فلم تؤد إلى أي خلل نسجي أيضا شكل (4– 24) ، ويلاحظ انتظام الحبال الكبدية وتجاويف مابين الحبال الكبدية في نسيج الكبد للجرذان المعاملة للأسبوع الرابع شكل (4–25) ، كما لم تعط المعاملة للأسبوع الخامس أي تغيرات نسجية مرضية شكل (4–26).



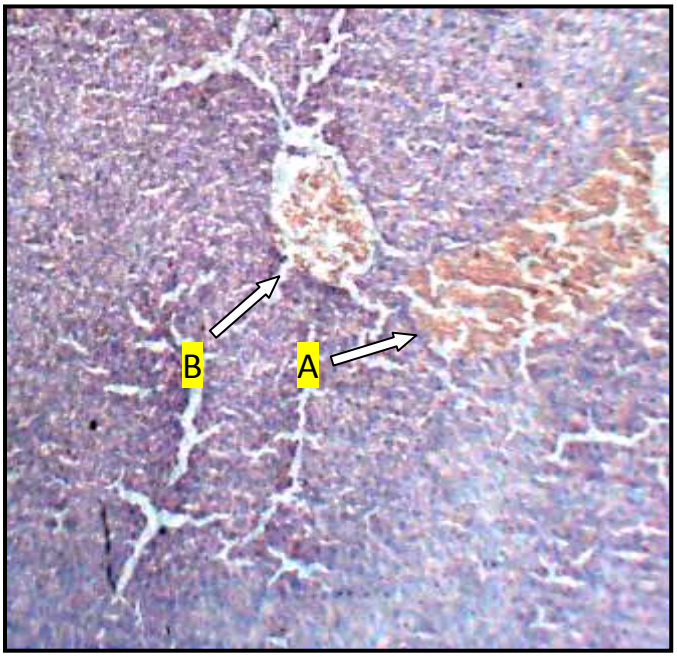
شكل (4-18) مقطع مستعرض لكبد جرذ طبيعي (100X صبغة H&E).يشير السهم إلى الوريد المركزي



شكل (4-19) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمايتومايسين لأسبوع واحد يوضح تنخر النسيج ونزف دموي (100X صبغة H&E). يشير السهم إلى النزف الدموي.

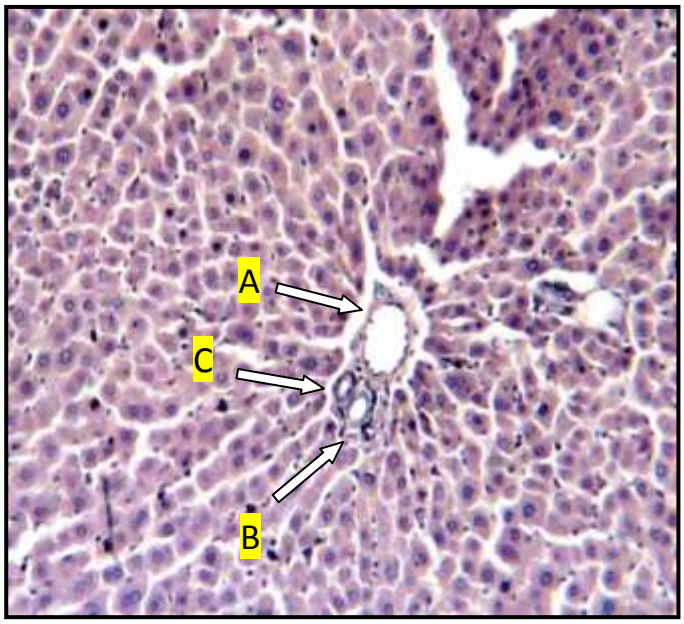


شكل (4-20) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمايتومايسين لأسبوع واحد يوضح نزف دموي و ارتشاح وتضرر النسيج (100X صبغة H&E).
يشير السهم الى الارتشاح.



شكل (4-21) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمايتومايسين لاسبوع واحد يوضح نزف لوعاء دموي(40X صبغة H&E).

A يشير السهم الى نزف لوعاء دموي.
B يشير السهم الى الوريد المركزي .

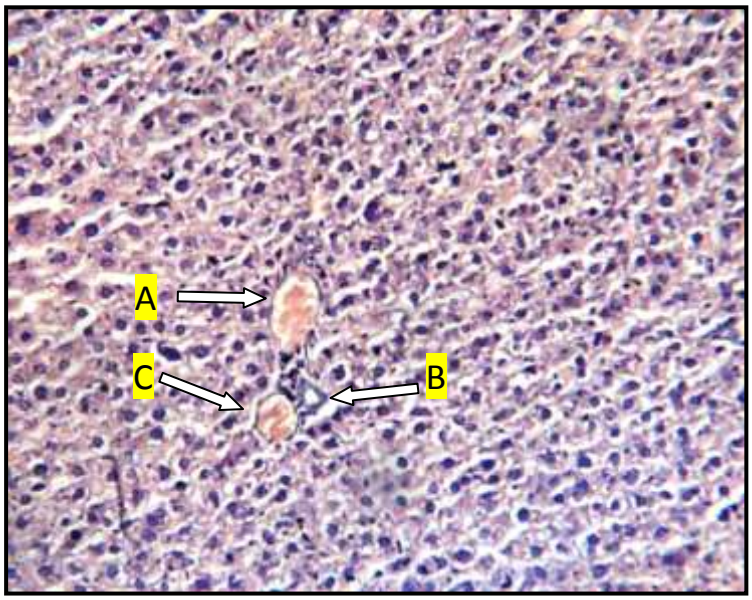


شكل (4-22) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لأسبوع واحد (100X صبغة H&E).

A يشير السهم إلى الوريد المركزي.
B يشير السهم إلى قناة الصفراء .
C يشير السهم الى وريد.

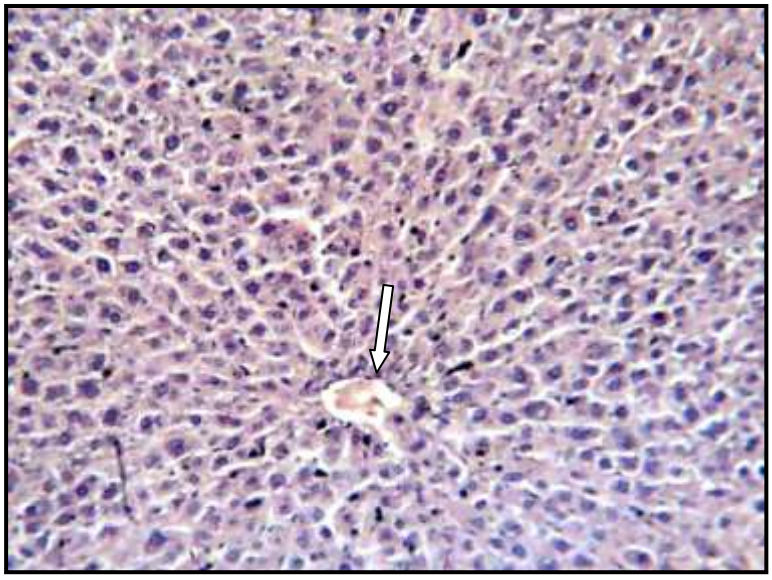
شكل (4-23) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لأسبوعين يظهر وضوح الفصيص الكبدي (40X صبغة H&E).

يشير السهم إلى الوريد الكبدي.



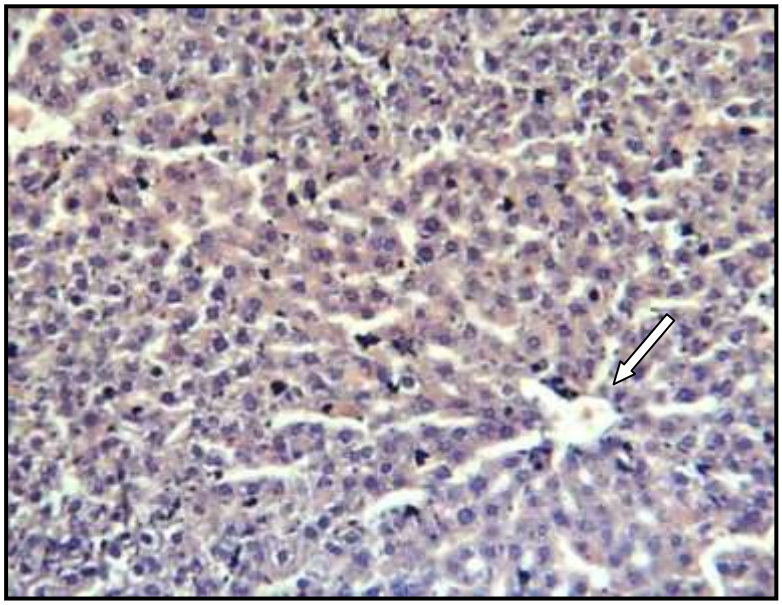
شكل (4-24) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لثلاثة أسابيع (100X صبغة H&E).

A يشير السهم إلى الوريد المركزي.
B يشير السهم إلى قناة الصفراء .
C يشير السهم إلى شريان.



شكل (4-25) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لأربعة أسابيع (100X صبغة H&E).

يشير السهم إلى الوريد المركزي.



شكل (4-26) مقطع مستعرض لكبد جرذ معامل بالمستخلص مع المطفر لخمسة أسابيع (100X صبغة H&E).

يشير السهم إلى الوريد المركزي.

الفصل الخامس

المناقشة Discussion

1.5 الاختبارات المتعلقة بالمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل

1.1.5 توصيف المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) .

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها عند توصيف المستخلص الميثانولي المائي للبراعم الزهرية الجافة لنبات القرنفل باستخدام طريقة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC تنوعا نسبيا في عدد الحزم التي ظهرت ، فقد بين جدول (4–1) وشكل (4–1) ظهور حزمتين عند الفحص بالضوء الاعتيادي و(7) حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية UV للطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 3 : 1 V/V)، وأما عند استخدام الطور السائل (حامض الخليك : ماء مقطر : بيوتانول 3: 5: 12 V/V/V) كما في جدول (4–2) وشكل (4–2) فقد لوحظ ظهور (4) حزم عند الفحص بالضوء المرئي و(6) حزم عند الفحص بالأشعة فوق البنفسجية ، ويفسر ذلك على إن القرنفل يحتوي العديد من المركبات والمكونات المهمة والفعالة ، فقد ذكر Rastogi وMehrotra (1960) أن القرنفل يحتوي على زيوت طيارة volatile oils بنسبة (12%–14%) وتانينات tannins بنسبة (10%–13%) بالإضافة إلى احتوائه على phenols وsesquiterpene ester وalcohol . وأيضا من أهم المركبات التي وجدت في القرنفل phenylpropanoides وdehydrodieugenol وtrans-confirerylaldehyde وkaempferol وbiflorin و rhamnocitrin و myricetiو ellagic acid و gallic acid و oleanolic acid (Cai and Wu, 1996). كذلك فان sesquiterpene هي مركبات اكتشفت في القرنفل ووجد أن لها دور فعال كعوامل مضادة للتسرطن (Zheng *et al* ., 1992).

كما أشار Burfield (2000) إلى احتواء القرنفل على عدة مركبات ومنها eugenol eugenol acetate , vanillinplus , p-methyl guaiacol, damascenone , linalool, cresol guaicol r-decalactone , methyl salicylate , β-caryophyllene ومركب caryophyllen oxide وهذه المركبات هي التي تعطي

القرنفل رائحته المميزة . وقد ذكر Chaieb وجماعته (2007) إن المكونات الرئيسة لزيت القرنفل هي phenyl propanoides مثل مركب carvacol و thymol و eugenol و cinnamaldehyde .

2.1.5 اختبار الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص بطريقة الرش بالبيتاكاروتين.

أظهرت نتائج الكشف عن الفعالية المضادة للأكسدة باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين للمستخلص الميثانولي المائي للقرنفل امتلاك المستخلص عدد من المركبات المضادة للأكسدة وذلك بظهور عدد من الحزم التي احتفظت باللون الأصفر بوصفه دليلا على كونها مضادات أكسدة ، فقد بين شكل (4–3) وجدول (4–3) ظهور حزمتين عند استخدام الطور السائل (هكسان : خلات الاثيل 3 : 1 V/V) ، وأما عند استخدام الطور السائل (حامض الخليك : ماء مقطر : بيوتانول 3: 5: 12 V/V/V) فقد ظهرت ثلاث حزم كما مبين في الشكل (4–4) وجدول (4–4) . فقد أشار Oya وجماعته (1997) إلى أن القرنفل يمتلك فعالية مضادة للأكسدة خارج الجسم (*In vitro*) . كما انه يقلل أو يخفض من جهد التأكسد (oxidative stress) داخل الجسم (*In vivo*) (Cortan *et al.*, 2000).

وقد تعود الفعالية المضادة للأكسدة للقرنفل إلى محتواه من الـ phytochemicals والتي تزيد من مقدار أو فعالية الإنزيمات المضادة للأكسدة (Rock *et al.*, 1996). أو قد تعود إلى محتواه من العناصر النزرة والتي تعتبر من المتطلبات الضرورية لفعالية الإنزيمات المضادة للأكسدة (Lampe,1999) . وهذا يتفق مع ما ذكره Khan (2003) الذي أكد إن مستخلص القرنفل يحتوي على النحاس والمنغنيز وهما من متطلبات تحفيز إنزيم SOD الذي يعمل على خفض عملية أكسدة الدهون . وأيضا اتفقت هذه النتيجة مع ماتوصل إليه Khalaf وجماعته (2008) الذي ذكر أن القرنفل اظهر فعالية قريبة لحامض الاسكوربيك (ascorbic acid) كمضاد أكسدة بسبب احتوائه على مواد كاسحة للجذور الحرة مثل الفلافونيدات والمركبات الفينولية الأخرى والفينولات المتعددة .

3.1.5 الكشف الكيميائي العام للمركبات الفعالة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل.

يوضح جدول (4-5) نتائج الكشف الكيميائي للمركبات الفعالة الموجودة في المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل إذ احتوى على عدد من المركبات الفعالة كالتانينات والراتنجات والصابونيات والقلويدات والكاربوهيدرات والفلافونيدات والكلايكوسيدات وكذلك التربينيدات الثلاثية فيما لم يحتو على الفينولات والكومارينات . ويعزى سبب وجود التانينات في المستخلص الكحولي إلى احتوائها على جزء سكري سهل الذوبان في الكحول ، كما إن القلويدات تذوب في الكحول ولا تذوب في الماء (قطب ،1981) . أما الراتنجات فلها قابلية الذوبان في الكحول (الشحات، 1986) وهذه النتائج اتفقت مع دراسة Tanaka وجماعته (1993) إذ اثبت أن القرنفل يحتوي على التانينات والتربينويدات الثلاثية . أما Tanko وجماعته (2008) فقد بين أن اختبار phytochemicals لمستخلص القرنفل قد كشف عن وجود الفلافونيدات والراتنجات والكلايكوسيدات والقلويدات والصابونيات والتانينات. كذلك وجد Jirovetz (2010) أن القرنفل يحتوي على مركبات عديدة كالتانينات والفلافونيدات والستيرولات والكلايكوسيدات .

2.5 الاختبارات البيولوجية الجزئية والوراثية الخلوية:

1.2.5 تحلل DNA خلايا الدم البيض للجرذان المعاملة بالمايتومايسين ومستخلص القرنفل:

يوضح الجدول (4-6) خصائص الـDNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للجرذان ، إذ لوحظ أن الجرذان المعاملة بالمايتومايسن أظهرت مستوى عالي من التحلل للـ DNA بمسحة تراوحت من 300-10000 زوج قاعدي ومستوى تحلل بلغ 9700 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة السالبة التي أعطت حزمة بحجم جزيئي 10000 زوج قاعدي إذ لم يظهر أي تحلل وهذا يدل على التأثير الضار للعقار على الـDNA. فقد عرف عن عقار المايتومايسين فعله المباشر على الـ DNA والذي يحدث بطريقتين هي إما الكلة الحامض النووي منقوص الأوكسجين (alkylation DNA) (والتي تؤدي إلى حدوث ارتباطات عبورية cross links)، أو توليد الجذور الحرة مثل superoxide و hydroxyl radicals (التي تؤدي إلى كسور في شريط الـ DNA) (Kang *et al.*, 2006). وعند حصول الإجهاد التاكسدي (Oxidative stress) بفعل الجذور الحرة يتحلل الـ DNA، حيث تؤدي الأنواع الفعالة للأوكسجين ROS

والأنواع الفعالة للنيتروجين RNS (Reactive Nitrogen Species) إلى حدوث إضرار مختلفة في شريط الـ DNA تتمثل في تحوير شكل جزيئة الـ DNA و فقدان نيوكليوتيدات من مواقعها وكسور في أشرطة الـ DNA والارتباط العرضي بالبروتين (Cadet *et al.*, 2002). ويظهر تحلل الـ DNA في المراحل الأولى على شكل وحدات كبيرة بينما يظهر على شكل قطع صغيرة ومستمرة في المراحل النهائية (Susin *et al.*, 1999).

أما عند إجراء التداخل بين المستخلص والعقار اظهر الـ DNA مستوى تحلل منخفض وللمعاملات الثلاث (قبل) و (مع) و (بعد) إذ أعطت مستوى تحلل بحجم جزيئي 6000 ، 2000، 4000 زوج قاعدي على التوالي بالمقارنة مع السيطرة الموجبة كما كانت المعاملة (مع) هي الأفضل في خفض مستوى التحلل.وعند استمرار التجريع بالمعاملة (مع) أظهرت النتائج انخفاض مستوى تحلل الـDNA، فالأسبوع الأول أظهر مستوى تحلل بحجم جزيئي 4000 زوج قاعدي مقارنة بالسيطرة الموجبة التي أعطت مستوى تحلل بحجم جزيئي 9000 زوج قاعدي ، أما الأسبوع الثاني والثالث والرابع والخامس فقد أعطت مستوى تحلل بحجم جزيئي 5000، 5000، 2000، 1000 زوج قاعدي على التوالي هذا يدل على إن للمستخلص النباتي قدرة على تثبيط فعل المطفر والتي تعود إلى احتواء المستخلص على المركبات الكيميائية النباتية، فبعض المركبات مثل الفلافونيدات و التانينات الذي ثبت وجودها عند الكشف الكيميائي للمستخلص. معروفة بفعلها المضاد للتطفير من خلال تفعيلها لآليات مختلفة و عديدة لصالح الجسم فمثلا" يعتقد أن الفلافونيدات المستخلصة من نبات الميرمية و الزعتر والنعناع الفلفلي لها القدرة على تثبيط الفعالية التطفيرية لمركب Trp-p-2 من خلال عرقلة مسار التنشيط الايضي للمركب إضافة إلى فعلها المضاد للأكسدة في إزالة الجذور الحرة المتولدة من تأيض المطفرات ، أما التانينات فيعتقد أنها المسئولة عن عملية الإصلاح بالقص (Excision repair) من خلال تفاعلها مع جزيئة الـ DNA مباشرة" أو من خلال تنشيطها لإنزيمات الإصلاح (Kuroda *et al* ., 1992) كما وجد Alonso وجماعته (2010) أن نبات *Phllanthus orbicularis* الغني بمركبات الكلايكوسيدات والصابونيات والكومارينات مضاد للاكسدة والتطفير إذ انه يحفز أنظمة الإصلاح لشريط الـ DNA ويؤدي إلى غلق المواقع الحساسة للجزيئات الخلوية لحمايتها من التأكسد بالجذور الحرة. وقد وجد إن لبعض النباتات ومركباتها

كفاءة مضادة للتطفير الذاتي الناتج بسبب حصول تحوير في إنزيم DNA polymerase ومن هذه النباتات الشاي الأخضر (Kada *et al* ., 1985). كما إن المركبات الفينولية ومنها gallic acid يمكنها أن ترتبط بالناقلات الخارجية للغشاء الخلوي بحيث تمنع دخول المواد المطفرة إلى السايتوبلازم (Hour *et al*., 1999). هذا ومن الجدير بالذكر أن Polsa وجماعته (2004) قد أشاروا في دراسة أجريت على نبات الكركم إلى الدور الوقائي لمستخلص النبات ضد تلف الـ DNA لخلايا الدم اللمفاوية للإنسان المستحثة بالمطفر Benzo [a] pyrene والذي يسبب كسور في شريط الـ DNA (DNA Strand breaks) وأن هناك علاقة بين تحلل الـ DNA ومستوى المغذيات الدقيقة كالبيتاكاروتين وفيتامين A وE في بلازما هؤلاء الأشخاص. كما وجد أن المستخلص الايثانولي لنبات *Laurencia* حفز إنزيم Alkaline transferase المسئول عن إصلاح الأخطاء المتسببة عن العوامل المؤلكلة وهذه الفعالية تعود إلى مركبات التربينات التي يحتويها المستخلص (Liang *et al*., 2007). وقد وجد Abouellella وجماعته (2007) أن مستخلص نبات *Edinaea pupurea* تمكن من حماية الـDNA المستخلص من خلايا كبد الفئران من التحلل بسبب جذر NO الحر والمتكون بفعل أشعة كاما عند معاملة الفئران بجرعة 30 ملغم/كغم من المستخلص ولمدة أسبوعين قبل التشعيع ، إذ أدى المستخلص إلى زيادة مستوى الإنزيمات المضادة للأكسدة مثل SOD وGSPx . كما بين القيسي (2010) إن مستخلص حبوب اللقاح أدى إلى خفض مستوى تحلل الـ DNA عند المعاملة بالمستخلص بجرعة 5 ملغم / كغم قبل المطفر CP بجرعة 20 ملغم/ كغم وذلك لاحتواء المستخلص على المركبات الكيميائية النباتية التي تعمل على خفض ضرر الأكسدة الذاتية أو إن حبوب اللقاح قد تعمل بفعل المكونات الفعالة على حجز الجذور الحرة وتفعيل الإنزيمات المسئولة عن حجز الجذور الحرة والتي من أهمها Superoxide dismutase و Catalase و Glutathione Peroxidase ومن ثم منع حدوث الارتباطات العرضية بين نفس الشريط أو بين الشريطين.

2.2.5 دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي عظم الجرذان :

بينت النتائج التي تم الحصول عليها من خلال هذه الدراسة انخفاض قيمة معامل الانقسام MI لخلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من عقارالمايتومايسين إلى1.16 مقارنة مع السيطرة السالبة 3.2 وبفرق معنوي عالي كما موضح في جدول(4−7)، وهذا يدل

بوضوح على التأثيرات 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 (Podder *et al.*, 2008). ويعود سبب هذه التأثيرات إلى فعالية العقار في القضاء على الخلايا لتداخله مع المادة الوراثية الـ DNA لانه يعترض عملية التضاعف (DNA Replication) وتثبيط الانقسام الخيطي من خلال ارتباطه التساهمي بقاعدة الكوانين بنفس شريط الـ DNA أو بين شريطي الـ DNA ، لذا فان هذا الارتباط لـMMC بالـ DNA هو المسئول عن التقليل من النمو والانقسام الخيطي (Warren *et al.*, 1998) .كذلك من العوامل التي تؤدي إلى خفض معامل الانقسام عند استخدام العقار و بالجرعة المعتمدة فقد ذكر Benjamen و Gill (1980) أن تكوين إنزيم الـ poly-ADP-ribose الضروري لإجراء عملية الإصلاح يزداد في الخلايا عند تكسير خيوط الـDNA وان درجة تكوين هذا الإنزيم تعتمد على عدد ونوع الكسور الموجودة وهذا يؤدي إلى تأخير عملية الانقسام مما يعمل على خفض معامل الانقسام. وعند إجراء التداخل بين المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل بجرعة 500 ملغم/كغم مع الجرعة المعتمدة للمايتومايسين وعلى شكل ثلاث معاملات وهي المستخلص (قبل،مع ،بعد) المطفر لتحقيق هدف الدراسة في معرفة الآلية التي تعمل بها مثبطات المواد المطفرة من خلال اختلاف المعاملة بين المطفر والمثبط (Al-Ekperov, 1999)، لوحظ ارتفاع معدل معامل الانقسام، إذ نجد إن المعاملة بالمستخلص (مع)،(بعد) المطفر كانت الأفضل في رفع قيم MI الى2.43 ،2.13 على التوالي وبفرق معنوي عال عن السيطرة الموجبة أما قيمة MI للمعاملة (قبل) فقد ارتفع إلى 1.68 وبفرق معنوي بسيط عن السيطرة الموجبة، وتعود هذه الفعالية إلى قدرة المركبات الفعالة النباتية على تحفيز الخلايا الجذعية على الانقسام لكي تعوض النقص الحاصل في الخلايا الدموية في مجرى الدم نتيجة التأخر في عملية الانقسام أو موت بعض الخلايا نتيجة المعاملة بالعقار(Travis, 1995).

وعموما فالمواد المثبطة التي تكون فعالة مع أو قبل المطفر تعمل كمثبطات مباشرة (Desmutagens) من خلال تثبيط عمل المطفر كيميائيا وذلك بتكوين معقد مع المادة المطفرة أو احد متايضاتها وبذلك يمنع وصوله إلى الخلية أو ربما تتفاعل المادة المضادة مع

المواقع المستهدفة بفعل المطفر من خلال عملها بوصفها مادة غالقة (Blocking agent) تمنع المطفر من الوصول إلى المواقع المستهدفة في الـ DNA أو التفاعل معها مما يؤدي إلى منع تأثيرات المطفر، أو من خلال تثبيط عمل المطفر إنزيميا وذلك بتثبيط إنزيمات التنشيط الايضي للمطفرات وبصورة غير مباشرة أو من خلال زيادة إنزيمات إزالة السمية المتواجدة بصورة طبيعية في الجسم (Kuroda and Hara, 1999). أما المثبطات التي تكون فعالة بعد إعطاء المطفر فتسمى مثبطات حيوية (Bio antimutagens) إذ تعمل على إصلاح التلف بعد حدوثه من خلال زيادة دقة عملية تضاعف الـDNA وزيادة أنظمة الإصلاح عن طريق زيادة الإصلاح الخالي من الخطأ والتقليل من الإصلاح القابل للخطأ (Bronzetti, 1997). كما واتفقت نتائج الدراسة هذه مع دراسة السعدي (1997) من إن المستخلص الكحولي لنبات التمر ألزهدي كان ذو تأثير اكبر في خفض نسبة التأثيرات السمية الوراثية للعقارين CP و MMC مقارنة"بالمستخلص المائي لهذا النبات ، ومع دراسة صيهود (2000) في أن المستخلص الكحولي لنبات الثوم امتلك فعالية عالية في تقليل الأثر السمي الوراثي و ألدمي لعقار التاموكسفين (Tamoxifin) و بخصوص ما أشار إليه ألعبيدي (2001) فانه لا يختلف عما ذكر سابقا"من أن المستخلص الكحولي لبذور و أوراق نبات القريص امتلك فعالية تثبيطية اكبر من المستخلص المائي للفعل التطفيري لعقار المايتومايسين مما يؤكد وجود مركبات بنسبة اكبر في المستخلص الكحولي عنه في المستخلص المائي .

وقد أوضحت نتائج المعاملة بالمستخلص مع المطفر ولمدة خمسة أسابيع إن التأثير التراكمي للمستخلص قد رفع قيمة MI تدريجيا إذ كانت قيمته في الأسبوع الأول والثاني والثالث من التجريع 1.93 ،2.03 ،2.16 على التوالي وبفرق معنوي بسيط مقارنة مع السيطرة الموجبة 1.02 أو بالمقارنة فيما بينها أما الأسبوع الرابع والخامس فقد ارتفع MI إلى 2.73، 2.7 على التوالي وصولا إلى السيطرة السالبة 3.2 وبدون فرق معنوي ، مما يعني أن التجريع المستمر للمستخلص قد قلل أو منع تأثير المطفر على معدل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الجرذان، وقد يعود السبب إلى احتواء المستخلص على المركبات الفلافونيدية. فقد وجدت الطائي(2005) زيادة في معدل الانقسام الخيطي لخلايا نقي عظم الفئران المعاملة بالفلافونيدات المستخلصة من نباتات الكجرات و إكليل الجبل و الميرامية. ويعود تأثير الفلافونيدات المستخلصة في رفع معامل

الانقسام لكون لها قابلية تحفيزية للخلايا على الانقسام الخلوي من خلال التأثير على نفاذية غشاء خلايا الدم البيضاء فتحفزها على الانقسام الخلوي بشكل غير مباشر أو بشكل مباشر من خلال حثه على تحديد النشاط والحيوية للخلايا اللمفاوية أو حثه لعملية تضاعف الـDNA (Elves and Wikinson, 1962).

كما ان للمركب الفلافونيدي Quercetin القدرة على رفع معامل الانقسام في الخلايا السرطانية البشرية المستزرعة والتي ثبط معامل انقسامها بوساطة اوكسيد النتريك إذ يثبط الـ Quercetin مرحلة الـ Angiogenesis (Jackson and Venema,2006). كما وجد حدوث انخفاض معنوي في نسبة تكرار تكون النوى الصغيرة المستحثة بالمايتومايسين بوجود مركب Quercetin وانخفاض الدلائل البيولوجية للسمية الوراثية للعقار في الخلايا اللمفاوية للدم المحيطي للإنسان (Oliveira *et al.,* 2000) . وكذلك بين إن للمركب الفلافونيدي Quercetin القدرة على رفع معامل الانقسام في الخلايا السرطانية البشرية المستزرعة والتي ثبط معامل انقسامها بوساطة اوكسيد النتريك إذ يثبط الـ Quercetin مرحلة الـ Angiogenesis (Jackson and Venema,2006).

3.2.5 دراسة التشوهات الكروموسومية لخلايا نقي عظم الجرذان:

أظهرت النتائج وحسب جدول (4–9) إن هناك تغيرات كروموسومية مختلفة وكان معدل هذه التغيرات مرتفعا في خلايا نقي عظم الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من العقار، إذ بلغت 26.0 مقارنة مع السيطرة السالبة 5.33 وبفرق عالي المعنوية مما يدل على التأثير السمي الوراثي للعقار في إحداث 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(Abou-Tarboush *et al.*,1999). وعلى الخلاف من المواد المسرطنة التي تنتج الانحرافات الكروموسومية عن طريق التداخل مع آليات التكاثف، يحث المايتومايسين هذه الانحرافات عن طريق شطر أشرطة الـDNA ، وقد لوحظ أن حدوث الكسور الكروماتينية وكسور منطقة السنترومير ربما تعود إلى الفعالية الانتقائية للعقار لمناطق Heterochromatin (Natrajan and Raposa 1975). كما وجد أن العقار وبتركيز 1 ملغم/مل لم يمتلك تأثيرات مؤذية على كروموسومات الخلايا اللمفاوية للضفدع

لافتقارها إلى المقادير الكبيرة من Heterochromatin (Shah, 1975).وعموما يعتقد إن المسلك الشائع لكثير من العوامل المطفرة يكون في قدرتها على تدمير الأجسام الحالة مع تحرر الإنزيمات المحللة للـDNA التي لها القدرة على إحداث الكسور الكروموسومية والكروماتيدية (حسن،1997).

وعند إجراء 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 قبل ومع وبعد المطفر ،إذ بلغت 14.0، 14.0، 19.66 على التوالي وبفرق معنوي عن السيطرة الموجبة ، مما يثبت قابلية المستخلص على خفض تأثير العقار واعتباره ضمن المثبطات المباشرة بالدرجة الأولى (أي التي تعمل على تثبيط التنشيط الايضي للمطفر أو حدوث تداخل كيميائي مباشر بين المطفر ومضاد التطفير) وضمن المثبطات الحيوية بالدرجة الثانية (أي تعمل على تنشيط عمليات إصلاح الطفرة). كما إن التجريع المستمر للمستخلص مع العقار قد أدى إلى خفض معدل التشوهات الكروموسومية كما في جدول (4−10) ، إذ لوحظ أن التجريع لمدة أسبوع واحد للمعاملة (مع) قد خفض معدل التشوهات إلى 14.66 مقارنة مع السيطرة الموجبة 24.33 وبفرق معنوي بسيط أما التجريع للأسبوع الثاني والثالث والرابع قد خفض معدل التشوهات إلى 12.0 ، 12.33، 12.66على التوالي ولكن بدون فروق معنوية بالمقارنة فيما بينها أو مع الأسبوع الأول أما المعاملة للأسبوع الخامس فقد أدت إلى خفض معدل التشوهات9.0 وبدون فرق معنوي بالمقارنة مع السيطرة السالبة 5.33 ، ما يدل على إن استمرار اخذ المستخلص أدى إلى الحد من تأثير العقار في إحداث التشوهات الكروموسومية.وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما توصل إليه Umnova وجماعته (1991) إلى أن مستخلص نبات *Ginseng Callus* له القدرة على تثبيط المطفر مايتومايسين – سي الذي يمتلك تأثير تطفيري في رفع معدل التغيرات الكروموسومية والتبادل الكروماتيدي ألشقيقي لخلايا نقي العظم للفأر الأبيض والهامستر .ويتفق ذلك أيضا مع ما ذكره Nakamura وجماعته (1997) حول قدرة الشاي الأخضر على خفض معدل الاختلالات الكروموسومية وذلك من خلال إجراء اختبار النوى الدقيقة (Micronucleus assay) في خلايا CHO وخلايا الفئران المستحثة بحقن تلك الحيوانات بالمطفر MMC داخل

البريتـون ، حيـث لـوحظ انخفـاض تكـرار النـوى الدقيقـة بشـكل واضـح عنـد معاملـة الحيـوان بالمستخلص بحجم 1مل قبل حقنه بالمطفر بحوالي ست ساعات. واتفق هذا مع دراسة الخياط (1999) من أن مستخلصات نبات الشيح و عرق السوس و الكجرات ثبطت التأثيرات السمية الوراثية و التطفيرية لعقار المايتومايسين على الخلايا اللمفاوية لدم الإنسان و خلايا نقي العظم للفئران. وهذا ما أكدته دراسة ألعبيدي (2001) من أن المستخلصات المائية و الكحولية لبذور أوراق نبـات القـريص ثبطـت الفعـل التطفيـري لعقـار المايتومايسـين . وأيضـا أشـار Celikler وجماعته (2008) أن مستخلص النبات *Ulva rigida* يقلل التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفيـة البشـرية المسـتزرعة والمسـتحثة بعقـار المايتومايسـين. كـذلك وجـد أن مركـب Cisplatin يعمل على استحثاث التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للجرذان التي اشتملت على الكسور الكروموسومية والكروماتيدية وبالمقابل وجد أن زيت الزيتون (Olive oil) الغني بحامض الاوليك (Oleic acid) يعمل على تقليل تلك التشوهات (Evangelista *et al.*,2006). كذلك أشار حسن (2002) إلى أن المستخلصين المائي و الكحولي لكل من نبات حبـة البركـة و الهيـل و ألنـومي بصـرة لـم يمتلكـا تأثيرا"سـميا"وراثيا"على العكـس مـن ذلـك فـأن المستخلصـات النباتيـة وبـالتراكيز المسـتخدمة أدت إلـى خفـض التـردد التلقـائي للتغيـرات الكروموسومية و النوى الصغيرة في خلايا نقي العظم والخلايا الجنسية للفئران المختبرية .

أمـا سـبب الاختـزال الحاصـل فـي قيمـة (CA) و (SCE) نتيجـة معاملـة الخلايـا بالمستخلصـات الالكلويديـة و الفلافونيديـة لكـون هـذه المـواد بحـد ذاتهـا مضـادات للتطفيـر، فباستطاعة بعض المواد الفلافينويدية مثل Quercetin تثبيط الانقسام الخلوي لخلايا سرطان القولون و الثدي و ابيضاض الدم في الإنسان(Yoshida *et al* ., 1992). كما إن هذه الفلافونيدات بأنواعها المختلفة الذي يصل إلى (4000) نوع معروفة باستطاعتها أن تثبط الفعل التطفيري للعديد من المواد المطفرة مثل (TPA) و ذلك من خلال فعاليتها المضادة للأكسدة وإزاحتها للجذور الحرة التي تتداخل مع المادة الوراثية وتسبب نشوء العديد من الأورام (Wei *et al* ., 1990). أو قد يعود سبب خفض التشوهات إلى وجود القلويدات التي تم الكشف الكيميائي عنها في مستخلص القرنفل . حيث أظهرت القلويدات المشتقة من نبات *Chelidonhum majus* دورا فـي التقليـل مـن الأثـر السـمي للمـواد المسـرطنة حيـث أنهـا مـواد محبـة للنـواة

(nucleophilic) لذا تعمل على غلق المواقع الحساسة في النواة والـDNA وتحميهما من مهاجمة المواد المطفرة (Vavreckova *et al.*, 1996) .

4.2.5 دراسة التشوهات في الحيوانات المنوية للجرذان:

إن الخلايا المولدة للحيوانات المنوية (Spermatogenic cells) تعطي أعدادا كبيرة من الخلايا الجنسية التي تكون في مراحل مختلفة من دورة الخلية ،كما إن تلك الخلايا تختلف في حساسيتها تجاه المواد المطفرة ، وان المادة التي تحث التشوهات في الحيوانات المنوية لها القدرة على إحداث طفرة (Zdzienicka *et al.*, 1982).مما يوفر فرصة أفضل لدراسة تأثير المواد المطفرة ومدى إحداث التغيرات المظهرية عليها. فقد بينت النتائج في جدول (4−11) ارتفاع معدل التشوهات واختلاف أنواعها من نطفة فاقدة للذنب وفاقدة للرأس ومشوهة القطعة الوسطية ومشوهة الذنب و فاقدة لكلاّب الرأس ومنحرفة كلاّب الرأس ورأس مفصص في الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من المايتومايسين ، إذ بلغ معدل التشوهات953.3 من 1000 نطفة وبفرق معنوي عالي عن السيطرة السالبة 159.6.إذ أن المعاملة بعقار المايتومايسين تؤدي إلى تكوين أنواع مختلفة من الجذور الحرة ومنها أصناف الأوكسجين الفعالة (Reactive Oxygen Species) التي تعمل على العديد من التشوهات في الحيوانات المنوية. وان هذه الجذور تهاجم الغشاء الخلوي للنطف وتعمل على حث عملية أكسدة الدهون الموجودة في الغشاء الخلوي للنطف ومن ثم تغير في تركيب هذه الدهون وأخيرًا تعمل على زيادة اماعية الغشاء الخلوي (Fluidity) للنطف(Kurpisz *et al* .,1996).

كما أشار Griveau وجماعته (1995) إلى أن أنواع الأوكسجين الفعالة (ROS) تمتلك تأثيرا مثبطا لوظيفة المايتوكوندريا ولتخليق الـ DNA، وتسبب حدوث تغييرات في هيكل الخلية. وان هذه الأنواع الفعالة للأوكسجين لها تأثير مباشر على خلايا سرتولي التي تلعب دوراً مهماً في عملية نشأة النطف (Spermatogenesis) ، وبالتالي التأثير في التركيب الخلوي لأرومات النطف (Spermatids) وحدوث التشوهات (Hipler *et al.*, 2000). كذلك تؤثر (ROS) على النطف من خلال التأثير في استجابة الجسيم الطرفي ، وتقليل حركة النطف ، وزيادة تركيز هيدروبيروكسيدات الدهون ، وفقدان الأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة في غشاء النطف (Griveau *et al.*, 1995). كما تعزى معظم التفاعلات الناتجة عن الجذور

الحرة إلى تكسر البروتين وتجمعه وتثبيط الإنزيمات ، وبيروكسدة الدهون ومن ثم تحطم غشاء النطف (Aziz, 2000) . وهذا يتفق مع ما توصل إليه Cheng وجماعته (1991) إلى أن التعرض للأشعة السينية سبب ظهور التشوهات في النطف نتيجة تولد الجذور الحرة التي أدت إلى تدمير غشاء النطف للتحوير في شكله من ثنائي الطبقة (Bilayer phase) إلى السداسي الطبقة (Hexagonal) .كما وجد Fernandez-vancleve وجماعته (1987) أن عقار المايتومايسين سبب تغيرات مرضية شديدة لخلايا spermatogonia في النبيبات المنوية والتي أدت إلى فقدان وظيفتها في تكوين النطف ، كما اثر على الإنتاج اليومي للنطف وحركة النطف وعلى الصفات الفسلجية للأنسجة الحشوية الخصوية عند الجرذان المعاملة بجرعة 2 ملغم/كغم من المايتومايسين.وقد كانت نسبة التشوهات في النطف الفاقدة للرأس والفاقدة للذنب أعلى من نسب باقي التشوهات بينما كان التشوه من نوع مفصص الرأس اقل الأنواع حدوثا . وقد يرجع السبب إلى الاختلاف في التلف الحاصل في جزيئه الـDNA والى مدى إصلاح ذلك التلف (Matsuda and Tobari, 1988). كما أكد Soares وجماعته (1979) على أن زيادة التعرض للمواد الكيميائية تسبب زيادة في النطف ذات الرؤوس والأشكال غير الطبيعية للفار.

وأما عند إجراء التداخل بين المستخلص والمطفر وعلى شكل ثلاث تداخلات (قبل)،(مع)،(بعد) لوحظ انخفاض معدل التشوهات في نطف الجرذان المعاملة بالمستخلص (بعد) و(مع) المطفر إلى 591.0 ،630.6 على التوالي وبفرق معنوي عن السيطرة الموجبة، بينما لم تعط المعاملة (قبل) أي فرق معنوي عن السيطرة الموجبة فقد كان معدل التشوهات 883.0 ، أما عند استمرار المعاملة بالمستخلص مع المطفر لمدة خمسة أسابيع لوحظ أن معدل التشوهات قد انخفض للأسبوع الأول من المعاملة إلى 585.0 وبفرق معنوي عن السيطرة الموجبة 913.7 أما المعاملة للأسبوع الثاني والثالث والرابع والخامس التي بلغ فيها معدل التشوهات إلى 420.3، 402.3، 360.7 173.3 على التوالي فلم تعط أية فروق معنوية مع السيطرة السالبة 159.7، ما يدل على التأثير الايجابي للمستخلص في منع حدوث التشوهات في النطف المتسببة عن التعرض للعقار والذي عد تأثيره مباشر على شكل النطف وليس على عملية نشأة النطف (Spermatogenesis) والتي تستغرق في الجرذان 53.2 يوم (Ress,

1993) . وقد بين Bahmanpour وجماعته (2006) أن مستخلص حبوب لقاح نبات *Phoenix dactylifera* يعمل على تقليل التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الجرذان. وأيضا ذكر Asita وجماعته (2008) أن لزيت بذور الكتان وزيت بذور العنب تأثيرات مخفضة للتشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد في الفئران . كما اتفقت هذه النتائج مع ما أشار إليه Mohammed وجماعته (2009) من انخفاض تشوهات النطف في الفئران المعاملة بعقار gemcitabine مع مستخلص نبات الزعتر نتيجة لتفاعل بعض المركبات الكيميائية النباتية للمستخلص مع العقار. كما أفادت الطريحي (2010) أن نسبة التشوهات في رؤوس النطف للجرذان المعاملة بمستخلص جذور عرق السوس وعقار السايكلوفوسفامايد قد انخفض لجميع التراكيز والمعاملات المستخدمة في الدراسة وكانت المعاملة بالمستخلص بعد العقار الأفضل والأقرب للسيطرة السالبة .كذلك بين القيسي (2010) أن المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح قد أدى إلى خفض نسبة التشوهات في رؤوس نطف الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد إذ أدت المعاملة بالمستخلص قبل ومع المطفر إلى خفض التشوهات وبفرق معنوي عن السيطرة الموجبة.

3.5 دراسة التغيرات النسجية المرضية:

أوضحت نتائج الفحص ألمجهري لنسيج كبد الجرذان المعاملة بالمايتومايسين إن العقار احدث تغيرات مرضية في النسيج تمثلت بتنخر الخلايا الكبدية والنزف الدموي و الارتشاح كما في الأشكال (4–19) و(4–20) و(4–21) وتحدث هذه التغيرات بسبب الإجهاد التاكسدي الذي يسببه العقار نتيجة تولد الجذور الحرة . فهناك عدة إنزيمات مختزلة (Reductase enzymes) يمكن أن تحفز اختزال العقارإلى مواد ايضية سامة للخلايا ومنها إنزيم NADH Cytochrome-b_5-reductase وهو الإنزيم السائد في المايتوكوندريا والقادر على تحويل العقار إلى عامل ألكيلي للـ DNA وتكوين الجذور الاوكسجينية (Holtz *et al.,* 2003). وتحث الجذور الاوكسجينية على تضرر الأنسجة وباقي الأنظمة الحياتية (Shyamala *et al.*,2003).

أما عند استمرار المعاملة بالمستخلص مع العقار لمدة خمسة أسابيع لوحظ تحسن مستمر في نسيج الكبد من الأسبوع الأول للمعاملة وحتى الأسبوع الخامس ، كما لوحظ عودة النسيج إلى

الحالة الطبيعية كما موضح في الأشكال (4−22) و (4−23) و (4−24) و (4−25) و (4−26)، مما يثبت فعالية المستخلص في إزالة التأثير الضار نتيجة المعاملة بالعقار وربما تعود فعالية المستخلص إلى مركبات التانينات الموجودة فيه. إذ وجد أن التانينات تمتلك فعلا مضادا للأكسدة وتأثيرا وقائيا لنسيج الكبد ضد acetaminophen المستحث لتضرر الكبد في الجرذان (Lin *et al.*, 2001) .أو قد تعود فعالية القرنفل إلى الفلافونيدات وهي مجموعة من المركبات المتعددة الفينول والتي تمتلك فعالية كاسحة للجذور الحرة ومثبطة لإنزيمات الأكسدة والهدرجة إضافة إلى فعلها المضاد للالتهاب (Clavin *et al.*,2007). كما تثبط الأضرار المستحثة بعمليات الأكسدة و تحمي الخلايا والأنسجة من التأثير الضار للأنواع المتفاعلة من الجذور الحرة (Duthie *et al.*, 1997).وقد وجد أن بعض الفلافونيدات قادرة على اختزال الأجسام الغريبة الحاثة للتسمم الكلوي في الحيوانات وتثبط التأثيرات الضارة للإجهاد التاكسدي بالتعاون مع الأنظمة الطبيعية مثل الكلوتاثيون وغيره من إنزيمات الحماية داخلية النشوء(Kadarian *et al.*, 2002).وتتفق هذه النتيجة مع ماتوصل إليه Malaya وجماعته (2007) إن القرنفل يزيل التأثير السام لرابع كلوريد الكاربون في نسيج الكبد والحاث على تضرر الخلايا الكبدية وزيادة مستويات أنزيمات الكبد في المصل نتيجة زيادة عمليات أكسدة الدهون، إذ يعمل القرنفل على حث أنزيمات الكبد المزيلة للسموم الناتجة من الجذور الحرة المتولدة نتيجة استخدام CCl4. كذلك لوحظ أن المستخلص الميثانولي لبراعم القرنفل اظهر فعالية عالية ضد الفورمالين الحاث لتكوين الوذمة (Oedema) في الجرذان المعاملة بجرعة 50 ملغم/كغم و 100 ملغم/كغم و 200 ملغم/كغم ، ويعتقد أن وجود التانينات والفلافونيدات في المستخلص هي المسئولة عن الفعالية المضادة للالتهاب (Duke, 2002). كما بينت النتائج التي توصل إليها Nassar وجماعته (2007) إن الجرذان المعاملة بجرعة 500 ملغم/كغم من المستخلص الايثانولي للقرنفل لم تحصل فيها تغيرات نسجية مرضية لنسيج الكبد مقارنة بالجرذان المعاملة بجرعة 650 ملغم/كغم من Paracetamol الذي سبب حدوث تنخر الخلايا الكبدية وخاصة في مركز الفصيص الكبدي واحتقان الجيبانيات وترشح الخلايا اللمفاوية الفاقدة لحدودها الخلوية كما فقدت بعض الخلايا الكبدية نواتها اونويتها ولوحظ تكون الوذمة ، ويعتقد أن فعل القرنفل المضاد للتأثيرات الحاثة لتضرر الكبد يعود إلى مركبات القرنفل التي تعمل ككاسحات للجذور الحرة التي تتأيض بإنزيمات الـ microsomal ، إذ يعيق المستخلص تفاعل الجذور

الحرة مع الأحماض الدهنية غير المشبعة ويعيق بيروكسدة الدهون المؤدية إلى تكون مركب MDA. وفي دراسة أجراها El-Segaey وجماعته (2007) اثبت أن استعمال القرنفل والهيل يؤدي إلى حماية الكبد من الضرر الناتج من سمية الكحول المتناولة لفترة طويلة إذ يلاحظ انخفاض معنوي لمستوى إنزيمات الكبد والدهون في مصل الجرذان وانخفاض مركب MDA. وقد بين Khan (2003) إن احتواء القرنفل و الهيل على النحاس والمغنيسيوم وهما من المتطلبات الضرورية لفعالية الإنزيم المضاد للأكسدة SOD والذي يؤدي بدوره إلى خفض عملية أكسدة الدهون هو المسؤول عن فعالية هذين النباتين .

الاستنتاجات Conclusions

1. امتلاك المستخلص فعالية مضادة للأكسدة في الزجاج *in vitro* وفي الجسم الحي *in vivo*.

2. كفاءة المستخلص الميثانولي المائي للقرنفل في الحد من التأثيرات السمية الخلوية و التطفيرية لعقار المايتومايسين إذ أدى إلى رفع قيمة معامل الانقسام وخفض معدل التشوهات الكروموسومية ومعدل التشوهات في الحيوانات المنوية المستحثة بالعقار.
3. كفاءة المعاملة بالمستخلص (مع) و(بعد) المطفر وبفرق معنوي عن المعاملة بالمستخلص (قبل) العقار في تثبيط التأثيرات السمية و التطفيرية للعقار لذا يمكن تصنيف المستخلص ضمن المثبطات المباشرة (Desmutagens) بالدرجة الأولى وضمن المثبطات الحيوية (Bioantimutagens) بالدرجة الثانية.
4. كفاءة المعاملة بالمستخلص مع المطفر وعلى المدى الطويل في تثبيط التأثيرات السمية للعقار على معامل الانقسام والتشوهات الكروموسومية وتشوهات الحيوانات المنوية ونسيج الكبد .

التوصياتRecommendations

1. عزل وتنقية المركبات الفعالة للمستخلص باستخدام تقنية HPLC واختبار فعالية كل مركب في الاختبارات الوراثية الخلوية.
2. إجراء دراسة وراثية خلوية للمستخلص على خطوط خلوية سرطانية .
3. دراسة تأثير المستخلص في الجوانب المناعية وتقدير مدى العلاقة بين الاختبارات الوراثية الخلوية والجوانب المناعية.

المصادر العربيـة:

حسن ، مفيد قائد احمد (2002) . استخدام بعض المستخلصات النباتية لتثبيط الأثر السمي الوراثي لبعض العقاقير المضادة للسرطان في الفار. أطروحة دكتوراة ، كلية العلوم ، جامعة بابل .

حسن ، مفيد قائد احمد (1997). التاثيرات الدموية الوراثية الخلوية لاشعة كاما على الفار الابيض *Mus musculus* . رسالة ماجستير، كلية التربية (ابن الهيثم) ، جامعة بغداد.

الخياط ، بشرى محمد أمين (1999) . دراسة القابلية التطفيرية و المضادة للتطفير لبعض النباتات الطبية العراقية. أطروحة دكتوراة ، كلية التربية (ابن الهيثم) ، جامعة بغداد.

الزبيدي ، زهير نجيب و بابان ، هدى عبد الكريم (1996) . دليل العلاج بالأعشاب الطبية العراقية . شركة آب للطباعة . وزارة الصحة . بغداد.

السعدي، محمد حمود محيسن (1997). تثبيط تأثير التطفير الوراثي لبعض المسرطنات الكيميائية باستخدام مستخلص التمر الزهدي . رسالة ماجستير، كلية التربية (ابن الهيثم)، جامعة بغداد .

الشامي ، سامي أغا (1982). دراسة بعض االصفات الوراثية والسمية لازهار القيصوم . رسالة ماجستير ، كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد.

الشحات ، نصر أبو زيد (1986). النباتات والاعشاب الطبية . دار البحار. بيروت.

صيهود ، يحيى دريعهم (2000). تثبيط التاثيرات الدمّية و الوراثية الخلوية لعقار التاموكسفين بواسطة مستخلص الثوم . رسالة ماجستير ،كلية التربية (ابن الهيثم)، جامعة بغداد .

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

الطريحي ، منى نجاح حسن (2010). تثبيط الفعالية التطفيرية للسايكلوفوسفومايد باستخدام مستخلص جذور عرق السوس. رسالة ماجستير ، كلية العلوم، جامعة بابل.

العبيدي ، ليث عبد الحسن محمد جواد (2001). التحري عن التأثير المضاد للتطفير في مستخلصين من نبات القريص نوع *Urtica pilufera* في الفار الأبيض . رسالة ماجستير، كلية العلوم ، جامعة الكوفة.

قطب ، فوزي طه (1981). النباتات الطبية وزراعتها ومكوناتها . دار المريخ للنشر. الرياض.

القيسي ، باسم كاظم بريسم (2010). دراسة بعض التاثيرات الوراثية لمستخلص حبوب لقاح نحل العسل في ذكور الفئران البيضاء. رسالة ماجستير، كلية التربية، جامعة كربلاء.

يوسف ، محمد عرب ; العلوجي ، صباح ثامر; الكرماشة ، فاروق ناجي و رياس، مروان عبد الرحيم (1989) . فسيولوجيا الحيوان . مطبعة بيت الحكمة . جامعة بغداد.

Foreign references:

Abdel-Rahman, M. K. & Abd El-Megeid, A. A. (2006). Hepatoprotective effect of soapworts (*Saponaria officinalis*), pomegranate peel (*Punica granatum* L) and cloves (*Syzygium aromaticum* linn) on mice with CCl4 hepatic intoxication. World J. Chem., **1** (1): 41-46.

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.

Abouellella, A.; Yasser, E.;Sanich, S.T. & Ahmed, M.Z.(2007). Phototherapeutic affect of *Echinacea purpurea* in gamma irradiation mice. J. Vet. Sci. ,**8**:341-351.

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.

Adedyo, O. ; Anderson, W. ; Young , M. ; Sncickus ,V. ;Patil, P. & Kolawole ,D. (2001). Phytochemistry and antibacterial activity of *Senna alata* flower. Pharmacut. Biol., **39** :1-5.

AL-Ekperov, U.; Gulieva, R. & AL-Ekperov, R.(1999). The inhibition of the genotoxic effects of plant Antimutagens. J. Bio. (23):135-142.

Al-Khayant, M.A. & Blank, G.(1985). Phenolic spice components sporostatic to *Bascillus subtillis*. J. Food Sci., **50**: 971-974.

Allen ,J.W. ; Shuler ,C.F. ;Menders ,R.W. & Latt ,S.A. (1977). A simplified technique for *In vivo* analysis of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxyuridine tablets . J. Cytogenetics , **18** :231-237.

Alma, M. H. ; Ertas ,M. ; Nitz , S. & Kollmannsberger ,H. (2007). Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.).Bio. Resor., **2**(2) : 265-269.

Alma, M. H. ; Nitz, S.; Kollmannsberger, H. ; Digrak, M.; Efe, F. T. & Yilmaz, N .(2004). Chemical Composition and Antimicrobial

activity of the essentioal oils from the gum of Turkish Pistachio (*Pistacia vera L.)* populations . Turk. J. Agric. For., **28**:173-177.

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.

Andrade, C.U.B ;Perazzo, F. F. & Maistro, E. L.(2008). Mutagenicity of the *Musa paradisiaca* (Musaceae) fruit peel extract in mouse peripheral blood cells *In vivo*. Genet. Mol. Res., **7** (3): 725-732.

Asita ,A.O. ; Dingann ,M.E. & Magama ,S. (2008) . Lack of modulatory effect of asparagus ,tomato and grape juice on cyclophosphamide induced genotoxicity in mice . J. African Biotech., **7** : 3383-3388.

Ataya, K. ; Valeriot, F. & Ramahi, A. (1989). Effect of cyclophosphamide on the immature rat ovary .J. Cancer Res ., **49** : 1660–1664 .

Aziz, B.N. (2000). Effect of hydrogen peroxide–induced oxidative stress on epididymal sperms of mice. Iraqi J. Vet. Sci., **13**: 61-65.

Bahmanpour ,S. ; Talaei ,T. ; Vojdani ,Z. ; Panjehshahin ,M.R. ; Poostpasand, A. ; Zareei ,S. & Chaeminia ,M. (2006). Effect of *phoenix dactylifera* pollen on sperm parameters and reproductive system of adult male rats . J. Iran Med., **31**(4) :208-212 .

Bakr, R. A. Z.(2006). *In vivo* study of mitochondrial DNA and cytotoxic change in mice treated with Mitomycine–C as mutagenic agent. MSc. Thesis, Coll. Sci. Alnahrain Univ.

Banerjee, S. & Das, S. (2005). Anticarcinogenic effects of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. Asian Pacific J. Cancer Prev., **6**: 304-308.

Banerjee, S.; Panda, C.K. & Das, S.(2006). Clove (*Syzygium aromaticum* L.),a potential chemopreventive agent for lung cancer. Carcinogenesis , **27**(8):1645-1654.

Banerjee, S. & Das , S. (2005). Anticarcinogenic effect of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. J. Cancer Preven., **6**: 304-308.

Barbeito, C. G.; Surur, J. M. & Badran, A. F.(2000). Mitotic activity of the pars intermedia in the female mouse .Mut. Res., **389**:223-224.

Benjamen, R. C. & Gill, D. M.(1980). ADP-ribosylation in mammalian cell ghosts, Dependence of poly-(ADP-ribose) synthesis on strand breakage in DNA. J. Bio. Chem., **255**: 492-501.

Ben-Yehuda, D. ;Krichersky, S. & Caspi, O.(1996). Microsatellite instability and P^{53} mutations in therapy related leukemia suggest mutator phenotype. Blood , **88**:4296 - 4303.

Bhamarapravati, S.; Pendland, S.L. & Mahady, G.B. (2003). Extracts of spice and food plants from thai traditional medicine inhibit the growth of the human carcinogen *Helicobacter pylori*. *In Vivo*, **17**: 541-544.

Bieber, S.; Elion, G. B.;Hitchings, G. H.; Hooper, D. C. & Nathan, H. C. (1962). Suppression of the immune response by drugs in combination. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **111**:334-337.

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.

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

Burfield , T. (2000). Odour profiling of essential oils and subjectivity sell C. Perf. Flav., **25**: 68-73.

Burt, S.A. & Reinders R.D.(2003). Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. Lett. Appl. Microbiol., **36**: 162.

Cadet, J.; Douki, T.; Frelon, S.; Sauvaiago, S.; Pouget, J.P. & Ravanat, J.L. (2002). Assessment of oxidation base damage to isolated and cellular DNA by HPLC-MS\MS measurement free radical. Biol. Med., **33**: 441-449.

Cai, L. & Wu, C. D.(1996) Compounds from Syzygium aromaticum possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. J. Nat. Prod., 59: 987-990.

Cannell , B. (1998). How to approach the isolation of natural products , 1 st edn. Human Press .inc.

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.

Celikler, S. ; Yildiz ,G. ; Vatan ,O. & Bilaloglu ,R. (2008) . *In Vitro* antigenotoxicity of *Ulva rigida* . Agradh (chlorophyceae) extract against induction of chromosome aberration ,sister chromatid exchange and micronuclei by mutagenic agent MMC. J. Biomed. Environ. Sci. , **21**: 492-498 .

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.

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.

Chami,N. ;Chami, F. ;Bennis,S. ;Trouillas, J. & Remmal, A.(2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. Braz. J. Infect. Dis., **8**: 217-226.

Charles, R.; Gard, S. N. & Kumar, S.(1998). An orsellinic acid glucoside from *Syzygium aromatica*. Phytochemistry, **49**: 1375-1376.

Cheng, S. ;Ding, L.; Zhen, Y. ;Lin, P. ;Zhu, Y.; Chen, Y. & Hu, X. (1991). Progress in studies on the antimutagenicity and anticarcinogenicity of green tea epicatechins. Chin. Med. Sci. J., **6**(4):233-238.

Clavin, M. ; Gorzalczany, S. & Macho, A.(2007). Anti inflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. J. Ethnopharmacol., **112**(3):585–589.

Coles, E. H. (1980). Veterinary clinical pathology 3rd edn. W. B. Sauhders Company. London .

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

Crook , T. ;Souhami , R. & Mlean , A. (1986). Cytotoxicity DNA cross– linking and single breaks in human leukemia cells . Cancer. Res., **46**(10): 5029 – 5034.

Cruickshank, R.; Duguid, J. P.; Mormion, B. P. & Swain, R. H. A., (1975). Medical Microbiology, Vol. 2, 12th edn. Edinburgh: Churchil Living Stone.

Cummings, J.; Spanswick, V.J. & Tomas, Z. (1998). Enzymology of mitomycin-C metabolic activation in tumor tissue: implications for enzyme-directed bioreductive drug development. Biochem. Pharmacol ., **56**:405–414.

Curtis E. K. (1990). In pursuit of palliation: oil of cloves in the art of dentistry. Bull. Hist. Dent., **38**:9–14.

Dashti, M.H. & Morshedi, A. (2009). The effects of *Syzygium aromaticum* (clove) on learning and memory in mice. Asian J. Trad. Med., **4** (4):128-133.

Deflora, S. & Ramel, C. (1988). Mechanisms of mutagenesis and carcinogensis classification and over view. J. Myt. Res ., **202**: 285 – 306 .

Dip, E.C. ; Pereira, N.A. & Fernandes, P.D. (2004). Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by Dieffenbachia picta Schott in mice. Toxicon**, 43**: 729-735.

Door , R. (1988). New findings in pharmacokinetic.6 metabolic and drug resistance aspects of Mitomycine–C . Sedmin. Oncol. **15**(3/4):32-43.

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

Duke, J. A. (2002). CRC Handbook of medicinal herbs. (CRC Med Herbs ed2).

Duke, J.A. ; Bogenschutz-Godwin, M.J. ; Decellier, J. & Duke, P.K. (2003). *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and L. M. Perry (Myrtaceae) Clavos, Clove, Clove tree, in CRC Handbook of Medicinal Spices, CRC Press, Washington DC, Pp 281.

Duthie, S.J.; Collins, A.R.; Duthie, G.G. & Dobson, V.L. (1997). Quercetin and myricetin protect against hydrogen peroxide-induced DNA damage (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human lymphocytes. Mut. Res., **393**:223-231.

El Hag, E. A.; El Nadi, A. H. & Zaitoon, A. A. (1999). Toxic and growth retarding effects of three plant extracts on *Culex pipiens* larvae (Diptera : Culicidae). Phytother. Res., **13**: 388-392.

EL-Segaey, O.; Abd–Allah, A. & Abu Al-Nooman, S. (2007). Experimental study of antioxidant and hepatoprotective effects of clove and cardamom in ethanol induced hepatotoxicity.Tanta. Med. Sci. J., 2(1):27-36.

Elujoba, A. A.; Odelleye, O.M. ; & Ogunyemi, C.M. (2005) . Review :Traditional medicine development for medical and dentaly primary health care delivery system in Africa .Afr . J. Trad. CAM, **2**: 46-61.

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.

Evangelista, C.M.W. ; Antunes, L.M.G. & Bianchi ,M.L.P. (2006) . *In Vivo* effects of multiple doses of dietary vegetable oils . J. Genet. Mol. Biol. **,29** (4) :730-734 .

Evans, J. & Oriordan ,M. L.(1977). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen testing .In: Kilbey, B. J. Ed. Hand book of mutagenicity lest procedures ,pp: 198.

Evans, J.(1976). Cytological methods for detecting chemical mutagens.IN: Hollaender, A. 1st edn. Chemical mutagens principles and methods for their detection volume four , plenum press , New york and London ,pp 5-6.

Fernandez-vancleve, J.; Salim, B. & Zavos, P.M.(1987). The effect of mitomycin C on daily sperm production potential and other spermatogenic parameters in mice. Drug Chem. Toxicol., **10**:275-290.(Abstract on line).

Forkman, G. & Martens, S. (2001). Metabolic engineering and application of flavonoids. Curr .J. Opinion Biotech ., **12**:155-160.

Fu, Y. ; Zu, Y. ; Chen, L. ; Shi, X. ;Wang, Z. ; Sun, S. & Efferth, T. (2007). Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. Phytother. Res., 21: 989–994.

Gautam, A. K. ;Avasthi , S. ;Sharma, A. & Bhadauria, R. (2010). Efficacy of triphala churn ingredients against *A. niger* and potential of clove extracts herbal fungitoxicant. Biol. Med. ,**2**(2): 1-9.

Geisman , T. A. (1962). Chemistry of flavonoids comopunds. Macmillan Co., New York.

Ghelardini, C.; Galeotti, N.; Di Cesare Mannelli, L.; Mazzanti, G. & Bartolini, A. (2001). Local anaesthetic activity of b-caryophyllene. II Farmaco., **56**: 387–389.

Griveau, J. F.; Dumont, E.; Renard, P.; Callegari, J. P. & Lelannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid per oxidation and enzymatic defense system in human spermatozoa. J. Reprod. Fert., **103**: 17-26.

Harborn , J. B.(1984). Phytochemical methods. 2nd edn. Chapman and Hall, Pp. 288.

Harborne, J. B. & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. Phytochemistry, **55**(6): 481-504.

Hata, T.;Sano, Y. & Sugawara, R. (1956). Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. Int. J. Antibiot., **9**:141–146.

Hemnani, T. & Parihar, M.S. (1998). Reactive oxygen species and oxidative DNA damage. Ind. J. Physiol. Pharmacol., **42**: 440-452.

Henglein, A.; Schnabel, W. & Wendeburg, J. (1969). Einfuhrung in die strahlenchemie Akabemie Verlag. Berlin, **28**: 195 -211.

Hipler, U.C.; Gornig, M.; Hipler, B.; Romer, W. & Schreiber, G. (2000). Stimulation and scavestrogen-induced inhibition of reactive oxygen species generated by rat sertoli cells. J. Arch. Androl., **44**: 147 – 154.

Holtz, K. H. ;Rockwell, S.; Tomasz, M. & Sartorelli, A. C.(2003). Nuclear over expression of NADH: Cytochrome b_5 reductase activity increases the cytotoxicity of Mitomycin-C and the total number of MC-DNA adducts in Chinese hamster ovary cells. J. Bio. Chem. **278**(7): 5029-5034.

Hour, T. C.;Liang, Y.C.; Chu, I.S. & Lin, J.K.(1999). Inhibition of eleven mutagens by various tea extracts,(-) epigallocatchen-3-gallato, gallic acid and caffeine. Food Chem. Toxicol., **37**:569-579.

Hua ; Yu, P. V.; Hikim, A. P.; Wang, C. & Stetoniv, K.(2000). Long term effect of tiphlide on spermatogenesis epididymal sperm function, and fertility in male rats. J. Androl., **21**(5):689-699.

Humason, G.(1997). Humason animal tissue techniques. 5th ed.London.

Hussain, A. ; Sasidharan, S. ;Ahmed, T.; Ahmed, M. & Sharma, C. (2009). Clove (*Syzygium aromaticum*) extract potentiates gemcitabine cytotoxic effect on human cervical cancer cell line .Int. J. Cancer Res.,**5**: 95- 104.

Hussein, M.M.A. ;Wada, S. ; Hatai, K. & Yamamoto, A. (2000). Antimycotic activity of eugenol against selected water molds. J. Aquat Animal Health **12** :224 -229.

IARC (1983). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans: some food additives, feed additives and naturally occurring substances. 31, W H O, p.47.

Irie, Y.(2006). Effects of eugenol on the central nervous system: It's possible application to treatment of Alzheimer's disease, depression and Parkinson's disease current bioactive compounds. Curr. Bioact. Compd., 2(1): 7-66.

Iyer, V. & Szybalski, W.(1963). A molecular mechanism of mitomycin action: Linking of complementary DNA strands. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **50**:355-362.

Jackson, S.J.T. & Venema, R.C.(2006). Quercetin inhibits eNOS, microtubules polymerization and mitotic progression in bovine endothelial cells .J. Nutr. , **136**:1178-1184 .

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

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.

Kadarian, C.; Broussalis, A.M. ; MinoLopez, J.; Gor-zalczany, P.; Ferraro, S. & Acevedo, G.(2002). Hepatoprotective activity of Achyrocline satureioides (Lam) D.C. Pharm. Res., **45**(1): 57-61.

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.

Katler, M. (1975). Some relation between teratogenesis and mutagenesis . Mut. Res., **33**: 29 -36.

Khalaf, N.A. ;Shakya, A. K.; AL-Othman, A. ; EL-Agbar, Z. & Farah, H.(2008). Antioxidant activity of some common plants. Turk. J. Biol., **32**: 51-55.

Khan, J.A.(2003). Biochemical effects of A methanolic extract of cloves on rats and some enzymes .Saudi .J. Biol. Sci., **10**(1).

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.

Kitazawa, Y.; Suemori-Matsushita, H. & Yamamoto, T.(1993). Low dose and high dose mitomycin trabeculectomy as an initial surgery in primary open-angle glaucoma. Ophthalmol., **100**:1624–1628.

Kumari , S. ; Rastogi , R.P. ; Singh ,K.L. ; Singh , S.P. & Sinha , R.P. (2008). DNA damage: Detection strategies . J. EXCLIJ, **14**(7): 44-45.

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

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

Kurpisz, .M .; Miesel, R .; Sanocka, D. & Jedrzejc, Z. (1996) .Seminal plasma can be predictive factor for male infertiliy . Human Reprod., **11**:223 – 1226.

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.

Lans, C.; Turner, N. & Khan, T. (2008). Medicinal plant treatments for fleas and ear problems of cats and dogs in British Columbia, Canada. Parasitol. Res., **103**(4): 889–898.

Layer, V. N. & Saybaiski, W. (1964). Mitomycine and cross- linking of DNA .Sci., **145**:55-58.

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.

Lee, M.H.; Yeon, K.Y.; Park, C.K.; Li, H.Y.; Fang, Z.; Kim, M.S.; Choi, S.Y.; Lee, S.J.; Lee, S.; Park, K.; Lee, J.H.; Kim, J.S. & Oh, S.B.(2005). Eugenol inhibits calcium currents in dental afferent neurons. J. Dent. Res., **84**: 848–51.

Liang, H.; Juan, H.; Ma, A.; Zhang, P.; Bi, S. & Shi, D.(2007). Effect of ethanol extract of *Alga laurencia* supplemination on DNA oxidation aqnd alkalation damage in mice. J. Clin. , **16**: 164-168.

Lin, C.C.; Hsu, Y.F.; Lin, T.C. & Hsu, H.Y.(2001). Antioxidant and hepatoprotective effects of punicalagin and punicalin on acetaminophen-induced liver damage in rats. Phytother. Res.,**15**: 206–212.

Longstaff, E. (1986) . Genitic toxicology, areviw Adv. Drug React. Ac. Pois. Rov., **4**:235-255.

Luna, L. G.(1968). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Linstitute of Pathology.3rd edn. MC. Graw Hill Book Co., New York. (Certed by Meyali, 1993).

Magaji, R.A. & Yaro, A.H. (2006). Preliminary phytochemical screening of the cold aqueous extract of *Syzygium aromaticum*. Biol. & Environ. Sci. J. Tropics, **3** (1): 4-6.

Malaya, G.; mazumder, V.; thamilselvan, I. ; manikandan, S.R. & kakotti, B.K. (2007). Potential Hepatoprotective Effect and Antioxidant Role of Methanol Extract of Oldenlandia umbellata in Carbon Tetrachloride Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats. IJPT., **6**: 5-9.

Matsuda,Y. & Tobari, I.(1988). Cromosomal analysis in mouse eggs fertilized *In vitro* with sperms exposed to ultraviolet light (UV) and ethyl methane sulfonate (MMS and EMS). Mut. Res., **198**:131-144.

Maura, A.; Pino, A. & Ricci, R.(1989). Negative evidence *In vivo* DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. Mut. Res.,**227**:125–129.

Meyer, E. & Walther, A.(1988). Methods for the estimation of protein, lipid, carbohydrates, and chitin in fresh water invertebrates . J. Arch. Hydro biol., **13** :61-177.

Mohammed, B. M.; Karim, J.K. & Yassen, Y.(2009). Antimutagenic effect of thymus syracuse extract against the genotoxity of gemcitabine in male albino mice. J. Duhok Univ.,**12**:216-226.

Montes-Belmont, R. & Carvajal, M. (1998). Control of *Aspergillus flavus* in maize with plant essential oils and their component. J. Food Prot., **61**: 616-619.

Myllyperkio, M. H.; Koski, T. R. A.; Vilop, L. M. & Vilop, J. A. (1999). Yirradiation- induced DNA single- and double-strand breaks and their repair in chronic lymphocytic leukemia cells of variable radiosensitivity. Hematol. Cell Ther., **41**: 95-103.

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.

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.

Nangle, M.R.; Gibson, T.M.; Cotter, M.A. & Cameron, N.E. (2006). Effects of eugenol on nerve and vascular dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. Planta Med.,**72**:494-500.

Nassar, M. I.(2006). Flavonoid triglycosides from the seeds of *Syzygium aromaticum*. Carbohydrate Res., **341**: 160-163.

Nassar, M. I.; Gaara ,A. H.; El-Ghorab ,A. H. ;Farrag A. H.; Shen, H.; Huq, E.; & Mabry, T. J.(2007). Chemical Constituents of clove

(*Syzygium aromaticum*, Fam. Myrtaceae) and their antioxidant activity. Rev. Latinoamer. Quím., **35(3)** :47-57.

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.

Oliveira, N.G.; Neves, M.; Rodrigues, A.S.; Monterio Gil, O.; Chaveca ,T. & Rueff, J.(2000). Assessment of the adaptive response induced by quercetin using the MNCB peripheral blood human lymphocytes assay. Mutagenesis, **15 :** 77-83.

Orwa, C.; Mutua, A.; Kindt, R.; Jamnadass, R. & Simons, A. (2009). (http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/).

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.

Polsa, K., Naidu, A. N., Ravindranath, I. & Krishnaswany, K. (2004). Inhibition of B(a)p induced strand breaks in presence of curcumin . Mut . Res ., *557* (2) : 203-213 .

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 .

Prasad, R. C. ; Herzog, B. ; Boone , B. ; Sims, L. & Waltner-Law, M. (2005) . An extract of *Syzygium aromaticum* represses genes encoding hepatic gluconeogenic enzymes . J. Ethnopharmacol. **96** : 295–301.

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

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

Rastogi, R.P. & Mehrotra, B.N.(1960). Compendium of Indian Medicinal Plants. New Delhi, India, pp.77.

Ress,T. J.(1993). The toxicology of male reproduction .M. Sc. Thesis, Portsomouth Univ.

Risso–De Faverney, C. ; Devaux, A. ; Lafaurie. M. ; Girard, J. P. ; Bailly, B. & Rahmani, R. (2001). Cadmium induces apoptosis and generation of reactive oxygene species. Toxicol.,**53**(1):65 – 76 .

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.

Saadalla, R. A. (1980). Biochemistry practical ,Manual. Collage of medicine, Basrah.

Saeed , S. & Tariq ,P. (2008) . *In vitro* antibacterial activity of clove against gram necative bacteria . Pak . J. Bot., **40**(5) :2157-2160.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., Pp.65.

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.

Sasaki, Y. F.; Kawaguchi, S.; Kamaya, A.; Ohshita, M.; Kabasawa, K.; Iwama, K.; Taniguchi, K. & Tsuda, S. (2002). The comet

assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mut. Res., **519**: 103-119.

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 .

Shah, V.C. (1975). Effects of some antibiotics on cell cycles of cultured and meristemic cells. In :Regulation of growth and differentiated functions in eukaryotic cells. (ed. Talwar, G.P.), Raven Press. New York, pp. 53-69.

Shahidi, F. ; Pegg, R. B. & Saleemi, Z.O.(1995). Stabilization of meat lipids with ground spices. J. Food Lipids, **2** :145–53.

Shihata , I. M.(1951) . A pharmacological study of anagllis arvensis, M.D. Vet. Thesis, Cairo Univ.

Shiraki, K.; Yukawa, T. & Kurokawa, M. (1998). Cytomegalovirus infection and its possible treatment with herbal medicines. Nippon Rinsho, **56**:156-160.

Shubber, E. K. & Salih , H. A. (1988). Viability of chromosomal aberration and SCE in the risk assesment of industrial poolution in man .J. Biol . Sec., **13**:24-30.

Shyamala, M.P.; Venukumar, M.R. & Latha, M. S. (2003). Antioxidant potential of the *Syzygium aromaticum*. (GAERTN.) LINN. (Cloves)in rats fed with high fat diet. Ind**.** J. Pharmacol., **35**: 99-103.

Singh, A. K.; Dhamanigi, S. S. & Asad, M.(2009). Anti-stress activity of hydro-alcoholic extract of *Eugenia caryophyllus* buds (clove). Ind. J. Pharmacol., **41**(1): 28-31.

Singh, G.; Wilson, M.R. & Foster, C.S.(1997). Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. Ophthalmol., **95**:813–821.

Singh, S. M. & Reimer , D. L. (1984). Distribution of sister chromosomes exchanges on the mouse chromosomes *In vivo* with reference to replication properties of X chromosomes. Canad. J. G. Cytol., **26**: 338 – 339.

Smith,I.(1958). Chromatographic Techniques, Vol. I, William Herneman. Medical Books Ltd., London, Pp. 18.

Smolensk , S. J.; Silinis , H. & Fransworth , N. R.(1972). Alkaloid screening .Ann. Biochem., **35** (1):31-34.

Soares, E. ;Sheridan, W.;Haseman, J. & Seagell, M.(1979). Increased frequencies of aberrat sperm as indicators of mutagenic in mice. Mut. Res., **64**:27-35.

Son , K. H.; Kwon , S. Y. ; Kim , H. P. ; Chng, H. W. & Kang ,S. S. (1998). Constituents from *Syzygium aromaticum* Merr. Et Perry . Nat. Prod. Sci., **4**(4) : 263 -267 .

Spector, J.E. ; Werkhaven, J.A. & Spector, N.C. (2001). Preservation of function and histologic appearance in the injured glottis with topical mitomycin-C. Laryngoscope 1999, 109:1125–1129. hearing in a canine model. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol., **110**:15–30.

Srivastava, K.G. & Justesen, U. (1987). Inhibition of platelet aggregation and reduced formation of thromboxane and lipoxygenase products in platelets by oil of cloves. Prostagl Leukotr Med. **29**: 11-18.

Srivastava,K.C. & Mustafa, T.(1993). Pharmacological effects of spices : eicosanoidm modulating activites and their significance in human health. Biomed. Rev., **2**: 15-29.

Stahl, R. G.; Frances , J. R.; Arrigni, E.; Thomas, S.; Matney, S.; Bernard ,S. & Johuston, D. A. (1984). Mutagenic and

cytogenic analysis of organic extract of simulated run off from model coal piles . (Certed by Meyali , 1993) .

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

Stich, H. F. & Sana, R. H. (1981). Topics in environmental physiology and medicine In: Short-term test for chemical carcinogenesis. Stich, H. and San, C. Eds. Springer verlag, New york ,Pp.187-199.

Sulieman, A.E.; El Boshra, I. M. O. & El Khalifa, E. A. (2007). Nutritive value of clove (*Syzygium aromaticum*) and detection of antimicrobial effect of its bud oil . Res. J. Microbiol. , **2**(3) :266-271.

Susin, S. A. ;Lorenzo, H.K. ;Zamzami, N. ;Marzo, I. ;Show, B.; Brothers, G. ;Mangion, M.; Jacotol, J.; Costantini, E.; Loffler, P.; Larochette, M; Goodlett, N.; Aebersold, D.;Siderovski, R.; Penhinger, D. & Kroemer, G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis inducing factor. Nature ,**397**:441-446.

Taguchi, Y. ;Ishibashi, H. ; Takizawa, T.; Inoue, S. ;Yamaguchi, H. & Abe, S. (2005). Prtection of oral or intestinal candidiasis in mice by oral or intragastric administration of herbal food , clove (*Syzygium aromaticum*).Jpn . J. Med. Mycol. ,**46** :27-33.

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.

Tanaka,T.;Orii,Y. ;Nonaka ,G . & Nishioka , I. (1993). Tannins and related compounds. CXXII. chromone, acetophenone and

phenylpropanoid glycosides and their galloyl and/or hexahydroxydiphenoyl ester from the leaves of *Syzygium aromaticum* Merr. et Perry.J. Chem. Pharm. Bull.,**41** (7):1232–1237.

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.

Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.; Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu, J. C. & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *In vitro* and *In vivo* genetic toxicology testing. Environ. Mol. Mut., **35**: 206-221.

Tice, R.R. (1995). The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In D.H. Phillips, and S. Venitt (Eds.), Environmental Mutagenesis. Bioscientific, Oxford, UK ,pp 315-339.

Toda, S.; Ohnishi, M.; Kimura, M. & Toda, T.(1994). Inhibitory effects of eugenol and related compounds on lipid peroxidation induced by reactive oxygen. Planta Med., **60:** 282.

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 .

Tomsaz, M. & Palom, Y.(1997). The mitomycin bio reductive antitumor agents: cross linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. Pharmacol. Ther., **76**:73–87.

Topham, J. C. (1980). The detection of carcinogene induced sperm head abnormalities mice. Mut. Res., **69 :**149-155.

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

Twigg, J.; Irvine, D.S.; Houston, P.; Fulton, N.; Michael, L. & Aitken , R.J. (1998). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: Protective significance of seminal plasma. Mol. Hum. Reprod.,**4**: 439-445.

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.

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.

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).

Vavreckova, C.; Gawlik, I. & Muller, K. (1996). Benzophenanthridine alkaloids of Chelidonium majus;I. Inhibition of 5-and 12-lipoxygenase by a nonredox mechanism. Planta. Med.,62:397-401.

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

Vilar, J.B. ;Leite K.R. & Chen, L. (2009). Antimutagenicity protection of *Ginkgo biloba* extract (Egb 761) against

mitomycin-C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. Genet. Mol. Res., **8** (1): 328-333.

Vorshinin, S. ;Plotko, E. ;Fink, I. & Nikforova, W.(1978). Cytogenitic action of inorganic compound of tungsten , zinc , cadmium and cobalt on human and animal cells . Histol. Genet. ,**12**:241-243.

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.

Wei, R.; Chiang, H.; Fu, W.; Chine, K.; Chung, Y. & Horng, L. (1990). Formosanin C, an immunomodulator with antitumor activity. Int. J. Immunopharmacol. ,**12** : 777-786.

Wolff, S.(1982). Chromosomal aberration ,sister chromatid exchange and the lesions that produce them .Copyright by Holwiley and sons. Inc. USA.

Yahagi,T.; Degawa, M.; Seino, Y.; Matsushinna, T.; Nagao, M. & Hashimoto,Y. (1988). Mutagenecity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. Cancer Lett., **1**:19-96.

Yang ,Z. J. ; Ye, W. S.; Cui, G. H.; Guo, Y. & Xue, S. P. (2004). Combined administration of low-dose gossypol acetic acid with desogestrel / mini – dose ethinylestradiol / testosterone undecanoate as an oral contraceptive for men . contraception, **70** (3): 203-211.

Yaseen, N.Y. (1990). Cytogenetic study of human colorectal cancer cell. Ph.D. Thesis, Univ. Sheffield.

Yaseen, N.Y. ; Tawfiq, M.S. ; Hamadi, A.A. & Estivan, A.G.(1998a). Cytogenetic studies on patient with chronic mylocytic leukemia. Med. J. Tikrit Univ., **4**:5-9 .

Yassen, A. A. ;Salih, A. M.; Harbawi, D. & Jaber, T. A.(1998b). Anew modified medium for human peripheral blood Leukocytes cultures. Al- Kufa J. , **1**: 10- 14.

Yoshida, M.; Yamamoto, R. & Nikaido, T. (1992) . Inhibition of mitosis by bunding to the cholchicine site of tubuline. cancer Res.,**52** : 6676-6681.

Yu, F. & Pan, S. S.(1993). Effect of PH on DNA alkylation by enzyme activated mitomycin-C and porfiromycine. Mol. Oharmacol., **43**:863-869.

Zdienicka , M. ;Hryraewiez , M. & Peinkowska ,M.(1982). Thiram induced sperm head abnormalities in mice . Mut. Res.,**102**:261-264.

Zheng, G.; Kenney, P.M. & Lam, L.K.T.(1992). Sesquiterpenes from clove oil*, Eugenia caryophyllata* as potential anticarcinogenic agents. J. Nat. Prod., **55**:999–1003.

SUMMARY

This study was designed to evaluation the antioxidant and anti mutagenic activity of methanolic water extract of clove dried flower buds (Myrtaceae) *in vivo* and *in vitro* (male rats) ,so this study was covered many subjects:

- extract has been described using thin layer chromatography TLC. The results showed the presence of more than one component of this extract when using multiple different liquid phases. When examining the activity of antioxidant by β-carotene spray process ,It was observed appearance of the antioxidant activity in several bands .
- Cytogenetic analysis tests in male rats which including DNA fragmentation test ,mitotic index (MI), chromosomal aberration (CA) in bone marrow and sperm abnormality. The interaction between 500mg/kg of plant extract and 2mg/kg of MMC was making in three forms of treatment of extract (before)(with)(after) mutagen MMC to assess extract activity in prevented or decreased the drug action , and to know the mechanisms which making it the active compound of the extract. Then the treatment of clove extract (with)drug have been tested for different periods to know the accumulative effects of clove extract in prevent or decreased the drug action.

It has shown the results for the DNA fragmentation that extracted from white blood cells of rats ,the interference treatment of extract (before), (with) and (after) the mutagen performed the level of fragmentation with molecular size 6000,2000,4000 base pair respectively compared with positive control 9700 base pair, that mean the all interferences lead to decreased the level of DNA fragmentation and the treatment (with) was the best . So the result of the oral gavage of mixing the extract with mutagen for five weeks had been showed, in the first week led to level fragmentation with molecular size 4000 base pair compared with positive control 9000 base pair, while during the second and third week of treatment the level of fragmentation of DNA were 5000, 5000 base pair respectively when compared between each other or with the first week of treatment. The fourth and fifth week of treatment the level of fragmentation of DNA were 2000, 1000 base pair respectively compared between each other. This indicates that the oral gavage of mixing the extract with mutagen reducing the level of the crash in the DNA.

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 at a significant differences 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 to 1.93 compared with positive control in a significant difference 0.09 , while during the second and third week of treatment the value of MI was reached to 2.03, 2.16 respectively without any significant difference when compared between each other or with the median MI to the first week of treatment . The fourth and fifth week , the value were 2.73 , 2.7 respectively did not give show any significant difference when compared with the negative control 3.2.

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) 14.0 ,14.0 respectively and in a significant differences to the positive control , 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 of first week to 14.66 compared with positive control at a significant differences 24.33 , while the second , third and fourth week the median CA was reached to 12.0 ,12.33 and 12.66 respectively and not posses any significant differences between each other or with median CA to the first week of treatment. also the fifth week of the treatment did not posses any significant difference 9.0 compared with negative control.

Also the result of mice sperm abnormality which treated with MMC had shown an increase to 953.3 from1000 sperms compared with negative control 159.6, where the interference with the treatment (with) and (before) to decrease the median abnormality to 591.0 , 630.6 respectively with a significant difference compared with the positive control. While the interference treatment (before) did not posses any significant difference 883.0 compared with positive control. While the results of abnormality to continuous oral gavage to the interference treatment (with) showed that the samples of positive control were decreased to 913.7 compared with negative control 159.7 this led to decrease the median abnormality of the first week of treatment (with) to 585, where the second , third and fourth week the

median abnormality was reached to 420.3 , 402.3 , 360.7 respectively and not posses any significant difference when compared between each other or with median abnormality of first week treatment , while the fifth week did not possessed any significant difference 173.3 compared with negative control.

- Finally the test of changing in pathological tissue, the results of microscopically examination of liver tissue mice which treated with mutagen showed necrosis , infiltration , lesion in liver cells and tissue hemorrhage , while the results of interference treatment (with) for five weeks was possessed a good improvement without any pathological tissue changing.

Ministry of Higher Education & Scientific Research
University of Kerbala–College of Education
Department of Biology

Study of anti mutagenic and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum*) plant Extract in male rats

A thesis submitted to the college of Education of Kerbala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of master in Science Biology / Zoology

By

Radhiah Najim Abd

Supervised By

Pro. Dr. Ali Hmood AL Saadi Pro. Ass. Dr. Sattar Hatrosh

April / 2011