الترقيم الدولي ٨٦٩٠ - ١٩٩١ ISSN 1991- 8690

website :http:// jsci.utq.edu.iq Email: utjsci@utq.edu.iq

دراسة تأثير المستخلص الكحولي لبذور العنب و الشاي الأخضر على التغيرات الكروموسومية و معامل الانقسام الخيطي في الفئران المختبرية

أقبال فاضل علوان عمار مولى حمود حسين علي محمد

وزارة العلوم و التكنولوجيا – دائرة بحوث المواد – الجادرية– بغداد – العراق . ص. ب. ٧٦٥.

الخلاصة

درست مانعات التأكسد على نطاق واسع لقدرتها على حماية خلايا الكائنات الحية من ضرر الأكسدة ، و أكد الكثير من الباحثين على ذكر بذور العنب والشاي الأخضر بأنها ذات فعالية ضد عملية التأكسد. تم الحصول على المستخلصات الكحولية لنباتات بذور العنب و الشاي الأخضر، لغرض عمل توليفة مستخلصات دوائية ، وتحتوي مكونات هذه التوليفة على من 125 ملغم من مستخلص الكحولي لبذور العنب و 125 ملغم من مستخلص الكحولي للشاي الاخضر مع اضافة عدد من الفيتامينات (A,C,E) . وقد درست التأثيرات السمية لثلاثة تراكيز مختلفة منها(٥٠، ١٠٠، ٢٠٠ ملغم / كغم) على الفئران المختبرية من خلال التجريع عن طريق الفم خلال شهر من إجراء التجربة. أشارت النتائج بأنه لا توجد فروقات معنوية (على مستوى $p<0.05$) لتراكيز المستخلصات الكحولية لبذور العنب و الشاي الاخضر على استحثاث التشوهات الكروموسومية و معامل الانقسام الخيطي كما انه لم تشر النتائج على اي تأثيرات سمية بالجرع المستخدمة مقارنة بالحيوانات السيطرة .

الكلمات المفتاحية : تغيرات كروموسومية ، مستخلصات بذور العنب و الشاي الأخضر .

Study the effect different concentrations of active substances derived from plants on chromosome aberrations and Mitotic index in laboratory mice

I.F .Alwan A. Moula Hmood H.Ali Mohammad

Ministry of science and Technology- Research department material – Jadiriya-Baghdad – Iraq , P.O. Box 765

Abstract

Antioxidants studied extensively for its ability to protect the cells of living organisms from oxidative damage, and confirmed a lot of researchers mention of grape seed and green tea as effective against the oxidation process.

Was obtained extracts alcoholic plants grape seed and green tea, for the purpose of formula extracts of medicinal plants and contain components of this formula 125mg of extract alcohol to grape seed and 125mg of extract alcohol of green tea with the addition of a number of vitamins (A,C,E).Having examined the toxic effects of three different concentrations of formula (50, 100, 200 mg) on laboratory mice by oral dosage within a month of the experiment . The results indicated that there were no significant differences at the level of ($p<0.05$) for concentrations of alcoholic extracts of grape seed and green tea to induce chromosomal aberrations and mitotic index , mention the results on any effect toxicity dose used compared to control animals .

Keywords: chromosome aberration, extract of grape seed and green tea.

المقدمة

لقد أزداد إهتمام خبراء الصحه بالوقت الحاضر باستعمال طب الأعشاب بصوره ملحوظة، وذلك لكونها المصدر الطبى العلاجى المتوفر والشائع كبديل عن العقاقير المصنعه فى البلدان النامية . استخدمت النباتات و الاعشاب منذ القدم حيث كان أسلافنا يعزلون المفيد كغذاء و نظرا لآهمية هذه النباتات من الناحيه الطبية فقد انتشرت زراعتها فى جميع بقاع العالم و تنوع استخدامها (١، ٢). اكتشفت مؤخرا العديد من المركبات التي لها ملكية ضد عمليات التطفير في الخضار و التوابل و الشاي الأخضر حيث أجمع الباحثين على ان كمية الغذاء تقلل من خطر الاصابة بالسرطان و أمراض خبيثة أخرى تصيب الإنسان (٣). أما مركبات مانعة التأكسد خصوصا مركبات الفينولات الموجودة في كل من حامض كإلك ، تأنين ، الكركم ، حامض اللاجيك و أجينول لذا كان وجهة نظر و أهتمام الكثير من الباحثين بأن الغذاء هو مانع تأكسدي إضافي (٤). تعتبر مركبات البولي فينول ذات نشاط واسع حيث تدخل في مستحضرات التجميل ولها تشكيلة واسعة تعمل كمانع تأكسد ضد المواد المطفرة و المسرطنة. أن المستخلصات الكحولية من الشاي الأخضر و بذور العنب تستعمل بانتظام كمواد فعالة داخل الجسم ضد السرطان و بعض المركبات الكيمياوية التي تستخدم أثناء علاج الإمراض السرطانية (٥) و كذلك لها ملكية علاجية لبعض الإمراض الإنسانية (٦). إن المستخلصات الكحولية لمركبات التوليفة هي مركبات فينولية تستعمل بشكل دوري في علاج السرطان كبديل عن العلاج الكيمياوي و كذلك تعمل كمثبط للإمراض السرطانية وبعض الإمراض المزمنة في التجارب الوراثية المتنوعة . وهناك ايضآ اهتمام للتحقق من تأثير السمية على العوامل الوراثية من خلال دراسة الجذور الحرة التي تنتج العوامل ضد أكسدة دمج الـ DNA (٧). هدف الدراسة الحالية هو التحري عن عمل مانعات التأكسد في المستخلصات الكحولية لنباتات التوليفة وهي مركبات فينولية وذلك بتقييم تأثيرها على تردد الانحرافات االكروموسومية الموجودة في نخاع العظم للحيوانات المختبرية .

المواد و طرائق العمل

تحضير المستخلص

يتم تحضير المستخلصات بطريقة المحلول الكحولي 50% كحول – 50% ماء وبنسبة 7.5:1 ثم يسخن الخليط بدرجة حرارة 50ْم لمدة ساعتين مع التحريك المستمر و بعدها يرشح و يركز الراشح بواسطة المبخر الدوار ثم يجفد المحلول بجهاز التجفيد بالتبريد للحصول على مسحوق . ويتم قياس المركبات الفعالة في مسحوق مع نماذج قياسية مجهزة من شركة Spulco. تم استخدام جهاز HPLC من نوع A6 Shimadza ، نوع العمود ODS C_{18} (**8**).

الطورالمتحرك : A مكون من ماء لا ايوني + حامض الفسفوريك (1 – 1000) حجم / حجم .

: B مكون من أسيتونايترايل + حامض الفسفوريك (1000-1) حجم / حجم .

البرنامج المزج يتكون من –(min.)-15%,(20min)- 30%,(25min)- 100%, (45min) % 0=B

معدل سرعة الطور المتحرك = .UV. 258 nm ,1ml / 1min .

تركيبة لكل الكبسولة هي :-

1- Grape seed (OPC) extract 125mg

2- Green tea catachin extract 125mg.

والجرعة اليومية ٤ كبسولات . وقد أختيرت هذه النسب اعتمادآ على دراسات علمية لها علاقة بالمواد الفعالة والتركيز الامثل لها في معالجة الإمراض (**9**) .

المحلول دارئ الفوسفات الفسلجي – Phosphate Buffer Saline (PBS) , PH=7.4

الحيوانات المختبرية

استخدم (١٦) فأر ذكر من نوع (Swiss albino) بعمر (5 أو 8) أسبوع و بوزن تقريب (20-25) غم وزعت عشوائيا الى اربعة مجاميع متساوية منفصلة ووضعت في اقفاص بلاستيكية . تم تغذيتها بالاضافة الى العلف المركز و الماء على تراكيز مختلفة من التوليفة لمستخلصات النباتية وهي(٥٠و١٠٠و٢٠٠ ملغم /كغم) يومياً عن طريق الفم لمدة ٤ أسابيع بعدها تم قتلها عن طريق خلع الفقرات العنقية للحيوانات وأخذ نخاع العظم .

المحاليل المستخدمة :-

١- دارىء الفوسفات الفسلجي PBS

الكوسجين ٠.١ ملغم / ٠.١ مل .

٢- كلوريد البوتاسيوم (٠.٠٧٥M) .

٣- محلول التثبيت .

٤- صبغة لشمان.

٥- صبغة كمزا : Giemsa

٦- محلول بيكربونات الصوديوم (٠.٧٥%)

الاختبارات الوراثية :

طريقة الحصول على كروموسومات الخلايا الجسمية لإجراء الاختبارات الوراثية إتباع طريقة (Allev و جماعته ١٩٧٧)(١٠) و كما يلي :

- حقن الحيوان (٠.٢٥مل) من محلول الكولجسين بتركيز ٠.٦ملغم لكل ١كغم من وزن الجسم وذلك عن طريق غشاء الخلب.
- ثم يقتل الحيوان بعد ساعتين و ذلك عن طريق فصل الفقرات العنقية ويثبت الفأر على جهة الظهرية فوق طبق التشريح ، يقص الجلد من فوق منطقة الفخذ و يقص عظم الفخذ من ارتباطه بمفصلي الحوض و الركبة. ينظف العظم خارج جسم الحيوان من بقايا العضلات و يوضع في أنبوبة اختبار و يحقن بـ (٥مل) من محلول (phosphate buffer saline (PBS وذلك لغسل العظم و أنزال كل النقي بحيث يصبح لونه ابيض .
- توضع الأنابيب الحاوية على نقي العظم في النبذ المركزي بسرعة ٢٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٠ دقائق . أزيل الرائق و أضيف إلى الراسب (٥مل) من محلول كلوريد البوتاسيوم واطئ التركيز و تركت الأنابيب لمدة ٣٠ دقيقة في الحمام المائي بدرجة ٣٧م و ثم ترج الأنابيب بين فترة و أخرى .
- أزيل الرائق و أضيف إلى الراسب المحلول المثبت Fixative solution على شكل قطرات تم أنزالها على الجدار الداخلي للأنبوبة مع الرج المستمر، ثم أكمل الحجم المثبت المضاف ليصل إلى (٥مل) ورجت المحتويات جيدا .
- وضعت الأنابيب بدرجة حرارة (٤مْ) لمدة نصف ساعة و ذلك لغرض تثبيت الخلايا .
- تم إسقاط قطرات من محتويات الأنبوبة على شريحة زجاجية نظيفة و بمعدل (٤-٥) قطرات و بصورة عمودية على الشريحة من مسافة (٣) أقدام تقريبا وذلك لإتاحة الفرصة للكروموسومات بالانتشار بشكل جيد ثم جففت الشرائح على صفيحة ساخنة بدرجة (٥٠) درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة .
- صبغة الشرائح بمحلول بصبغة كمزا : حضر واستعمل في تصبيغ الشرائح المعدة لدراسة الكروموسومات (Metcalf واخرون ١٩٨٦) و تركة لمدة (٢٠دقيقة) ثم تم غسلها بالماء المقطر(١١)

اختبار معامل الانقسام الخيطي: تم حساب (١٠٠٠) خلية منقسمة و غير منقسمة ومن ثم تم حساب النسبة المئوية للانقسام الحاصل في تلك الخلايا وفقآ للمعادلة التالية :

$$\text{معامل الانقسام الخيطي} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}} \times 100$$

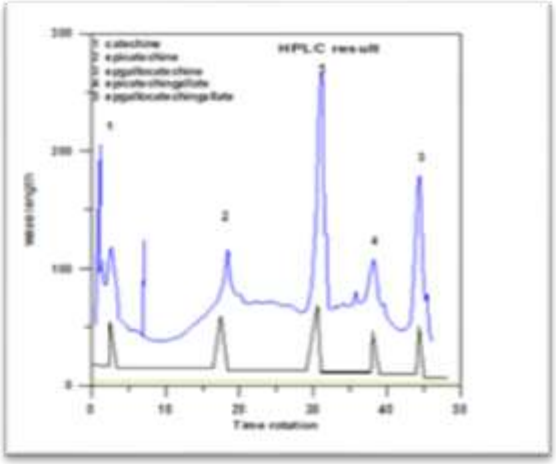
اختبار التغيرات الكروموسومية :

تم فحص الشرائح المحضرة باستخدام العدسة الزيتية حيث تم فحص ١٠٠ خلية منقسمة لكل حيوان واضحة في الطور الاستوائي من الانقسام الخيطي حيث تكون الكر وموسومات منتشرة بشكل جيد لغرض مشاهدة التشوهات الكروموسومية و حساب النسبة المئوية لها.التحليل الاحصائي : حللت النتائج ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS 1996) و اختبرت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار دانكن متعدد الحدود (Duncan1955) .(١٢)

النتائج

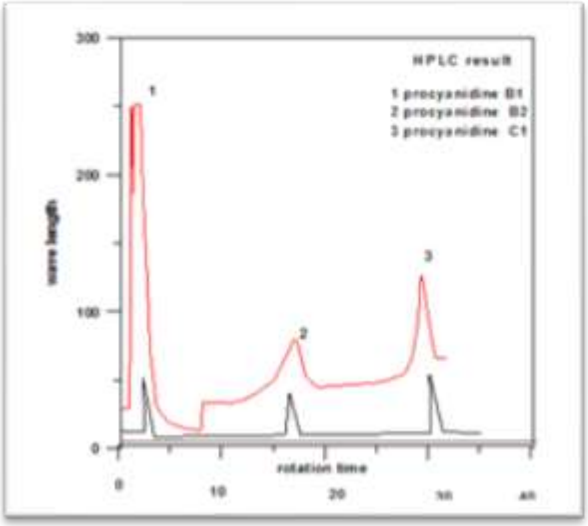
فحوصات HPLC :

يتضح من الشكل (1) عملية فصل مستخلص الشاي الاخضر إذ يلاحظ وجود المركبات Epicatechinecatechine, Epicatechingallate , Epgallocatechingallate and Epgallocatechine , وبزمن الاحتجاز (2.88,7.8,17.6,29.5,42.2) على التوالي. أن تحليل مستخلص الشاي الاخضر مشابة الى تحليل المستخدم من قبل Song وجماعته (١٣) لمستخلص الشاي الأخضر من حيث المركبات الموجودة فية وكذلك مطابقتها الى زمن الاحتجاز .



الشكل رقم (١) نتائج تحليل الكروموتوغرافي لمستخلص الشاي الاخضر

أما شكل (2) يوضح عملية فصل مستخلص بذور العنب بظهور المركبات التالية proanthocyanidine C1 and B1 proanthocyanidine , proanthocyanidins B2 على التوالي و بزمن الاحتجاز (1.28 و18.8 و 29.3) دقيقة. وهذه النتائج مطابقة الى النتائج العالم .John Shi وجماعته (14) لمستخلص بذور العنب من حيث المركبات الموجودة فيه وكذلك مطابق الى زمن الاحتجاز لكل مركب .



الشكل رقم (2) نتائج تحليل الكروموتوغرافي لمستخلص بذور العنب

النتائج

التأثيرات الوراثية لجرع متعددة من التوليفة الدوائية :

١-اختبار معامل الانقسام الخيطي :

يبين كل من الجدولين رقم (١) التجريع لمدة أسبوعين و رقم (٢) لمدة شهر واحد عدم وجود أي أنخفاض أو تغير على نسبة معامل الانقسام الخيطي باستخدام التراكيز المختلف(٥٠و١٠٠ و ٢٠٠ ملغم/ كغم) مقارنة مع عينة السيطرة الموجبة و بمستوى معنوي (P<0.01) و اما نسبة المعامل الانقسام الخيطي في جدول رقم (١) فكانت (٦.٦١ ، ٦.٦٠ ، ٦.٥٨ %) أما في جدول رقم (٢) فكانت (٦.٧٥و٦.٧٢و ٦.٧٢ %) مقارنة بالسيطرة الموجبة (٦.٥٥ %) .

٢ – اختبار التغيرات الكروموسومية :

يوضح جدول رقم (٣) نتائج حالة التجريع للتراكيز المختلفة لمدة أسبوعين و جدول رقم (٤) يوضح نتائج التجريع للتراكيز المختلفة لمدة شهر واحد، و التراكيز هي(٥٠و١٠٠ ٢٠٠ ملغم / كغم) أما في جدول رقم (٣) هي (١.٨٢، ١.٨٣، ١.٨٥) و جدول رقم (٤) هي (١.٨٢ و ١.٨١ و١.٨٣) لهذه التراكيز مقارنة بعينة السيطرة الموجبة و التي هي (١.٨١) من هنا يتم ملاحظة عدم وجود فروقات معنوية لنسبة التغيرات الكروموسومية واضحة المستوى و التي هي(P< 0.01) بالمقارنة مع عينة السيطرة الموجبة و كذلك شكل رقم (١) يوضح هيئة الكروموسومات الطبيعية للسيطرة الموجبة ، شكل رقم (٢) يوضح الكسر الكروموسومي وشكل رقم (٣) يوضح الكسر الكروماتيدي .

المناقشة

إن الاختبارات الوراثية التي تمت دراستها هي (معامل الانقسام الخيطي و التغيرات الكروموسومية). وقد أشارت نتائج التجارب في جدولي رقم(١و٢) بان النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لم تسجل آية فروقات معنوية (p<0.01) بالمقارنة مع السيطرة ألموجبه و يعزى عدم أنخفاض أو ارتفاع نسبة معامل الانقسام الخيطي و نسبة التغيرات الكروموسوميه بسبب احتواء التوليفة على العديد من الفيتامينات مثل (A,E,C) بالاضافه إلى مواد بولي فينوليه بسيطة (١٥) و (16) هذه المواد تعمل كمضادات للتطفير و هذه التوليفة ليس لها خاصية سميه وراثية و ذلك بعدم ظهور اى خلل للتراكيز التوليفة الدوائية المختلفة ، بالاضافه إلى ذلك فان اى خلل في الموازنة المواد التي تمتلك صفه السمية لجزئية إلـ DNA يؤدى إلى حصول تلف وراثي (enetic damage) في خلايا الحيوانات التي لم تعالج أما الحيوانات المعالجة بالتوليفة و بصوره عامه لم تظهر اي تغيرات في خاصيتها الايجابية عند التراكيز المختلفة في كل من نسبة معامل الانقسام الخيطي و نسبة التغيرات الكروموسومية باستعمال جميع المواد الموجودة في النباتات الطبية المختلفة وكل حسب نوعه(17) .

جدول رقم(١) تأثير تراكيز المختلفة للتوليفة الدوائية في الاختبارات معامل ألانقسام الخيطي للفأر الأبيض لمدة أسبوعين

التركيز ملغم / كغم	نسبة معامل الانقسام الخيطي
السيطرة	6.55
تركيز 50 ملغم / كغم	6.61
تركيز100ملغم / كغم	6.60
تركيز 200 ملغم /كغم	6.58

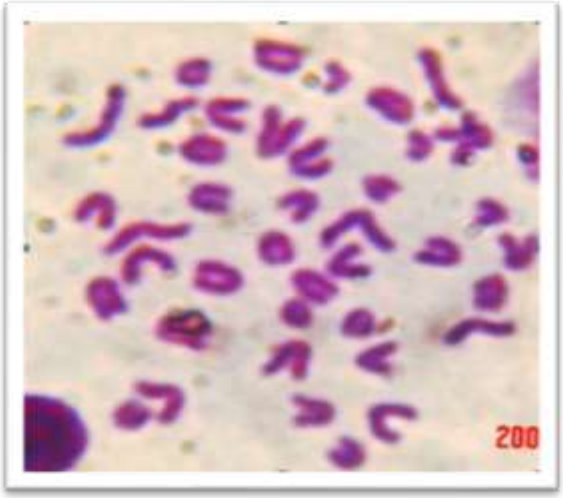
كل تجربة أربع حيوانات

جدول رقم (2) تأثير تراكيز المختلفة من التوليفة الدوائية في اختبار معامل ألانقسام الخيطي للفأر ألأبيض لمدة ٤ أسابيع

التراكيز ملغم / مليليتر	نسبة معامل الانقسام الخيطي
السيطرة	6.70
تركيز 50 ملغم / كغم	6.75
تركيز 100 ملغم /كغم	6.72
تركيز 200 ملغم / كغم	6.77

كل تجربة أربع حيوانات

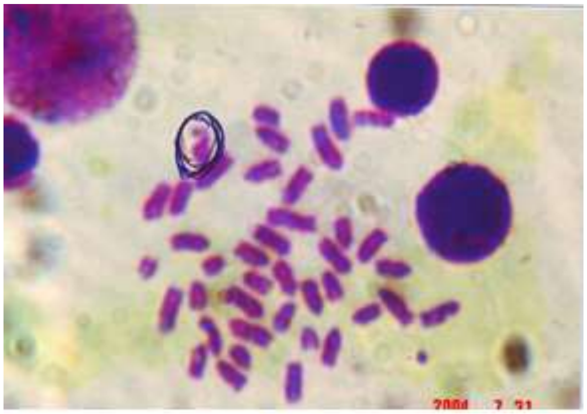
من ناحيه اخرى فان الفينولات النباتية تلعب دورا مهما في تقليل الأثر السمي الوراثي لعدد من المركبات المطفرة وجد بان إعطاء آل Catchines احد المركبات الفينوليه الموجودة في الشاي) بعد استخدامه يؤدى إلى التقليل من نسبة الطفرة الوراثية (6) فضلا عن ذلك فقد وجد بان المركبات البوليفينوليه polyphenolic compounds تثبيط من عملية تكسر احد خيطي الـ DNA و– DNA single strand cleavage .إن الفينولات ألنباتيه تظهر الخاصية المضادة للتطفير من خلال عملها على غلق مسار التنشيط الايضى للمطفرات وازالة الجذور الحره المتولده من تايض هذه المطفرات . بالاضافه إلى ذلك فان قسم من الفينولات تمنع من تكوين الـ (DNA adduct) من خلال ارتباطها بالمواقع الموجودة على جزئية ألـ DNA والتى تكون مستهدفه من قبل المطفر (7) . أثبتت الدراسات أن الفلافونيدات تمتلك فعالية مضادة للتطفير(18) أن الفلافونيدات ألمستخلصه لها دور في تنشيط المركبات الكيميائية و كما وجد بان للفلافونيدات قدره في تقليل الكسور في أشرطة الـ DNA (19) . أظهرت النتائج أن التوليفة تحتوي فينولات لها صفة مضادة للتطفير من خلال قدرتها على غلق التنشيط التأيضي للمطفرات و كسح الجذور الحرة المتولدة من تأيض المطفرات فضلا عن الصفة المضادة لتأكسد ، كما تعمل بعض الفينولات على تقليل من تكوين (DNA- Adduct) من خلال ارتباطها بمواقع ال DNA المستهدفة من قبل المطفر(٢٠) .وشكل رقم (١) يبين عدد الكروموسومات لخلايا نقي العظم المحضرة لفئران السيطرة الموجبة اذ يلاحظ من الشكل ان عدد كروموسومات الخلايا الجسدية (46) كروموسوما .



شكل رقم (١) يوضح الهيئة الكروموسومية لخلايا نقي العظم الطبيعية

أما بشان الشكلان رقم (٢) و (٣) يوضحان الزيغ الكروموسومي وعند التداخل بين التركيبة النباتية ، و التغيرات المحسوبة (على الكسور الكروموسومية و الكسور الكروموماتيدية) وقد تختلفت هذه التغيرات باختلاف النبات و نوعية المستخلص الكحولي لكل نبات في التوليفة الدوائية .

شكل رقم (٢) يبين الزيغ الكروموسومي لخلايا نقي العظم كسر كروموسومي



شكل رقم (٣) يبين الزيغ الكروموسومي لخلايا نقي العظم كسر الكروماتيدي

أن المستخلص الكحولي ليس له تأثير على الزيغ الكروموسومي وبالتالي لا يكون هناك تأثير على نسبة الكسور الكروموسومية و كذلك على نسبة الكسور الكروماتيديه كما جاء في جدول (رقم ٣) و جدول(رقم ٤).

جدول رقم (3) تأثير تراكيز مختلفة من التوليفة على التشوهات الكروموسومية لمده ٢ أسبوع

المعاملة التركيز ملغم/مليليتر	كسر كروماتيدي	كسر كروموسومي
السيطره الموجبه	0.4±0.001[a]	0.3±0.005[a]
مجموعة تركيز50ملغم /كغم	0.347±0.001[a]	0.3065±0.003[a]
مجموعة تركيز100ملغم /كغم	0.334±0.004[a]	0.3040±0.003[a]
مجموعة تركيز200ملغم /كغم	0.336±0.003[a]	0.3040±0.003[a]

كل تجربة أربع حيوانات

* لاتوجد فروقات معنوية $p \leq 0.001$

جدول رقم (4) تأثير تراكيز مختلفه من التوليفة على التشوهات الكروموسومية الوراثية لفأر ألابيض لمدة ٤ أسابيع

المعاملـة التركيـز ملغـم / مليليتر	كسركروماتيدي	كسر كروموسومى
السيطره الموجبه	0.4±0.00[a]	0.3±0.003[a]
مجموعة تركيز50ملغم /كغم	0.302±0.001[a]	3075±0.003[a]
مجموعة تركيز100ملغم /كغم	0.301±0.002[a]	0.31±0.001[a]
مجموعة تركيز200ملغم /كغم	0.305±0.003[a]	0.305±0.002[a]

كل تجربة أربع حيوانات

*لاتوجد فروقات معنوية $p \leq 0.001$

وتعتبر خلايا نقى العظم أكثر الخلايا الجسمية نشاطا حيث تتميز بانقساماتها السريعة ومتعددة لتعطى أنواع كثيرة ومختلفة من خلايا الدم وفى مراحل مختلفة ، وأن تأثير معامل الانقسام الخيطي بالمواد الكيميائية أو الفيزيائية يعتمد على الجرعة المعطاة وعلى طريقه التجريع حيث أن تلك المواد غالبا ما تؤثر على معامل الانقسام الخيطي .

الاستنتاجات

يتضح من نتائج الدراسة أن المستخلصات النباتية للتوليفة خاليه من التأثيرات السمية بالجرعة المستخدمة و هذا ما أستنبط من نتائج معامل الانقسام الخيطي و التغيرات الكروموسومية لخلايا نقى العظام .

المصادر References

1- Tyler ; Brady(1998) pharmacognosy, 9th Editors, Lea and Febiger, P: 4-5 .

2- Gentler, E. (1999) The role of antioxidants in the prevention of tumors. Brazils leek lusty; 96 : 199- 209.

3- World Health Organization. (1993) Reaearch Guide lines for Evaluation the safety and effieancy of Herbal Medicines.

4-Grabaly, S. and Thierick, R.; (2003). Drug discovery from nature, P. (5).

5- Aroea , R.B.; (1998). Hamadarol Pharmacopia of Estern Medicine, P. 422-448,

6- Kuroda, Y.; Hara, Y. , (2003). Antimutagenecity of tea polyphenols Mutat. Res. 436: 69-97.

7- Padam, S.K., Grover, I.S. and Singh, M. , , (1999) Indin, J.of experimaental biology, 34:98-102 .

8- Yumik,N.; Sumiko, T. and Yasuhide , T.(2003) Journal of Health Science, 49 (1) : 45-54.

9- Xue, H.; Aziz,R.; Sun, N.; Cassady, J.; Kamend ulis, L.;Yu,Y.; Stoner, G.and Klauoring, J. (2001). J .carcinogenesis: 22(2): 351-356.

10-Allev , J.C.Shuler; R. Mendes and S. Latt(1977).Asimplified technique for invivo analysis of sister chromatid exchange using 5-bromo-deoxy uridine. Cytogenet. Cell Genet.18: 237.

11- Metcalf. J.;J.Gallin ; W.Nuseef and R. Root. (1986) . Laboratory of Neutrophil Function. Revan Press : New York .

12- Duncan, D.(1995) ; Muitiple range and multiple F. test Biometrics. 11: 1-42.

13- Song, H.B.(2001) study on green tea extraction technology .J. of chines Institute of Food Sci and Tech. 1(1): 19-23.

14- John, Shi.; Jianmei,Yu . and at el. (2005) Food Agriculture and environment vol. 1(2) : 42-47.

15- Shubber, E.K.; Juma, A.S.M. , (2002) Cytogenetic effects of herabel medicinal plant , Vol. (19) P.(3), .

16-Kojima, H., Konishi, H. and Kuroda, Y., Mutat. ,(1999) Res., 266: 85-91.

17-Nell J , AlexandraB., and David pellman., (2012) DNAbreaks and chromosome pulverization from errors in mitosis.NATURE/ARTICLE , 482 : 53-58.

18- Samejima, K.; Kanazawa, K., Ashida, H. and Danno, G. ; J. , (1999) Agric, Food, chem.,43: 410-414.

19-P.M.patlland B.R.Yelikar (2013) cytological evaluation of oral mucasa in habitual pan Masala eaters – Acomparative study. J Med. Sci; 6(2) ; 120-127.

20-Ilham A. K, Zahra M., (2009) Effect of graden cress on chromosomal aberrations in white mice bone marrow cells.(ISSN815-316)vol.1 (2)