التأثير المطفر لنباتات العائلة الصليبية الرشاد *Lepidium sativum* والجرجير *Eruca sativa* مقارنة بالجزر *Daucus carota*

زهرة محمود الخفاجي * ،الهام عبد الهادي خلف* ، غيث لطفي العزاوي*

تاريخ قبول النشر 2005/10/5

الخلاصة

درس التأثير المطفر لبعض نباتات العائلة الصليبية واسعة الاستعمال وهي الرشاد *Lepidium_sativum* والجرجير *Eruca sativa* واستعمل الجزر *Daucus carota* من العائلة الخيمية،كمعاملة ضابطة باستعمال نظام تطفيري بكتيري مكون من ثلاث عزلات

.(*Bacillus spp*)G_3,(*Arthrobacter spp*)G_{12}, (Brevibacterium spp)G_{27} ,

أدت معاملة الخلايا بالمستخلصات النباتية الى خفض أعداد البكتريا الحية بدرجات متقاربة ولكن لم يؤد نبات الجرجير الى انخفاض العدد في عزلتين هما G_{27}, G_{12}.

أما التأثير التطفيري فادت المعاملة بنباتات العائلة الصليبية الى حث الطفرات المقاومة للستربتومايسين في العزلة G_{12}الأكثر حساسية ثم في العزلة G_3، اما العزلة G_{27} فلم يظهر فيها أي تأثير مطفر ، ولم يحدث حث طفرات مقاومة للريفامبسين كمؤشر وراثي آخر في العزلات الثلاث .

المقدمة

العلاقة بين التطفير والتسرطن وثيقة لحد ما ولذلك تستعمل الانظمة قصيرة الامد باستعمال البكتيريا للكشف عن قابلية التسرطن للعديد من المواد وخاصة المواد الغذائية (1،2). ومن المعروف ان الانظمة قصيرة الامد تكشف عن التسمم الوراثي Genotoxicity (3) ولكنها غير قادرة على كشف المواد المسرطنة التي تؤثر بشكل غير مباشر Epigenetic carcinogens (4). والاغذية تحوي على العديد من المسرطنات خاصة الاغذية المطبوخة فالبروتينات المحروقة تشكل خطرا كبيرا (5،6) ، ومن جهة ثانية فان النباتات الطازجة تحوي على المسرطنات أيضا (7) ولكنها تحوي في الوقت نفسه على مضادات السرطان (8).

وتشير الدراسات الى العلاقة العكسية بين تناول الخضر الطازجة الحاوية على فيتامين A,C ومواد اخرى وهذا صحيح بالنسبة لعموم الخضر ولكنه ليس مطلقا بالنسبة لخضر العائلة الصليبية (1)، ولكن هناك دراسات تناقض هذه الدراسات والتي تشير الى ان نباتات العائلة الصليبية مثل اللهانة (Cabbage) ، يمكن ان تمنع سرطانات خاصة مثل سرطان القولون في النساء وغيرها من السرطانات (9,6)وقد ازداد الاهتمام بالانظمة القصيرة الأمد للكشف عن المواد المطفرة والمسرطنة لكونها سريعة وغير مكلفة ولتواجه زيادة عدد المواد المسرطنة وضرورة الكشف عنها بالسرعة الممكنة (1،10) ، ولكن من معوقاتها إنها تجري خارج الجسم الحي وان كانت تزود بمعلومات مفيدة فيما إذا كانت المادة مسرطنة ام لا ولكنها لاتحدد مدى خطورة المسرطنات (1) ، وقد اختير نباتين من العائلة الصليبية المستخدمة على نطاق واسع وهي الجرجير والرشاد ودراسة قابليتها التطفيرية باستعمال نظام بكتيري ومقارنة هذه الفعالية مع سيطرة مقارنة وهو استعمال الجزر.

الخضر المستعملة

استعملت اوراق الرشاد *Lepidumi sativum*(Rish) واوراق الجرجير(J) *Eruca sativa* تعود الى العائلة الصليبية Cruciferae وجذور الجزر(Ca) *Daucus carota* من العائلة الخيمية Umbelliferae تم شراؤها من الاسواق المحلية لمدينة بغداد .

تم الحصول على العصير الخام منها وفق دراسة سابقة (11) واستعملت لمعاملة عزلات نظام بكتيري مكون من ثلاث عزلات G_{27} , G_{12} , G_3 كما في دراسات سابقة (11، 12).

وبعد معاملة عالق الخلايا بالمستخلصات النباتية تم تحديد المتبقي من الخلايا الحية Survival fraction ($S\chi$) وما يقابلها من عدد الاهداف القاتلة Lethal hits في الخلية ($H\chi$) (13). وكذلك تم تحديد عدد الطفرات المستحثة المقاومة للستربتومايسين والريفامبسين (12).

النتائج والمناقشة

استعمل (G-system) (12) المتكون من ثلاث عزلات بكتيرية حساسة للستربتومايسين والريفامبسين .لدراسة التأثير المطفر للنباتات ، والنظام مكون من ثلاث عزلات: (*Bacillus* spp) G_3 ، G_{12} (*Arthrobacter* spp) و G_{27} (*Brevibacterium* spp) ويوضح (شكل1) تاثير المستخلصات في الجزء المتبقي من الخلايا ($S\chi$) بعد المعاملة لمدة 15 دقيقة واضافة 500 مايكروليتر من المستخلص النباتي الخام الى 5 مللتر من عالق خلايا العزلات في دارئ الفوسفات (pH 5.5) (11،12) ويلاحظ من الشكل ان العزلةG3 قد تأثرت بشكل قليل والذي قلل قيم ($S\chi$) والذي انسحب على قيم ($H\chi$) التي هي علاقة دالة عكسية للـ($S\chi$) (13) .

أما العزلة G_{12} فقد تأثرت بشكل اكبر في حالة استعمال الجزر والرشاد ولكنها لم تتأثر بوجود

* معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد

مستخلص الجرجير وربما تعود الزيادة الملحوظة عن قيمة (1 للـ $S\chi$ التي تمثل 100 %) هو إن العزلة تكون بشكل سلاسل والمعاملة تؤدي الى تفكك هذه السلاسل وإعطاؤها أعداد حية اكثر على شكل مستعمرات ممثلة CFU (Colony Forming Units) او لاسباب أخرى. ويلاحظ ان تأثير الجرجير كان مشابها عند دراسة العزلة G_{27} والتي تاثرت بشكل سلبي ايضا في حالة استعمال الجزر والرشاد. ودراسة مدى تأثير المادة على العدد الحي للعزلة يعد اول المؤشرات لتاثيرها وذلك لملاحظة تاثيرها السمي ولكن موت الخلايا يعد حدثاً مختلفاً او مستقلاً نوعا ما عن عملية التطفير (13).

اما التأثير المطفر في الخلايا وحثه لطفرات مقاومة للستربتومايسين والريفامبسين والتي تعد من الواسمات الكروموسومية الثابتة Chromosomal genetic markers (11) فموضحة في (الشكل2). ويلاحظ من النتائج إن الجزر لم يحث أي من الطفرات وان كان اثر على ($S\chi$) للعزلات الثلاث المذكورة أعلاه. ولكن استجابة العزلة G_3 و G_{12} كانت مختلفة حيث حثت فيها طفرات مقاومة للستربتومايسين فقط وليس للريفامبسين. في حين إن العزلة G_{27} لم تحصل فيها استجابة بالنباتات الثلاثة.

ويلاحظ من النتائج أعلاه ان الجزر الذي استعمل كمعاملة مقارنة (Comparative control) لم يحث أي طفرات وهذا خاضع لحقيقة ان المواد الغذائية الطازجة تحوي العديد من المواد المضادة للتطفير Bioantimutagens (148،) وذلك بعملها كمضادات أكسدة أو غيرها من الفعاليات ويأتي الجزر في مقدمة الاغذية التي تؤدي الى تقليل السرطانات (15).

أما بالنسبة لباقي الخضر فان العديد منها وجد انه يثبط القابلية التطفيرية لمطفرات قياسية خارج الجسم الحي *Invitro* إلى مدى بعيد فعلى سبيل المثال تصل القابلية المضادة للتطفير في اللهانة والفلفل الاخضر وباستعمال سلالة ايمس TA98 مقابل مطفرات موثوقة بين 0-100 % ، اما اكثر النباتات كفاءة في هذا المجال فهو الباذنجان Egg plant الذي تصل فعاليته حوالي 50-80 % وكذلك نباتات العائلة الصليبية التي تصل كفاءتها ما بين 60-90 % (14), حيث عدت النتائج موجبة (+) فيما اذا أدت الى زيادة في عدد الطفرات بمعدل 2-4 مرات مقارنة بقيم السيطرة السالبة ، وأعطيت درجة (++) اذا كانت الزيادة من 5-10 مرات ، (+++) إذا كانت الزيادة اكثر من عشر مرات (17،16).

وبالنسبة للعائلة الصليبية تختلف النتائج فبعضها أظهرت ان لها تأثيراً ضاراً لأنها تحوي على مركبات Isothiocyanates وأنواع مختلفة من الفينولات و Indoles والتي ظهر ان لها تأثير سلبي (1)، ولكن يبدو ان التأثير الضار لها ناتجا عن استخدامها بشكل نقي في الاختبارات. اما في أجسام الأحياء فان لنباتات العائلة الصليبية تأثير إيجابي في منع السرطانات في مواقع مختلفة من الجسم ويعود ذلك الى ان الأنواع الحلقية Aromatic isothiocyanates مثل Benzylthiocyanate يحفز فعالية الأنزيم S- Glutathione transferase الذي يعد من أنظمة الدفاع الخلوية المهمة (14،15) كما ان له تاثير خارج الجسم الحي في احباط التاثير للمطفرات المعروفة مثل Captan , Mitonycin C (14). كما ان الأنزيمات الأخرى التي لها علاقة بالكلوتاثايون لها تأثيرات إيجابية في تعطيل المواد المسرطنة (1).

وفيتامين C في الأغذية الطازجة يلعب دورا مهما في تثبيط المطفرات (Desmutagen) (148،) بالإضافة الى إن الألياف النباتية التي تمتز المواد المسرطنة بشكل غير قابل للرجوع في اغلب الأحيان وتؤدي بالتالي الى التخلص من المسرطنات (14).

وبما ان عملية التسرطن هي ليست بالعملية البسيطة فان تحديد المواد التي تمنع التسرطن والأخرى التي تحث التسرطن في الأغذية هي عملية معقدة أيضا ، وذلك لان الأغذية تكون عادة بشكل خليط معقد. ومن الصعب توضيح تأثير نباتات العائلة الصليبية فهي تحوي أيضا على بيتا-كاروتين وفيتامين C والكالسيوم. وبما ان التطفير هو تأثير مباشر على DNA في الانظمة قصيرة الأمد (3)، لذا فان نتائج هذه الدراسة تؤخذ على محمل الجد وان اختلفت العزلات فيما بينها. حيث ان هذا وارد في أنظمة أخرى مثل نظام ايمس (18،17) ولذلك يمكن أن تكون هذه الدراسة منطلقا لدراسات طويلة الأمد تهدف الى تحديد TD_{50} (Dose mg/kg/day) والأخذ بنظر الاعتبار حجم الهدف او عدد الخلايا في العضو الهدف الذي يتعرض للمسرطنات لتحديد خطر التعرض (5). ومن ناحية ثانية فان العديد من الجهات المشرعة توصي باستخدام اكثر من نظام لتحديد القابلية التطفيريةوالتسرطنية للمواد (101،). كما ان المواد التي تثبت فعاليتها في منع التطفير مثل الجرجير (11) لايمكن ان تفسر نتائجها على انها مفيدة للإنسان وبالتالي الإكثار من تناولها فقد يكون لها تاثير ضار (1)، وذلك يتضح من ان المواد التي تؤدي الى تنشيط انزيمات Monooxygenases في الجسم ، كما ان الجرجير على وجه الخصوص يجمع كميات كبيرة من النترات والتي تزيد عند استعمالها كأسمدة (20،19) والتي قد تكون السبب في حث الطفرات.

المصادر

1- Committee on Diet ,Nutrition ,and Cancer.1982.National Academy Press:Wahington,USA.

2- Kundsen,I.(Ed.) 1986.Genetic Toxicology of the Diet.Alan R.Liss,Inc. :New York.

3- Williams,G.M.1984.DNA damage and repair tests for the detection of genotoxic agents. Food Additives and Contaminants. 1:173-178.

4- Williams,G.M.1986.Food-Borne Carcinogens.*In*"Genetic Toxicology of the Diet"Ed.I.Kundseu.Alan R.Liss,Inc.:New York.

5- Sugimura,T.,Sato,S.,Ohgaki,H.,Takayama,S.,Nagao,M.and Wakabayashi ,K.1986.Mutagens and Careinogens in Cooked Food.Genetic Toxicology of the Diet *In*.Ed. I. Kundsen.Alan R.Liss,Inc.:New York.

6- Miller,A.B.,Howe,G.R.,Jain,M.,Craib,K.J.P.andHarrison,L.1983.Food items and food groups as risk factors in a case-control study of the diet and colorectal cancer.Int.J. Cancer.32:155-161.

7-Hirono,I.1986.Careinogenicity of Plant Constituents:Pyrrolizidine ,Alkaloids,Flavonoids,Bracken Fern *In*.Gnetic Toxicololgy of the Diet. Ed.I.Kundsen.Alan R.Liss,.Inc.: New York.

8- Ames,B.N.1983.Dietary carcinogens and anticarcinogens (oxygen radicals and degenerative diseases). Science.221:1256-1264.

9- Wattenberg,L.W.1983.Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents.Cancer Res.43:2448-2453.

10- Bridges , B.A.1976.Short term screening test for carcinogens.Nature 261: 195-200.

11- Khalaf,E.A.;Al-Khafaji,Z.M.and Al-Salmani,M.S.2005.Antimutagenicity of Arugula(*Eruca sativa*)and carrot (*Daucus carota*)against induction of streptomycin resistant mutants in the bacteria.In Um–Salma Jsci,2:174-181.

12- Al-Azawi,G.L.,Al-Khafaji,Z.M., Al-Mashadani,W.Y.and Al-Hassan ,A.A.M.2005,Developing of bacterial mutagenic assay system for detection of environmental and food mutagens.I Mutagenesis with standardmutagen,Nitrosoguanidine.2:355 -363

13- Eckardt,F.and Haynes,R.H.1981. Quantitative Measures of Induced mutagenesis.*In* "Short-Term Tests for Chemical Carcinogens" Eds.H. F.Stich and R.H.C.San.Springer-Verlag:New York,Berlin.

14- Kada,T.,Inoue,T.,Morita,K.and Namiki,M.1986.Dietary Desmutagens.*In* "Genetic Toxicology of the Diet".Ed.I.Kundsen.Alan R.Liss, Inc.:New York.

15- Ames,B.N.1986.Food Constituents as a Source of Mutagens,Carcinogens,and Anticarcinogens.*In*"Genetic Toxicology of the Diet"Ed.I .Kundsen.Alan R.Liss ,Inc.:New York.

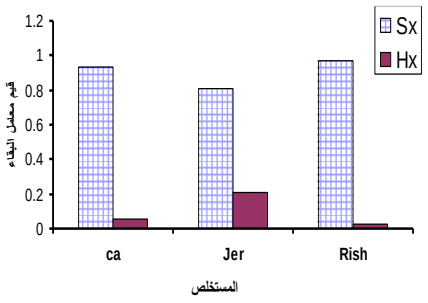
16- Ames,B.N.;McCann,J.and Yamasaki,R.1975.Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mamalian-microsome mut agenicity test.Mut.Res.31:347-364.

17- Goggelmann,W.and Schimmer,O. 1980.Mutagenic Activity of Phtyotherapeutical Drugs.*In*"Genetic Toxicology of the Diet" Ed.I .Kundsen.Alan R.Liss,Inc.:New York.

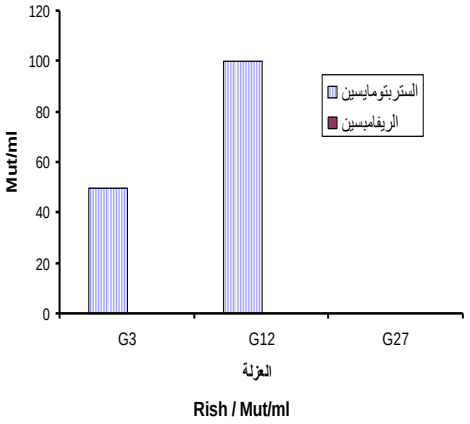
18- Felkner,I.C.,Laumbach,A.D.and Harter,M.L.1981.Development of *B.subtilis* system to Screen Carcinogens/Mutagens:DNA-Damaging and Mutation Assays.*In* "Microbial Testers: Probing Carcinogenesis"I. C.Felkner.Marcel Dekker.New York,Basel.

19- Lenzi,A. and Tesi,R.2000.Effect of some cultural factors on nitrate accumlation in rocket(*Diplotaxis tenui faliaL*)DC.Eruca sativa Mill L.Rivista di Agronomia.34:419-24.

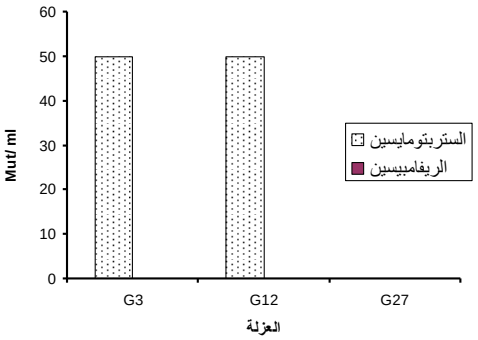
20- Parente,A.,Serio,F.and Santamaria ,P.2000.Asimple way to reduce nitrate content of rocket *Erucaresicaria* L.subsp.sativa Mill.Atti.V.G .ioranate.Scientiches,S.O.L.1:257-578.



G3/ca,Jer, Rish / Sx vs Hx

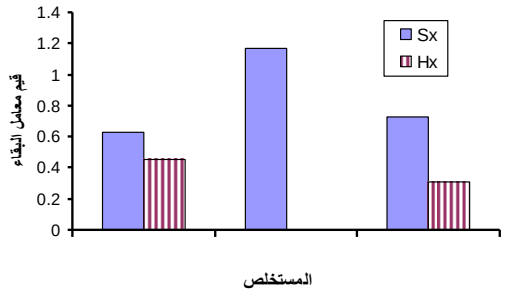


Rish / Mut/ml

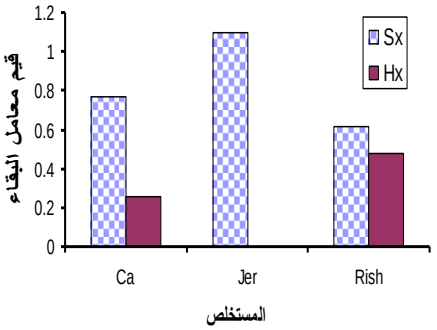


Jer / Mut/ml

شكل 2 : التأثير المطفرلمستخلصات الجزرca، والجرجير Jer والرشاد Rish



G12/ ca,Jer, Rish / SX vs Hx



G27/ ca, Jer, Rish / Sx vs Hx

شكل1: تأثير المستخلصات النباتية للجزر ca، Jer، Risht في المتبقي من الخلايا Sx

Mutagenic Effect of Crucifers *Lepidium sativum* and *Eruca sativa* in Comparison to Carrot *Daucus carota*

Zahra M.Al-Khafaji* ,Elham A.Khalaf*,Gaith L.Al-Azawi*

***** Genetic Engineering of Biotechnology Institute for Postgraduate Studies/University of Baghdad/IRAQ.

Abatract

The mutagenic effect of some crucifers widely consumed *Lepiduim sativum* (Garden cress) and Arugula (*Eruca sativa*) was studied in comparison to carrot (*Daucus carota*), using bacterial mutagenic system composed of three bacterial isolates; (*Bacillus spp*)G_3 *(Arthrobacter spp)*G_{12}, and (Brevibacterium spp)G_{27} , .

Treatment of isolates with plant extracts led to reduction in survival fraction (*Sx*)at different levels except that Aurgula extract did not show any inhibitory effect in isolates G_{12} and G_{27}.

Crucifers extracts induced streptomycin resistant mutants in G_{12} at higher level than G_3 , but not in G_{27}. No resistance to rifimpacin was detected in all isolates.