عزل وتشخيص بعض أنواع السموم المنتجة من قبل السيانوبكتريا نوع Anabaena Oryzae المعزولة محليا ودراسة تأثيراتها على فئران المختبر

أيمن عوني سليم[1] ، حميد سلمان خميس[2] ، إحسان محمود عبدالله[3]

[1] المديرية العامة للتربية في صلاح الدين تكريت ، العراق

[2] كلية التربية للبنات ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

[3] كلية الطب ، جامعة تكريت ، تكريت ، العراق

الملخص

تم الحصول على العزلة *Anabaena oryzae* من البيئة المحلية لمدينة تكريت وهي عبارة عن أحد أنواع السيانوبكتريا الخيطية الحاوية على الحوصلة، وتمت تنميتها في المختبر على الوسط الزرعي الانتقائي ASM-1 في حاضنة هزازة وتحت شدة اضاءة 2500 لوكس ودرجة حرارة 26°م.

تم استخلاص النواتج الحيوية منها حسب الطرق المتبعة علميا لاستخلاص النواتج الحيوية، وتم تشخيصها بواسطة التقنيات الحديثة: تقنية مطيافية الكتلةHPLC-MS، تقنية طيف الاشعة تحت الحمراء I.R و تقنية مطيافية الرنين النووي المغناطيسي NMR.

أثبتت التشخيص وجود السم الكبدي Microcystin بأشكاله المختلفة MCYST-LAba، MCYST-YM(O)، [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR و MCYST-YA، فضلا عن وجود السم العصبي Anatoxin-a في النواتج الحيوية للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae*.تمت تجربة هذه النواتج الحيوية على الفئران المختبرية بطريقتي التجريع والحقن وبتراكيز 1000 و 2000 و 3000 مايكروغرام/كغم من وزن الفأر، وقد أظهرت النتائج أن الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* كان سببا في إثارة الأورام السرطانية فضلا عن تسببه في تسمم خلايا الكبد لأنسجة أكباد الفئران وبينت النتائج ظهور أعراض التسمم العصبي الظاهرية في الساعات الأولى للاختبار،فيما ظهرت أعراض تسمم كبدي على هذه الحيوانات بعد تشريحها، وشملت تغير لون الكبد إلى قاتم وتضخمه وظهور تنخر فضلاً عن تفصصه في بعض الفئران وتورم فصوصه مع وجود نزف دموي فيه.

أما التأثيرات النسيجية التي ظهرت في المقاطع النسيجية لأكباد الحيوانات فكانت على شكل انتفاخ شديد في الخلايا مع تجمع سوائل في البروتوبلازم، وزيادة عدد الخلايا اللمفية مع وجود خلايا متعددة النوى من الكريات البيضاء،مع زيادة في أحجام النوى وتشوهها وانحلالها في بعض التراكيز العالية وتحطم النسيج الكبدي، مع وجود خلايا في طور الانقسام مما يدل على احتمال إصابة أكباد هذه الحيوانات بالسرطان، وهذه الأعراض تتأثر بالجرعة ونوع الناتج الحيوي.

المقدمة

تعرف السيانوبكتريا أو ما كانت تعرف سابقاً بالطحالب الخضراء – المزرقة بأنها تلك الكائنات البدائية النواة والقادرة على القيام بعملية التركيب الضوئي أو التغذية الذاتية، حيث تنتمي السيانوبكتريا إلى مملكة الأوليات Monera (بدائية النواة)، قسم Eubacteria، صنف Cyanobacteria.

تمتلك السيانوبكتريا صفات فريدة من نوعها من بين الأحياء المجهرية مما جعل الباحثين يولون دراستها أهمية خاصة ، ومن بين تلك الميزات قيام بعضها بعملية تثبيت النتروجين الجوي ومنها :-

Anabaena , ***Nostoc*** **[1]**، إضافة إلى قيام بعضها بتحرير الهيدروجين كناتج عرضي لعملية تثبيت النتروجين الجوي **[2]**،مثل أجناس ***oscillateria*** , ***Nostoc*** , ***Anabaena***.

إضافة إلى ماذكر فأن بعض أنواع السيانوبكتريا تفرز مواد سامة ، إن هذه السموم عباره عن قلويدات Alkaloids والتي هي عبار ة عن سموم عصبية ومنها Anatoxin-a الذي ينتج من قبل ***Anabaena*** ، ***flos-aquae*** ***Aphanizomenon flos-aquae*** . إضافة إلى بعض السموم الكبدية مثل microcystin بأشكال المتعددة التي تنتج من قبل ***Nostoc***, ***Nodularia*** ,***Anabaena*** و ***Oscillatoria*** **[3]**.

إن السيانوبكتريا وباقي الهائمات النباتية هي أجزاء هامة من الأنظمة البيئية المائية وتعيش عليها العديد من الهائمات الحيوانية zooplankton كالـrotifers والقشريات والابتدائيات وحيدة الخلية protozoans **[4]**،**[5]**،**[6]**.

تنتج السيانوبكتريا طيفاً واسعاً من المركبات السامة، إن كلاً منها هو مؤيض ثانوي بما يعني أنها لا تستعمل من قبل الكائنات الحية لأيضها الابتدائي، إنما تنتج لأغراض ثانوية. إن المؤيضات الثانوية تنتج من قبل العديد من النباتات والكائنات الحية الدقيقة، وتكون عادة محددة –جنساً نوعاً – سلالة، بخلاف المؤيضات الابتدائية والتي تكون شائعة لمعظم الكائنات الحية **[7]**. إن المؤيضات الثانوية ليست ضرورية للحياة ولكنها هامة للكائن الحي الذي ينتجها. إن الأمثلة على المؤيضات الثانوية تتضمن الهورمونات والمضادات الحيوية و allelochemicals والسموم.إن السموم هي مركبات لها تأثيرات مؤذية على الخلايا والأنسجة بالنسبة للكائنات الأخرى **[8]**.

هناك أنواع عديدة من السيانوبكتريا، شخصت أو فهمت ضمناً ، على أنها تمتلك خصائص سامة **[9]**.إن هناك العديد من أنواع السيانوبكتريا منتجة للسموم،ومع هذا فإن عدداً قليلاً منها قد عزل وشخص. إن الأنواع الأكثر شيوعا هي ***Anabaena***, ***Aphanizomenon***, ***Cylindrospermopsis***, ***Gloeotrichia***, ***Lyngbya***, ***Microcystis***, ***Nodularia***, ***Oscillatoria*** [9]،[10]، وذلك لأن هذه الأنواع يعزى اليها أكثر حوادث التسمم للحيوانات كما تسبب الأمراض للانسان **[10]**،**[11]**،**[12]**.

لقد صنفت السموم المنتجة من قبل السيانوبكتريا إلى فئتين رئيسيتين استناداً إلى نوع التأثير البايولوجي: الأولى مركبات سامة للخلايا سميت cytotoxins تنتج بواسطة السيانوبكتريا، ومعظمها قد تم استخلاصه من السيانوبكتريا البحرية المنشأ، ولم تظهر هذه السموم أنها تسبب حالة الوفاة للحيوان برغم أنها أظهرت طيفاً واسعاً من الفعاليات المضادة للكائنات الحية الدقيقة **[13]**. والفئة الرئيسية الثانية من هذه السموم كان لها تأثير سام للكائن الحي سميت biotoxins، إن الـbiotoxins هو المسؤول عن معظم حوادث تسمم الحيوانات، إنها تلك الفئة من السموم السيانوبكتيرية التي يتم الإشارة إليها باعتبارها من المخاطر الرئيسية على صحة الإنسان. إن الـbiotoxins السيانوبكتيرية التي عزلت وشخصت تقع أساساً في أربعة أصناف أساسية: السموم العصبية و السموم الكبدية،و السموم غير المتخصصة، والـlipopolysaccharides **[10]**.

هناك عدد من السموم الكبدية تنتج من قبل أصناف وسلالات ضمن الأنواع ***Anabaena***, ***Cylindrospermopsis***, ***Microcystis***, ***Nodularia***, ***Nostoc*** و ***Oscillatoria*** **[14]**. لقد عزلت السموم الكبدية المنتجة من قبل هذه الأنواع وحدد تركيبها الكيمياوي، إن السموم الكبدية هي الأكثر شيوعاً بين السموم السيانوبكتيرية، كما أنها صاحبة الشأن الأكثر شيوعاً في حالات التسمم الحادة. إنها أبطأ تأثيراً من السموم العصبية، حيث يمكن أن تحصل الوفاة خلال مدة ما بين 10 دقائق إلى بضعة أيام اعتماداً على عدد من العوامل تتضمن حجم الحيوان والأصناف و جرعة السم

تكون السموم الكبدية على عدة أنواع هي:

1 – Microcystins: إن الـmicrocystins عبارة عن سموم كبدية أحادية الحلقة سباعية الببتيد، وقد عزلت لأول مرة كمستخلص خام من الـ***Microcystis aeruginosa*** سلالة NRC-1 من قبل **[15]**، ومن ثم عزلت أيضاً من الـ ***Anabaena***, ***Nodularia***, ***Nostoc*** and ***Oscillatoria***. لقد أعطي لهذا السم الكبدي العديد من الأسماء منها cyanoginosin و cyanoviridin، مع ذلك فإن microcystin هو الإسم الأكثر شيوعاً حالياً **[14]**.

لقد تم اكتشاف أكثرمن 40 شكل سام من الـmicrocystins بالإضافة إلى أشكال غير سامة **[16]**. إن الوزن الجزيئي للـmicrocystins يتراوح بين 909 دالتون و 1044 دالتون اعتماداً على النوع **[3]**.

2 – Nodularin: إن السيانوبكتريا ***Nodularia spunzigena*** تنتج سماً كبدياً مشابهاً من الناحية التركيبية للـmicrocystins ، إنه أحادي الحلقة خماسي الببتيد أصغر من الـmicrocystins وبوزن جزيئي 824 دالتون ويحتوي على بعض الأحماض الأمينية والمركبات D-glutamic acid, D-B-methylaspartic acid, L-arginine, D-N-methyl-dehydrobutyrine,3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-6,4-dienoicacid (ADDA) **[17]**.

أما النوع الثاني من السموم المنتجة من السيانوبكتريا فهو السموم العصبية حيث تتوزع هذه السموم بين القلويدات alkaloids والببتيدات peptides والسكريات متعددة الدهون lipopolysaccharides، وتكون القلويدات هي الأكثر فجائية من حيث التأثير، والتي هي عبارة عن سموم عصبية تسبب الموت المفاجيء بواسطة شلل العضلات الهيكلية الخارجية، ومن ثم عضلات الجهاز التنفسي مؤدية إلى توقف التنفس في خلال بضع الدقائق إلى بضع الساعات التالية للتعرض. إن سموم الأعصاب تنتج من قبل أصناف وسلالات تعود للأنواع ***Anabaena*** **[18]**، ***Aphanizomenon*** **[19]**، ***Nostoc*** **[20]**، ***Oscillatoria*** **[21]**،**[22]**،**[23]** و ***Trichodesmium*** **[24]**.

وتصنف سموم الأعصاب المنتجة بواسطة السيانوبكتريا في الوقت الحاضر إلى عدة مجاميع من الناحية الكيميائية وهي:

1 – Anatoxin-a: وينتج من قبل ***Anabaena flos-aquae***، إن هذا السم الـtropane-related alkaloid هو secondary amine,2-acetyl-9-azabicyclo[4.2.1] non-2-ene **[25]**،**[26]**.

2 – Homoanatoxin: نجح **[27]** في تركيب ethylene متماثل للـanatoxin-a سمي بـhomoanatoxin فيما بعد، عزل **[22]** الـhomoanatoxin من سلالة تعود إلى ***Oscillatoria rubescens*** وأثبت أنه أقل سمية بعض الشيء من الـanatoxin-a

3 – Anatoxin-a(s): إن مسح عينات مختلفة من الـ***Anabaena*** لأجل فحص سميتها كشفت عن سم عصبي كان مميتاً أقوى 10 أضعاف من الـanatoxin-a ويظهر علامات تسمم عصبي مختلفة، العلامة الملاحظة بوضوح هي سيلان لعاب فئران المختبرلهذا السبب فإنه يدعى anatoxin-a(s) حيث يشير الحرف s إلى الحرف الأول من salivation وتعني (سيلان اللعاب) **[8]**،**[10]**.

4 – Neosaxitoxin & Saxitoxin: إن السمين العصبيين saxitoxin و neosaxitoxin واللذين يكاد يطابق أحدهما الاخر من الناحية البنائية ولكنهما غير مرتبطين بباقي السموم العصبية، وهما ينتجان من قبل النوع ***Aphanizomenon flos-aquae*** و ***Anabaena circinalis*** **[28]**.

المواد وطر ائق العمل

تحضير وسط تنمية السيانوبكتريا: استخدم الوسط الانتقائي ASM-1 لتنمية السيانوبكتريا **[29]**، ويتكون الوسط الانتقائي 1- ASM من المواد التالية وبالتراكيز المدونة إزاء كل منها مقاسة بوحدة (مايكرومول/لتر):-

NaCl	**200**	**$CuCl_2.2H_2O$**	**0.0008**	**Na2EDTA**	**20**
$MgCl_2$	**145**	**$MgSO_4.7H_2O$**	**150**	**MoO_3**	**0.1**
K_2HPO_4	**100**	**$CaCl_2$**	**190**	**$NaHCO_3$**	**300**
HBO_3	**6**	**Na_2HPO_4**	**100**	**$CoCl_2.6H_2O$**	**0.08**
$ZnCl_2$	**3**	**$FeCl_3.6H_2O$**	**9**	**D.W.**	**1L**

أذيبت مكونات الوسط في الماء المقطر مع التحريك المستمر لإتمام عملية الذوبان. تم قياس الأس الهيدروجيني pH للوسط باستخدام جهاز مقياس الدالة الحامضية Model SA520 من شركة Orion، وضبط الpH بين (7.6–7.8) بوساطة مسحوق بيكربونات الصوديوم أو حامض الهيدروكلوريك المخفف 0.1 عياري، ثم وزع الوسط السائل على الدوارق المستخدمة التي وضع على فوهة كل منها سدادة من القطن المغلف بالشاش الطبي، وعقم الوسط في جهاز المؤصدة (Autoclave) بدرجة حرارة 121 °م، وضغط 15 باوند/انج^2 لمدة 15 دقيقة وحفظ في درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال.

وللحصول على وسط صلب من وسط ASM-1 تم استخدام 1% من الأكار Agar أضيف إلى وسط ASM-1 السائل، وبعد التعقيم تم تبريده إلى 50 °مثم صب في أطباق بتري بلاستيكية معقمة، بواقع 20 سم^3 لكل طبق تحت ظروف معقمة، وحفظت في الثلاجة إلى اليوم التالي،حيث تمت زراعة السيانوبكتريا فيها.

جمع العينات

تناولت الدراسة جمع عينات من مناطق بيئية مختلفة، حيث شملت عينات من الماء والتربة والصخور ضمن منطقة تكريت

عزل وتنقية السيانوبكتريا

تمت زراعة العينات تحت ظروف التعقيم بنشر قطرات من الماء من العينات المائية ونشر دقائق الطين أو التربة أو الصخور في أطباق بتري التي تمت تهيئتها كما ورد في الفقرة السابقة، وبعدها حضنت في الحاضنة بدرجة حرارة 26±2 °موا ضاءة 2500 lux. بعد أربعة إلى ستة أسابيع، وبعد ملاحظة نمو المستعمرات الصغيرة جرى الفحص المجهري بواسطة Dissecting Microscope وهي بداخل طبق بتري حيث علمت المستعمرات بواسطة قلم ماجك، ثم نقلت المستعمرات النامية كل مستعمرة على حدة إلى طبق بتري منفصل يحتوي على الوسط الانتقائي ASM-1الصلب المحضر حديثاً ، ثم تركت لتنمو ثانية لفترة من أربعة إلى ستة أسابيع، وفي حالة ظهور أكثر من نوع في الطبق الواحد فيجري العزل بالطريقة السابقة نفسها. بعد ذلك نقلت المستعمرات إلى وسط ASM-1 السائل في دوارق زجاجية حجم 250 سم^3، يحتوي كل منها على 100 سم^3 من الوسط، وتركت لتنمو في الحاضنة الهزازة (Shaker Incubator) بدرجة حرارة 25 مْ وا ضاءة 2500 lux، وبعد فترة أسبوعين إلى ثلاثة تكون المستعمرات قد نمت بشكل جيد وبذلك يمكن تكثيرها إلى الكميات المطلوبة. وللحفاظ على النوع المعزول تم تجديد الوسط وزراعته كل أسبوعين لحين إجراء التجارب اللازمة.

تشخيص وتصوير السيانوبكتريا المعزولة خلال الدراسة

تم تشخيص السيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae*** بواسطة مجهر ضوئي ذي كاميرا فوتوغرافية بقوتي تكبير (400x) و(1000x)، علماً أن المجهر والكاميرا من نوع Olympus يابانيي الصنع، إضافة إلى الاستعانة بكاميرا رقمية Video camera VOPC80 من نوع Geprüft ألمانية الصنع ركبت على عدسة نفس المجهر وربطت بحاسوب محمول نوع Dell بولندي الصنع، وأظهرت الصور على شاشة الحاسبة وخزنت فيها لحين طباعتها وا ٍخراجها، وقد تم التشخيص اعتماداً على **[30]،[31]**.

تهيئة مزرعة السيانوبكتريا لإنتاج النواتج الحيوية

تمت زراعة السيانوبكتريا المختارة ***Anabaena oryzae*** في دوارق زجاجية حجم 5 لتر حاوية على 3.5 لتر من الوسط الزرعي المعقم وبنسبة 5 سم^3/100سم^3 **[32]**، ثم وضعت هذه الدوارق في حاضنة نمو نوع Cooled Incubator المصنعة من قبل شركة Gallen Kamp، وتزود بالهواء الجوي المرشح عن طريق محرك (ماطور) خارج الحاضنة، تركت بعدها المزارع لتنمو في ظروف ملائمة لإنتاج النواتج الحيوية مع إضاءة مستمرة بشدة 2500 لوكس ودرجة حرارة 26±2 °م **[33]**.

استخلاص النواتج الحيوية

بعد الحصول على نمو لمستعمرات السيانوبكتريا المختارة ***Anabaena oryzae*** جمعت خلاياها باستخدام جهاز الطرد المركزي من شركة Gallen Kamp وبسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق. (أخذ الراشح وتم حفظه في قناني معقمة ومحكمة في الثلاجة، لحين استخدامه في الاختبارات)، أما الراسب فقد تمت إذابته بالمذيب (الإيثانول) 1غم/10مل.

بعد إضافة الإيثانول إلى الراسب (مستعمرات السيانوبكتريا) بالنسبة المشار إليها في الفقرة السابقة، حطمت الخلايا باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية (ULTRASONIC) بتسليط 24,000 ذبذبة/ثانية لمدة 15 ثانية متناوبة مع فترات توقف لتبريد الجهاز وللحفاظ على درجة حرارة 4 °م، كررت العملية عدة مرات لتحطيم

الخلايا تحطيماً تاماً ، بعدها وضع المحلول في أنابيب الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق **[34]**.

أخذ الراشح وتم تبخير الإيثانول بدرجة حرارة أقل من 40 °م **[35]**.

أعيدت إذابة المستخلص بالماء المقطر وتم ترسيب البروتينات (النواتج الحيوية) باستعمال تركيز 70% من كبريتات الأمونيوم **[36]**.

تفصل الراسب عن الراشح باستخدام جهاز الطرد المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة 4 °م، أخذ الراسب الحاوي على البروتينات وتمت إزالة ملح كبريتات الأمونيوم منها بعملية الديلزة Dialysis (الفرز الغشائي) باستخدام كيس الديلزة **[37]**.

تم تجفيف البروتين (النواتج الحيوية) باستخدام جهاز التجفيف (Discater) خالي من الهواء وتحت ضغط مخلخل. وحفظ البروتين الحاوي على النواتج الحيوية في الثلاجة لحين الاستعمال.

طرق تشخيص النواتج الحيوية المستخلصة من السيانوبكتريا خلال البحث

التشخيص باستخدام تقنية مطيافية الكتلة (HPLC-MS)High-Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

التشخيص باستخدام تقنية طيف الاشعة تحت الحمراء Infrared Spectrophotometry (I.R)

التشخيص باستخدام تقنية مطيافية الرنين النووي المغناطيسي Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy

تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المختارة بهذه التقنية في مختبرات هيئة الطاقة الذرية السورية.

اختبارات تأثير التراكيز المختلفة للنواتج الحيوية للسيانوبكتريا وفعاليتها على حيوانات التجارب (الفئران البيضاء)

الحيوانات المستخدمة في الاختبار

استخدمت في هذا الاختبار ذكور الجرذان البيض Albino male rats (***Rattus norvegicus***) من سلالة (Sprague Dawley) والتي تم الحصول عليها من الشركة العامة لصناعة الأدوية في سامراء (SDI)، ومن ثم تمت تربيتها وتكثيرها في البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة/ كلية التربية للبنات/ جامعة تكريت.

وضعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية ذات أبعاد (30×25×15) سم مغطاة بأغطية معدنية، ذات أرضية مفروشة بنشارة الخشب، وروعي جانب النظافة للأقفاص من حيث تبديل نشارة الخشب مرتين خلال الأسبوع وتعقيم الأقفاص بالمطهرات؛ وقد تراوحت أوزان الحيوانات المستخدمة بين (29–35) غم، وتراوحت أعمارها ما بين (42–45) يوم.

أخضعت جميع الحيوانات لظروف مختبرية متماثلة من ضوء طبيعي (12 ساعة ضوء و 12 ساعة ظلام) ودرجة حرارة 22±3 °م؛ وغذيت الحيوانات على العليقة التي تم الحصول على موادها من الأسواق المحلية، وتم جرشها وكبسها في معمل إنتاج العلف الحيواني، ، كما استخدم ماء الشرب الاعتيادي بوساطة عبوات بلاستيكية ذات فتحات حديدية لتأمين الماء للحيوانات. وقد أعطيت الماء والغذاء على نحو مستمر طوال فترة التربية والاختبار **[38]**.

تقسيم حيوانات الاختبار ومعاملتها بالنواتج الحيوية للسيانوبكتريا

استخدم في هذا الاختبار (24) حيوان من ذكور الجرذان البيضاء، قسمت عشوائياً إلى مجموعتين رئيسيتين:

المجموعة الرئيسية الأولى (**مجموعة التجريع**): قسمت إلى (4) مجاميع صغيرة، كل مجموعة تحوي (3) ذكور جرذان بيضاء، وعلى النحو التالي:

المجموعة الأولى (**مجموعة السيطرة**): جرعت بالماء المقطر المعقم فقط.

المجموعة الثانية: جرعت بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** بتركيز 1000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم.

المجموعة الثالثة: جرعت بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** بتركيز 2000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم.

المجموعة الرابعة: جرعت بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** بتركيز 3000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم.

المجموعة الرئيسية الثانية (**مجموعة الحقن**): قسمت إلى (4) مجاميع صغيرة، كل مجموعة تحوي (3) ذكور جرذان بيضاء، وعلى النحو التالي:

المجموعة الأولى (**مجموعة السيطرة**): حقنت تحت الجلد بالماء المقطر المعقم فقط.

المجموعة الثانية: حقنت تحت الجلد بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** بتركيز 1000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم.

المجموعة الثالثة: حقنت تحت الجلد بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** بتركيز 2000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم.

المجموعة الرابعة: حقنت تحت الجلد بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** بتركيز 3000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم.

مراقبة النشاط اليومي للحيوانات المختبرة

تمت مراقبة وتسجيل العلامات الظاهرية على الحيوانات المختبرة ابتداءاً من ساعة التجريع أو الحقن ولمدة 10 أيام، وقد شملت هذه المراقبة النشاط الحركي والشهية للطعام والماء.

التخدير والقتل والتشريح

بعد مرور 10 أيام من ابتداء التجربة تم إجراء عمليات التخدير والقتل والتشريح للحيوانات المختبرة للكشف عن تأثير النواتج الحيوية على أكبادها، حيث أن الأعراض السمية للسموم الكبدية تتطور على عدة

أيام في الفئران، كما أن اختبار الـLD_{50} المؤثر كان يتطلب أكثر من سبعة أيام **[39]**.

وحفظت الأكباد في محلول دارئ الفورمالين المتعادل 10% حيث تم حفظ الأجزاء في هذا المحلول لحين عمل المقاطع النسيجية **[40]**.

تحضير الشرائح النسيجية

تم تحضير الشرائح النسيجية حسب الطرق المعتمدة في **[41]**،**[42]**،**[43]**.

فحصوتصوير الشرائح النسيجية

تم فحصوتصوير الشرائح النسيجية باستخدام المجهر الضوئي المركب نوع Olympus ياباني الصنع، وآلة تصوير رقمية نوع Sony يابانية الصنع أيضا.

التحليل الإحصائي

حللت النتائج إحصائياً باستخدام اختبار F واختبار T واستخدام برنامج Minitab في التحليل، كما قورنت المتوسطات الحسابية للمعاملات وفق اختبار دانكن متعدد الحدود Duncun's Multiple Range test بمستوى معنوية (0.05) **[44]**.

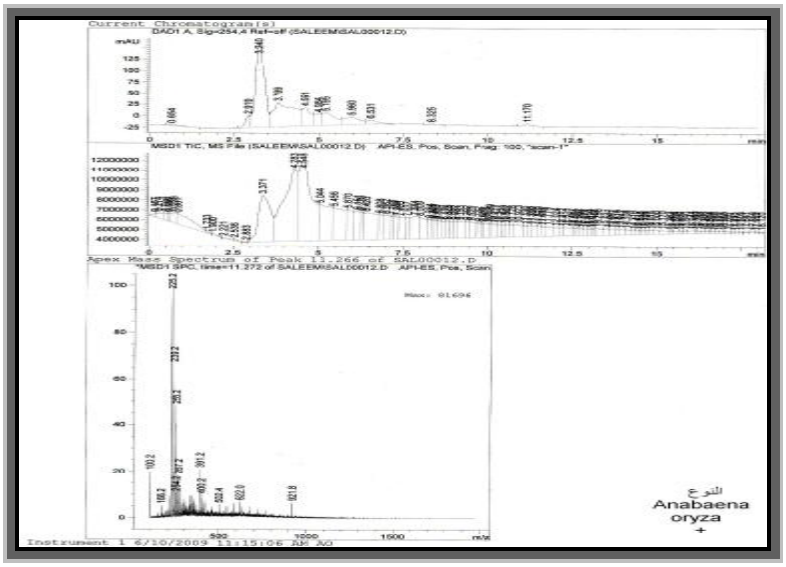
النتائج والمناقشة

دراسة تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae*

التشخيص باستخدام جهاز (HPLC-MS) High-Pressure Liquid Chromatography-Mass Spectrometry

تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المختارة بواسطة جهاز High-pressure liquid chromatography-mass spectrometry وكانت النتائج كما موضحة في الشكل رقم (1) الذي يتبين من خلاله أن أحد نواتج تفكك الناتج الحيوي المستخلص من السيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae*** بتقنية HPLC بالمسح الموجب في زمن الاحتجاز 11.266 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS قد أظهر وجود المركب ADDA (3-amino-9-methoxy-2,6,8-trimethyl-10-phenyldeca-4,6-dienoic acid) وهذا المركب وزنه الجزيئي 391 كما هو ظاهر في الطيف الكتلي في الشكل المذكور؛ وهو أحد الأجزاء الرئيسية لكافة أنواع الـMicrocystins **[45]**، والتي تعد من السموم الكبدية المهمة التي تنتجها السيانوبكتريا، والذي تؤكد البحوث والدراسات وجود أكثر من 40 شكل سام منها **[16]**.

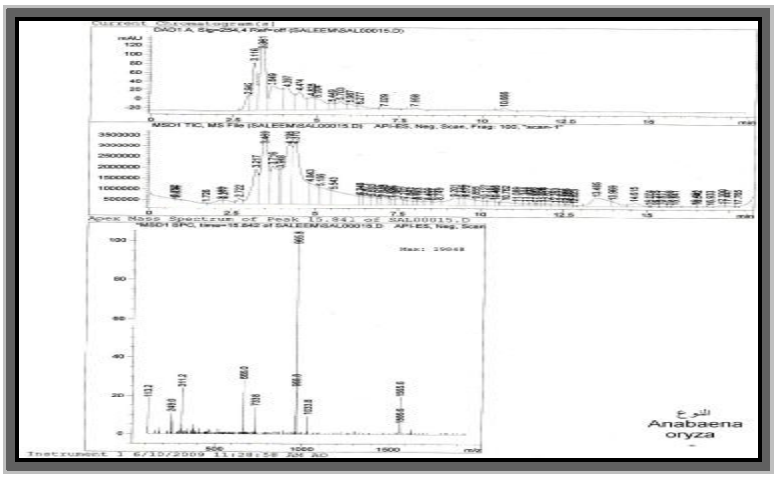
كما يظهر من قراءات الطيف الكتلي وجود الـMCYST-LAba والذي هو أحد أنواع السموم الكبدية ووزنه الجزيئي 923 **[46]**، وذلك عند الوزن الجزيئي 921.8 في قراءات الطيف. ويظهر أيضا من قراءات الطيف الكتلي وجود السم العصبي نوع Anatoxin-a ذو الوزن الجزيئي 165 **[45]**، وذلك عند الوزن الجزيئي 166.2 في قراءات الطيف.



الشكل (1) نتائج التحليل بجهاز HPLC وطيف الكتلة MS للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* ا لقمة 11.266 (مسح موجب)

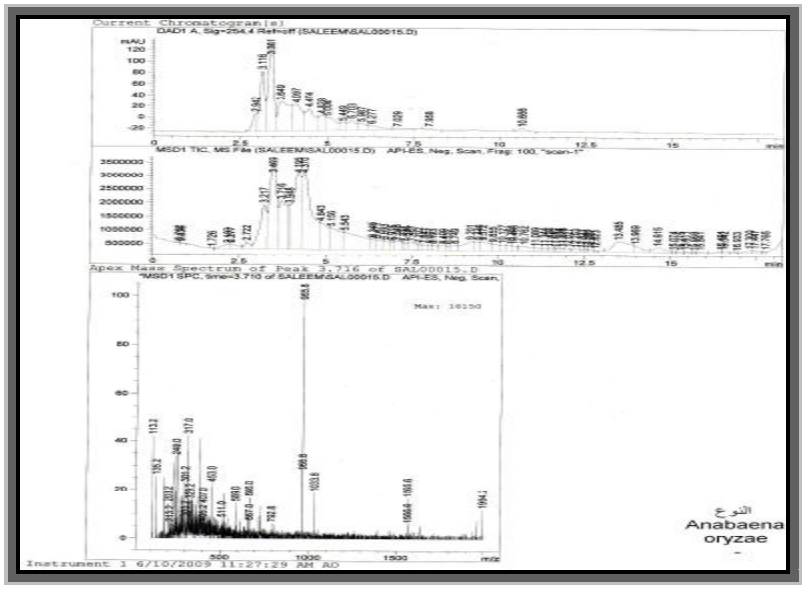
يتبين من خلال الشكل رقم (2) أن أحد نواتج تفكك الناتج الحيوي المستخلص من السيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae*** بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 15.841 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS قد أظهر وجود المركب MCYST-YM(O) ذي الوزن الجزيئي 1035 وهو أحد أنواع السموم الكبدية من نوع Microcystin **[47]**، وذلك عند الوزن الجزيئي 1033.8 في قراءات

الطيف، كما أظهرت قراءات الطيف وعند الوزن الجزيئي 965.8 وجود السم الكبدي [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR ذي الوزن الجزيئي 966 وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا نوع ***Anabaena* Sp.** **[16]**.



الشكل (2) نتائج التحليل بجهاز HPLC وطيف الكتلة MS للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* القمة 15.841 (مسح سالب)

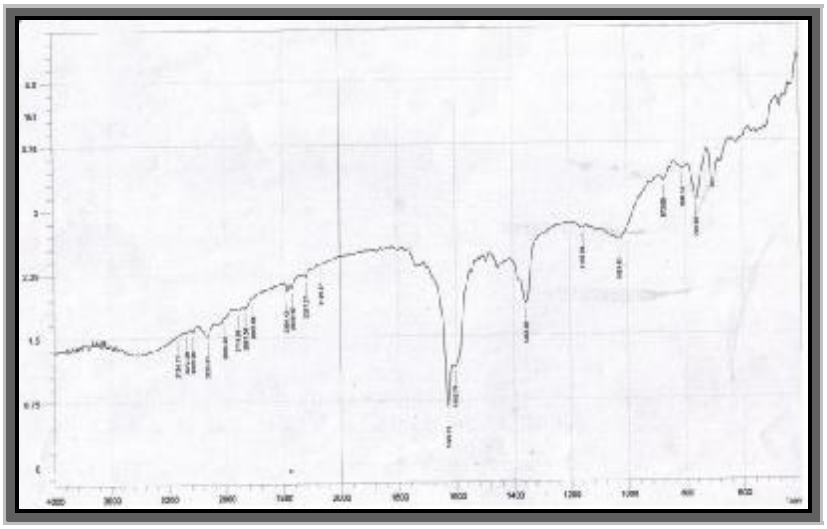
فضلاً عن ذلك يتبين من خلال الشكل رقم (3) أن أحد نواتج تفكك الناتج الحيوي المستخلص من السيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae*** بتقنية HPLC بالمسح السالب في زمن الاحتجاز 3.716 دقيقة والذي تم تحليله بتقنية MS قد أظهر وجود المركب MCYST-YA ذي الوزن الجزيئي 959 وهو أحد أنواع السموم الكبدية من نوع Microcystin **[47]**، والذي تم استنتاج وجوده من ناتج الفرق بين المركب ذو الوزن الجزيئي 1994.2 والمركب ذي الوزن الجزيئي 1033.8 الظاهرين في قراءات الطيف، كما أظهرت قراءات الطيف وجود المركب MCYST-YM(O) ذي الوزن الجزيئي 1035 وهو أحد أنواع السموم الكبدية من نوع Microcystin **[47]**، وذلك عند الوزن الجزيئي 1033.8 في قراءات الطيف، إضافة لذلك فقد أظهرت قراءات الطيف وعند الوزن الجزيئي 965.8 وجود السم الكبدي [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR ذي الوزن الجزيئي 966 وهو أحد أنواع الـMicrocystins التي تنتجها السيانوبكتريا نوع ***Anabaena* Sp.** **[16]**.



الشكل رقم (3) نتائج التحليل بجهاز HPLC وطيف الكتلة MS للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* القمة 3.716 (مسح سالب)

التشخيص باستخدام جهاز Infrared Spectrophotometry (I.R)

تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المختارة بواسطة جهاز Infrared Spectrophotometry وكانت النتائج كما موضحة في الشكل التالي:

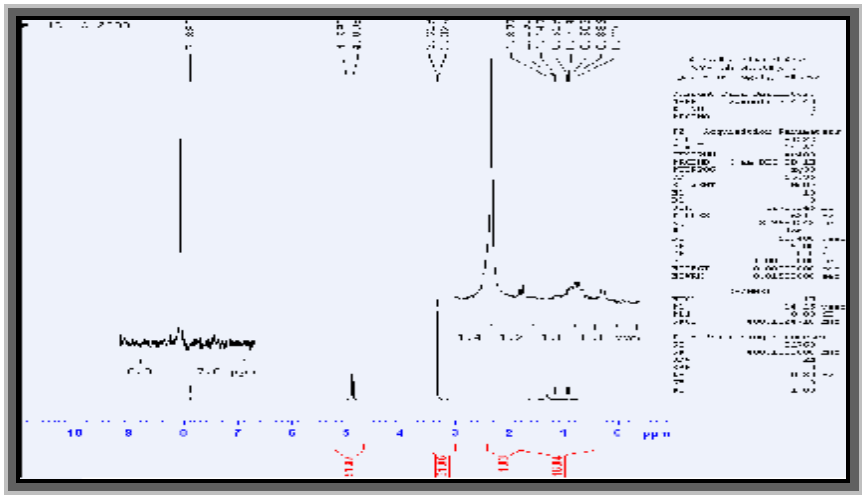


الشكل (4) طيف الأشعة تحت الحمراء IR للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae*

نلاحظ ومن خلال دراسة طيف الأشعة تحت الحمراء IR للنواتج الحيوية للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** في الشكل رقم (4) ظهور مجموعات المط العائدة للمجاميع الفعالة الحلقة الأروماتية، C=O، NH، C=O للكحولات والفينولات، C=C في الحلقة الأروماتية، N=H ، OH للحوامض الكربوكسيلية، S-H،NH2 ، وجميع هذه المجاميع تعود لتركيبي السمين العصبي Anatoxin-a والكبدي Microcystins اللذين وجدا في النواتج الحيوية لأنواع السيانوبكتريا الثلاثة المذكورة آنفاً.

التشخيص باستخدام جهاز (NMR) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy

وللتأكيد على النتائج الواردة أعلاه تم تشخيص النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المختارة بواسطة جهاز Nuclear magnetic resonance spectroscopy وكانت النتائج كما موضحة في الشكل المرقم (5).



الشكل (5) طيف الرنين النووي المغناطيسي NMR للناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae*

نلاحظ ومن خلال دراسة طيف الرنين النووي المغناطيسي (^1H NMR) للنواتج الحيوية للسيانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** في الشكل رقم (5) ظهور الحزم المنفردة في المواقع الظاهرة في الشكل (5) والتي تعزى إلى بروتونات المجاميع CH_3-C، CH_3-NH_2، CH_3-C، CH_3-S، SH-CH_3، CH_3-$N^+(R)_3$، CH_3-O-، CH_3-O-CO، CH-O، R-CH_2-O-CO، R-CH=C، الحلقة الأروماتية. إن بروتونات المجاميع الظاهرة آنفاً والموجودة في هذه المواقع تعود لتركيبي السمين العصبي Anatoxin-a والكبدي Microcystins الموجودين في النواتج الحيوية للسيانوبكتريا المختارة وتدعم نتائج التشخيص بتقنيتي طيف الكتلة و طيف الأشعة تحت الحمراء.

لقد أثبتت نتائج التشخيص للنواتج الحيوية للسيانوبكتريا المختارة ***Anabaena oryzae*** بتقنيات طيف الكتلة وطيف الأشعة تحت الحمراء والرنين النووي المغناطيسي مايلي:

أولا: وجود السم الكبدي Microcystin بعدة أشكال من أشكاله السامة وهي كالآتي:

1- MCYST-LAba (**Microcystin-L-Aminoisobutyric acid**) وهو أحد أشكال الـMicrocystins السامة، وجد في الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae***.

وتشير المصادر إلى وجوده في السيانوبكتريا نوع ***Anabaena sp***. **[48]**، ونوع ***Microcystis aeruginosa*** **[46]**.

2- MCYST-YM(O) (**Microcystines-Methionine-S-oxide tetra hydro tyrosine**) وهو أحد أشكال الـMicrocystins السامة، وجد في النواتج الحيوية للسانوبكتريا ***Anabaena oryzae*** ، وتشير المصادر الى وجوده في السيانوبكتريا نوع ***Nostoc* sp.** **[49]**، ونوع ***Anabaena* sp.** **[50]،[51]**، ونوع ***Microcystis aeruginosa*** **[52]**.

3- MCYST-LR [D-Asp^3,Dha^7] (**Microcystins-LR D-Aspartic$_3$,Dehydroalanine$_7$**) وهو أحد أشكال الـMicrocystins السامة، وجد في النواتج الحيوية للياونوبكتريا ***Anabaena oryzae*** ، وتشير المصادر إلى وجوده في السيانوبكتريا نوع ***Microcystis aeruginosa*** ونوع ***Anabaena* sp.** **[16]**، ونوع ***Nostoc* sp.** **[50]،[51]**.

4- MCYST-YA (**Microcystins-O-Acetyl-o-tetrahydrotyrosine**)، وهو أحد أشكال الـMicrocystins السامة، وجد في الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae***. وتشير المصادر إلى وجوده في السيانوبكتريا نوع ***Anabaena* sp.** **[48]**، ونوع ***Microcystis aeruginosa*** **[47]**.

ثانيا: وجود السم العصبي Anatoxin-a حيث وجد في الناتج العصبي للسيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae***، وقد أشارت المصادر الى وجوده في السيانوبكتريا نوع ***Anabaena* sp.** ونوع ***Oscillatoria* sp.** **[53]**.

اختبارات تأثير التراكيز المختلفة للنواتج الحيوية وفعاليتها على حيوانات التجارب (الفئران البيضاء) بطريقتي التجريع والحقن

كانت نتائج اختبارات تأثير التراكيز المختلفة للنواتج الحيوية وفعاليتها على حيوانات التجارب (الفئران البيضاء) بطريقتي التجريع والحقن كالآتي:

العلامات الظاهرة على الحيوانات بعد التجريع أو الحقن والى نهاية الاختبار (وهي علامات متشابهة):

بعد ساعتين من التجريع أو الحقن ظهرت علامات تناقص الحركة وتنفس بطني سريع، وهذا ربما يكون عائداً إلى وجود السم العصبي anatoxin-a والذي يسبب مثل هذه الأعراض حيث أشار **[54]،[10]** إلى إن العلامات السريرية للتسمم العصبي بالـanatoxin-a في الثدييات تتضمن أعراض متتابعة تشمل تحزم العضلات، وتناقص الحركة و الانهيار الجسدي، وتنفس بطني مبالغ فيه و ازرقاق البشرة، و التشنجات، ومن ثم الموت.

غير أن حالة الحيوانات استقرت في اليوم التالي وعادت إلى طبيعتها، وهذا سببه الجرعة القليلة من الـanatoxin-a حيث أن الجرع التي أعطيت للحيوانات كانت بين 1000–3000 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم والتي أعطيت كناتج حيوي (بروتين خام)، في حين تبلغ الـLD_{50} عند إعطاءها كخلايا سيانوبكتيرية جافة عن طريق الفم عدة مئات من الملغرامات من وزن الجسم، بينما يبلغ الـLD_{50} للـanatoxin-a النقي حسب ما أثبته **[8]** بالنسبة للفئران 200 مايكروغرام/كغم من وزن الجسم عند إعطاءه حقناً بالوريد، كما إن الـanatoxin-a يكون عالي الفعالية ويسبب إزالة الاستقطاب العضلي العصبي **[55]**. كما أن السموم الكبدية تنتج عنها مثل هذه الأعراض، حيث أشار **[56]** إلى إن التسمم الكبدي ينتج مدى من الأعراض التي تختلف مع أصناف الحيوانات المختلفة، ومن هذه الأعراض الاستلقاء، والضعف، وقلة الاستجابة والإحجام عن الحركة تجاه المثيرات، وفقدان الشهية للطعام و عسر التنفس و الارتجاف ولم تلاحظ أعراض ظاهرية أخرى على الحيوانات إلى نهاية الاختبار.

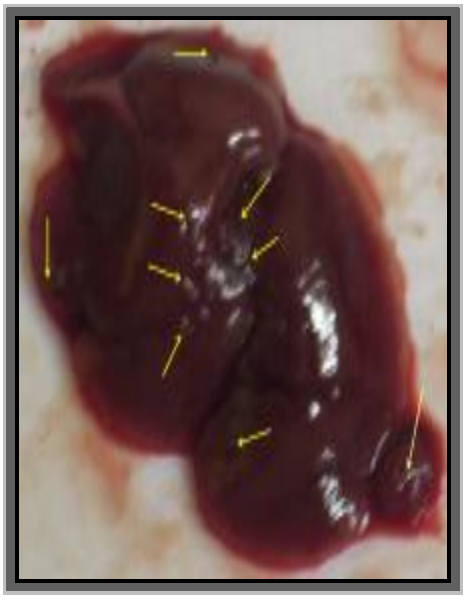
العلامات الظاهرة على أكباد الفئران المجرعة والمحقونة بعد قتلها وتشريحها مباشرة:

كانت العلامات الظاهرة على أكباد الفئران المجرعة والمحقونة بعد قتلها وتشريحها قد شملت التنخر وظهور نقط سوداء على سطح الكبد وتغير وتضخم أحجام الأكباد وتغير ألوانها واحتقانها مع تغير ألوان حافات فصوص الكبد أحياناً ، وظهور فقاعات على الأكباد مع نزف دموي فيها.

صورة رقم (1) كبد فأر أبيض بدون معاملة (Control)

صورة رقم (2) كبد فأر أبيض معامل بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 2000 مايكروغرام/كغم من وزن الفأر (بطريقة التجريع)

صورة رقم (3) كبد فأر أبيض معامل بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع*Anabaena oryzae* بتركيز 2000 مايكروغرام/كغم من وزن الفأر (بطريقة الحقن)

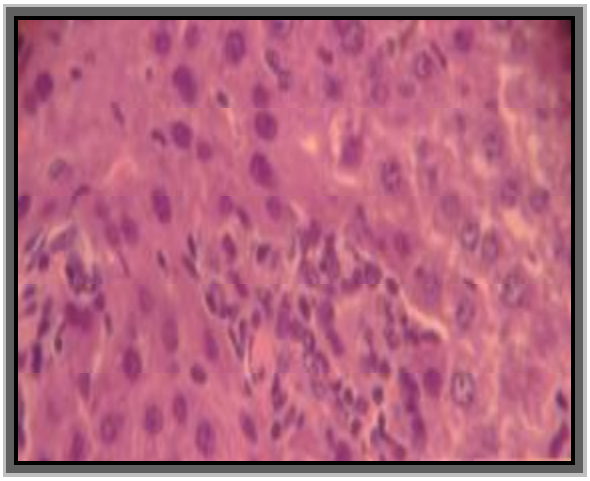


صورة رقم (4) كبد فأر أبيض معامل بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 3000 مايكروغرام/كغم من وزن الفأر(بطريقة التجريع)

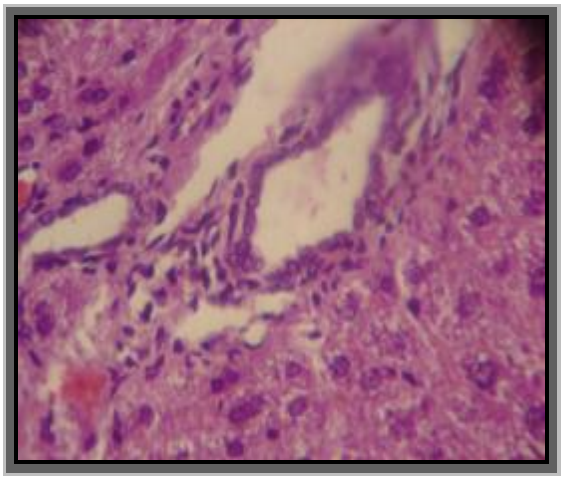
صورة رقم (5) كبد فأر أبيض معامل بالناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 3000 مايكروغرام/كغم من وزن الفأر (بطريقة الحقن)

العلامات الظاهرة على الشرائح النسيجية المأخوذة من أكباد الفئران المجرعة والمحقونة:

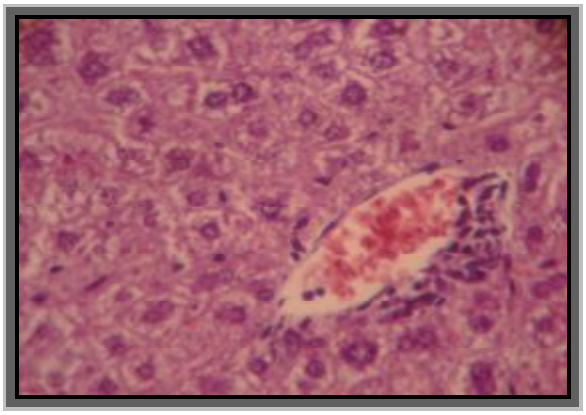
كانت العلامات الظاهرة على الشرائح النسيجية المأخوذة من أكباد الفئران المجرعة والمحقونة قد أظهرت انتفاخاً شديداً في الخلايا مع تجمع سوائل في البروتوبلازم، وزيادة عدد الخلايا اللمفية، مع زيادة في أحجام النوى وتشوهها وانحلالها في بعض التراكيز العالية، فضلاً عن اضطرابات في النسيج الكبدي، مع وجود خلايا في طور الانقسام مما يدل على احتمال إصابتها بالسرطان.



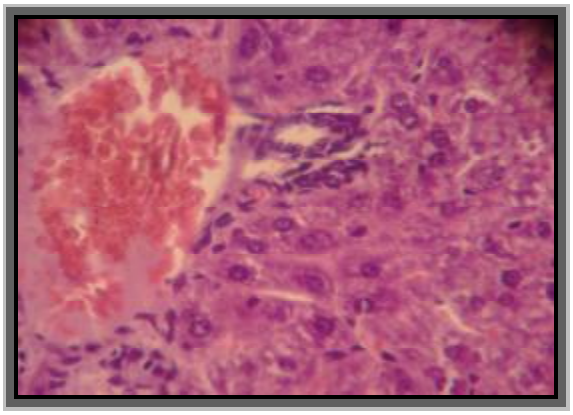
صورة رقم (6) مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض بدون معاملة (Control) (قوة التكبير 1300X)



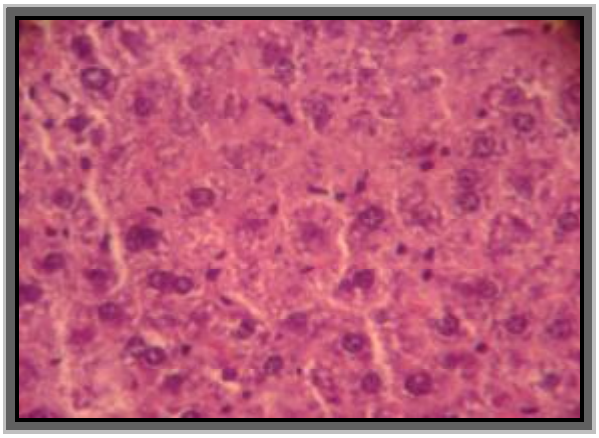
صورة رقم (7) تأثير الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 1000 µg/kg على مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض (طريقة التجريع) (قوة التكبير 1300X)



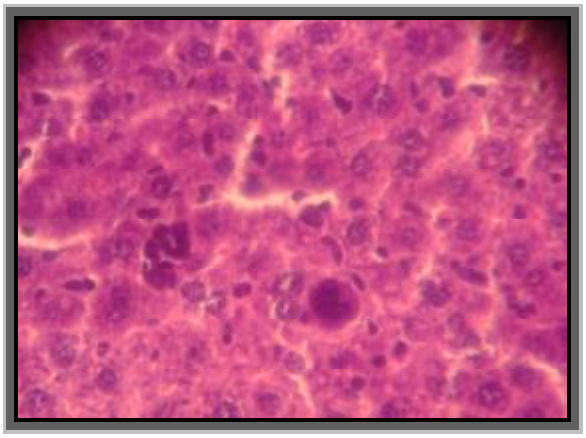
صورة رقم (8) تأثير الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 1000 µg/kg على مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض (طريقة الحقن) (قوة التكبير 1300X)



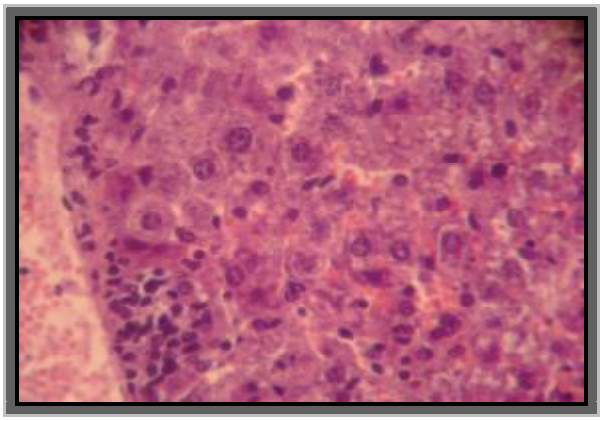
صورة رقم (9) تأثير الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 2000 µg/kg على مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض (طريقة التجريع) (قوة التكبير 1300X)



صورة رقم (10) تأثير الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 2000 µg/kg على مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض (طريقة الحقن) (قوة التكبير 1300X)



صورة رقم (11) تأثير الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع*Anabaena oryzae* بتركيز 3000 µg/kg على مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض (طريقة التجريع) (قوة التكبير 1300X)



صورة رقم (12) تأثير الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع *Anabaena oryzae* بتركيز 3000 kg/µg على مقطع نسيجي من كبد فأر أبيض (طريقة الحقن) (قوة التكبير 1300X)

أشار **[7]** إلى أن السيانوبكتيريا تنتج طيفاً واسعاً من المركبات السامة، إن كلاً منها هو مؤيض ثانوي بما يعني أنها لا تستعمل من قبل الكائنات الحية لأيضها الابتدائي، إنما تنتج لأغراض ثانوية. إن المؤيضات الثانوية تنتج من قبل العديد من النباتات والكائنات الحية الدقيقة، وتكون عادة محددة – جنساً نوعاً ً – سلالة، بخلاف المؤيضات الابتدائية والتي تكون شائعة لمعظم الكائنات الحية ، فيما أكد **[8]** على أن هذه المركبات ليست ضرورية للحياة ولكنها هامة للكائن الحي الذي ينتجها، ومن الأمثلة عليها الهورمونات والمضادات الحيوية والمركبات الأليلية allelochemicals والسموم، وأن السموم هي مركبات لها تأثيرات مؤذية على الخلايا والأنسجة أو الكائنات الحية، برغم أن هذا ليس محدداً دائماً .

لقد أثبتت نتائج التشخيص للنواتج الحيوية لأنواع السيانوبكتريا المختارة ***Anabaena oryzae*** و ***Nostoc linckia*** و ***Anabaena laxa*** الواردة آنفاً وجود السم الكبدي Microcystin بعدة أشكال من أشكاله السامة.

ومن خلال الصور للفئران المجرعة والمحقونة بالنواتج الحيوية لهذه الأنواع من السيانوبكتريا يتبين ومن خلال العلامات الظاهرة على أكباد هذه الفئران، وكذلك من خلال الشرائح النسيجية المأخوذة من هذه الأكباد التسمم الكبدي الحاصل فيها، واحتمال إصابتها بالأورام السرطانية الظاهرة علاماتها من خلال صور الانقسام في الخلايا الذي تظهره صور الشرائح النسيجية.

يؤكد **[57]** أن العلامة الأكثر وضوحاً في الحيوانات الميتة بنتيجة التعرض للسموم الكبدية السيانوبكتيرية التضخم العام للكبد مصحوباً بنزف داخلي في الكبد. فيما أثبت **[58]** أن الزيادات في وزن الكبد من مرتين إلى ثلاث مرات هي أمر شائع. كما أن الكبد يكون عادة بلون داكن ولكنه يمكن أن يكون شاحباً أيضاً .

كما لوحظ على الأكباد وجود النخر الكبدي، وهذا أيضاً من علامات التسمم بالسموم الكبدية التي تنتجها السيانوبكتريا، حيث أثبت **[59]** بأن النخر الكبدي يبدأ في المنطقة المركزية شبه الكروية ويتكامل حول الوريد البابي الكبدي، محافظاً عادة على صفين أو ثلاثة فقط من الـhepatocytes حول الوريد المذكور. وقد أثبتت الدراسات على جرذان وفئران معاملة بالـmicrocystin-LR أن الـhepatocytes ظهرت في الأوردة المركزية للفصوص الكبدية، ثم عبرت فيما بعد إلى الجهاز العضلي الوعائي الرئوي،وأخيراً إلى أعضاء مثل الكلية **[60]،[59]**.

إن تلف الكبد بالتسمم الكبدي يظهر نفسه كتغير في كيمياء الدم. إن واحدة من أولى العلامات التي تم الكشف عنها في الحيوانات المتسممة بالـmicrocystins هو ارتفاع في تراكيز مصل حوامض الصفراء، وهذا عائد إلى توقف جريان الصفراء من الكبد **[61]،[62]،[54]**. كما تم الكشف أيضاً عن تغيرات في تراكيز أمصال عدد من الإنزيمات **[39]**. وارتفاع مستويات نيتروجين يوريا الدم بشكل كبير في الحيوانات المتسممة بالـmicrocystins،وتغير تركيز سكر الدم أيضاً ، مع زيادة الكلوكوز أولاً ، ثم انخفض فيما بعد إلى مستويات واطئة بشكل متطرف **[54]،[63]**.

إن الـhepatocytes التي تظهر أولاً تكون سليمة ومحتفظة بنواتها والمايتوكوندريا الخاصة بها، برغم أن هذه العضيات الخلوية تكون متورمة، وتتلف بعد عدة ساعات. إن أنقاض الـhepatocytes يمكن أن توجد في الأوعية الرئوية تالية للموت من التسمم الكبدي، برغم أنه من المستبعد أن تكون علامة على كونها من الـhepatocytes **[54]**. يسبب الـmicrocystin تغيرات مورفولوجية ملحوظة في الـhepatocytes، والتي يمكن أن تشاهد في الكبد السليم والمعلقات المعزولة من الخلايا **[64]**. وجد **[65]** فقاعات صغيرة ظهرت على سطح hepatocytes جرذان معزولة خلال خمس دقائق من الحقن مع 50 ng من الـmicrocystin. وهذه الفقاعات تطورت إلى فقاعات كبيرة مزقت بالكامل البنية الأصلية للـhepatocytes قبل مرور 40 دقيقة على الحقن.

استناداً إلى الدراسات المستندة إلى المجهر الإلكتروني على الجرذان الصائمة المعاملة بجرعة 100 kg/µg من الـmicrocystin-LR تحت الغشاء البريتوني، حدد **[63]** حصول تتابع في التأثيرات السمية مع الوقت – بروز المايتوكوندريا، ثم تضخم الشبكة الإندوبلازمية

ER، ومن ثم تشكل أشكال مغزلية في الشبكة الإندوبلازمية، ثم اندماج المايتوكوندريا وانضواء الشبكة الإندوبلازمية الخشنة في الـcytolysosomes، ونخر خلايا النسيج الأساسي الكبدي مع تمزق الأقنية ومن ثم تقطع المايتوكوندريا.

لقد وجد **[66]** و**[67]** إن الدراسات على الآثار الأيضية للـmicrocystin على الكبد، أو خلايا الكبد المعزولة (hepatocytes)، أظهرت تبدلاً قليلاً بحيث يمكن حسابه على الموت السريع للحيوان المسمم. لقد لوحظ تنشيط الـphosphorylase مع استنزاف الـglycogen المخزون، وانخفاض في الـglutathione، في خلايا كبد معاملة بالـmicrocystin **[67]**، ولكن الخلايا بقيت حية لعدة ساعات. كان التأثير الأكثر إثارة هو التشوه الفيزيائي للـhepatocytes، أفضل ما يمكن أن يرى في خلايا معزولة في معلق أو مزرعة **[66]**،**[68]**.

كان سبب التشوه الخلوي قد ظهر أنه عائد إلى التغيرات الـcytoskeletal، التي تختصر فيها الخيوط الدقيقة الـactin في بؤرة مع تشكل فقاعة على سطح الخلية **[69]**،**[70]**. لم يكن هذا التشوه منضماً مع أي تغير في بلمرة الـactin **[66]**. مع هذا، فقد حدث تغير عميق في بنية الخيوط والبلمرة البينيتين في نفس الوقت، مع فقد في روابط الخلايا مع بعضها البعض وتهدم في النسيج بين الخلوي الأساسي **[68]**. إن هذا التلف البنيوي الذي يسبب الموت عند التسمم الحاد بالـmicrocystin، عائد إلى النزف الداخلي في الكبد مؤدياً إلى الموت بسبب خسارة الدم **[71]**.

استعملت مستخلصات من سيانوبكتريا ***Nostoc rivulre*** مع فئران بيضاء albino بالغة في تجهيزات شربها وطعامها، وبالحقن تحت الغشاء البريتوني وتحت الجلد، وبالاستعمال على الجلد. لوحظ مدى من الحالات المرضية، تضمن استجابة ورمية لوحظت للمستخلص الخام المعطى تحت الجلد أو تحت الغشاء البريتوني، حيث طورت الفئران أوراماً بطنية، ظهرية وكتفية في ثلاثة إلى ستة أشهر، وكان نوع الأورام وعددها غير محددين، علماً أنه لم توثق كمية أي عامل سمي في المستخلصات **[20]**.

إن الـmicrocystin والـnodularin اللذين تنتجهما سيانوبكتريا المياه العذبة، تم التنبؤ بكونهما مسرطنين على أساس من معرفة آلية فعلهما. إن هذه السموم الكبدية قد ثبت سابقاً أنهما مثبطان للـ protein phosphatase الخلوي بطريقة تبدو مشابهة لتلك التي للـpolyether المدروس كثيراً، و okadaic acid الموجود في الإسفنج الأسود والذي ثبت أنه مهيج للأورام في جلد الفأر وفي الغدد المعدية للجرذ **[72]**، برغم أن الـmicrocystin والـnodularin يختلفان في البنية عن الـokadaic acid، فقد ثبت أنهما يرتبطان إلى مستقبل الـ okadaic acid في تجهيزات cytosolic لمختلف الأعضاء **[73]**. في الحقيقة، كان الـmicrocystin-LR قد ثبت مؤخراً أنه مهيج لظهور enzyme-altered foci ودرنات preneoplastic في الكبد بعد الحقن تحت الغشاء البريتوني في الجرذان، وكان هذا عند جرعات واطئة جداً (1-10 µg/kg)، إثباتاً للـmicrocystin-LR باعتباره واحداً من أكثر مهيجات أورام الكبد في الجرذان فعالية تمت دراسته **[74]**. إن الحامض الأميني الفريد 4(E),6(E)-ADD والذي يبدو حاسماً في زيادة فعالية تهييج الأورام يوجد في السم الكبدي الـmicrocystins **[75]**.

ونستنتج من الدراسة الحالية مايلي:

1. وجود السم العصبي Anatoxin-a بالإضافة إلى MCYST-LAba و MCYST-YA و MCYST-YM(O) و[D-MCYST-LR[Asp^3,Dha^7 وهذه التراكيب من أشكال السم الكبدي Microcystin في نوع السيانوبكتريا ***Anabaena oryzae***.
2. التأثيرات التشريحية لأنسجة أكباد الفئران المعاملة أظهرت انتفاخاً شديداً في الخلايا مع تجمع سوائل في البروتوبلازم، وزيادة عدد الخلايا اللمفية، مع زيادة في أحجام النوى وتشوهها وانحلالها في بعض التراكيز العالية، فضلاً عن اضطرابات في النسيج الكبدي، مع وجود خلايا في طور الانقسام مما يدل على احتمال إصابتها بالسرطان.
3. كان الناتج الحيوي للسيانوبكتريا نوع ***Anabaena oryzae*** مسببا في إثارة الأورام السرطانية فضلا عن تسببه في تسمم خلايا الكبد لأنسجة أكباد الفئران .

المصادر

1. G.E.Fogg**.** The physiology of an algal nuisance. *Pro c. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* **(1969).**173,175-189.

2. علي صالح حسين، الجبوري. العوامل المؤثرة في تحرير الهيدروجين بوساطة السيانوبكتريا المثبتة للنتروجين الجوي المعزولة محلياً. أطروحة دكتوراه. كلية العلوم_جامعة بغداد.**(1998)**. العراق.

3. W.W. Carmichael, M.J.Yu, Z.R. He, J.W.He & J.I. Yu. Occurrence of the toxic cyanobacterium (blue-green alga) Microcystis aeruginosa in Central China. *Arch.Hydrobiol.***(1988a).** 114(1).21-30.

4. W.Lampert. Inhibitory and toxic effects of blue-green algae on Daphnia. *Rev. Ges. Hydrobiol.* **(1981a)**. 66.285-298.

5. W.Lampert. Toxicity of the blue-green Microcystis aeruginosa: effective defence mechanism against grazing pressure by Daphnia. *Verh. Int. Verein. Limnol.* **(1981b)**. 21.1436-1440.

6. W.Lampert. Laboratory studies on zooplankton - cyanobacteria interactions. *N.Z. J. Marine Freshwat. Res.* **(1987)**. 21.483-490.

7. R.B.Herbert. The biosynthesis of secondary metabolites. Chapman& Hall, London. **(1989)**.

8. W.W.Carmichael. Cyanobacteria secondary metabolites - the cyanotoxins. *J. Appl. Bacteriol.* **(1992b)**. 72.445-459.

9. Scott, W.E., **(1991)**. Occurrence and significance of toxic cyanobacteria in Southern Africa. *Wat. Sci. Tech.* 23,175-180.

10. W.W. Carmichael. A status report on planktonic cyanobacteria (blue-green algae) and their toxins. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office

of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio.**(1992a)**.

11. D. Schwimmer & M.Schwimmer. Algae and medicine. In: Algae and man. (ed. D.F. Jackson). Plenum Press, New York. **(1964)**. pp. 368-412.

12. M. Schwimmer & D.Schwimmer. Medical aspects of phycology. In: Algae, man and the environment. (ed. D.F. Jackson). Syracuse University Press, New York. **(1968)**. pp. 279-358.

13. G.M.L. Patterson, C.L. Baldwin, C.M. Bolis, F.R.Caplan, H.Karuso, L.K. Larsen, I.A. Levine, R.E. Moore, C.S. Nelson, K.D. Tschappat & G.D. Tuang. Antineoplastic activity of cultured blue-green algae (***Cyanophyta***). *J. Phytol.* 27. **(1991)**.530-536.

14. W.W. Carmichael, V. Beasley, D.L. Bunner, J.N. Eloff, I. Falconer, P. Gorham, K.I. Harada, T. Krishnamurthy, Y.Min-Juan, R.E.Moore, K.Rinehart, M.Runnegar, O.M.Skulberg & M.Watanabe. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* 26(11).(**1988b)**.971-973

15. C.T. Bishop, E.F.L.Anet.& P.R.Gorham. Isolation and identification of the fast-death factor in ***Microcystis aeruginosa*** NRC-1. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37.(**1959)**.453-471.

16. K. Sivonen, M.Namikoshi, W.R.Evans, W.W. Carmichael, F.Sun, L. Rouhiainen, R. Luukkainen & K.L. Rinehart. Isolation and characterization of a variety of microcystins from seven strains of the cyanobacterial genus ***Anabaena.*** *App. Env. Microbiol.* 58.**(1992a)**. 2495-2500.

17. K.L. Rinehart, K.I.Harada, C.C.Namikoshi & C.A.Harris. Nodularin, microcystin and the configuration of Adda. *J. Am. Chem. Soc.* 110.**(1988)**. 8557-8558.

18. W.W. Carmichael, N.A.Mahmood & E.G.Hyde. Natural toxins from cyanobacteria (blue-green) algae. In: Marine toxins: origin, structure, and molecular pharmncology. (eds. S. Hall& G. Strichartz). American Chemical Society, Washington, DC. **(1990)**. pp. 87-106.

19. N.A. Mahmood & W.W.Carmichael. Paralytic shellfish poisons produced by the freshwater cyanobacterium ***Aphanizomenon flos-aquae*** NH-5. *Toxicon* 24(2).**(1986a**).175-186.

20. F.F. Davidson. Poisoning of wild and domestic animals by a toxic waterbloom of Nostoc rivulare Kuetz. *J. Am. Water Works Assoc.* 51.**(1959)**. 1277-1287.

21. K. Sivonen, K. Himberg, R. Luukkainen, S.I. Niemela, G.K. Poon & G.K. Codd. Preliminary characterization of neurotoxic cyanobacterial blooms and strains from Finland. *Tox. Assess*. 4. **(1989)**.339-352.

22. O.M. Skulberg, W.W. Carmichael, R.A. Andersen, S.Matsunaga, R.E. Moore & R. Skulberg. Investigations of a neurotoxic Oscillatorialean strain (***Cyanophyceae***) and its toxin. Isolation and characterization of homoanatoxin-a. *Environ. Toxicol. Chem.* 11.**(1992)**.321-329.

23. C. Edwards, K.A.Beattie, C.M. Scrimgeour & G.A.Codd. Identification of anatoxin-a in benthic cyanobacteria (blue-green algae) and in associated dog poisonings at Loch Insh, Scotland. *Toxicon* 30(10).**(1992)**.1165-1175.

24. S.P. Hawser, G.A.Codd, D.G.Capone & E.J. Carpenter. A neurotoxic factor associated with the bloom-forming cyanobacterium Trichodesmium. *Toxicon* 29(3)**. (1991)**. 277-278.

25. C.S. Huber. The crystal structure and absolute configuration of 2,9-diacetyl-9-azobicyclo(4,2,1)non-2,3-ene. *Acta. Crystallograph.* 328.**(1972)**. 2577-2582.

26. J.P. Devlin, O.E. Edwards, P.R. Gorham, N.R.Hunter, R. K.Pike & B.Stavric. Anatoxin-a, a toxic alkaloid from Anabaena flos-aquae NRC-44h. *Can. j. Chem.* 55.**(1977)**. 1367-1371.

27. S. Wonnacott, K.L.Swanson, N.J.Albuquerque, J.S. Huby, P. Thompson & T. Gallagher. Homoanatoxin: a potent analogue of anatoxin-a. *Biochem, Pharmacol.* 43(3).**(1992)**.419-423.

28. P.J. Sawyer, J.H. Gentile & J.J. Jnr. Sasner. Demonstration of a toxin from ***Aphanizomenon flos-aquae*** (L.) Ralfs. *Can. J. Microbiol.* 14.**(1968)**. 1199-1204.

29. J.R. Gallon**,** T.A. Larue & W.G. Krutz. Photosynthesis and nitrogenase activity in the blue-green algae Gloeocapsa. *Can. J.* 20**.(1978)**. 1633-1637.

30. T.V. Desikachary. "Cyanophyta" Indian Council of Agricultural Research, New Delhi. **(1959)**.

31. R. Rippka, J.Deruelles, J.Waterbury, M.Hardman and R.Stanier. "Generic assignments strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria" . J. Can. Microbiol. Vol.111.(**1979**). 1-61.

32. S.**Bloor** & R. R.England. Elucidation and optimization of the medium constituents controlling antibiotic production by the cyanobacterium ***Nostoc muscorum***. *Enzyme, Microb. Technol. Vol.* 13.**(1989)**.76-81.

33. B. S.**Falch**, G.M.Konig, A.D.Wright, O.Sticher, C. K.Angerhofer, J.M.Pezzuto & H.Bachmann. Biological activities of cyanobacteria: evalution of extracts and pure compounds. *Plant Medica* 61.**(1995).** 321-328.

34. ناظم علاوي، الشاهري. تأثير بعض إفرازات السيانوبكتريا على بعضها وعلى بعض الجراثيم. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات _ جامعة تكريت .**(1997)**. العراق.

35. إيمان عبد العزيز، مصطفى.. التأثيرات البايولوجية المثبطة لمستخلصات بعض النباتات الطبية في بعض الأحياء الدقيقة المعزولة من قنوات جذور الأسنان غير الحية. رسالة ماجستير. كلية العلوم. جامعة الموصل. **(1995)**. العراق.

36. R.K. Scopes. Protein purification Principles and practice. Springer-verlag. New York Heidelberg Berlin. Second printing. **(1984)**. PP: 2-195.

37. خضر حسن علي، الجوراني. أساسيات في علم الحياة الجزيئية. الجزء الأول – العملي. وزارة التعليم العالي والبحث العلمي. الجامعة المستنصرية. **(1989)**. بغداد. العراق.

38. صاحب جمعة،عبد الرحمن. التأثيرات الفسلجية والكيموحيوية لعدد من المستخلصات النباتية في الدم والجهاز التناسلي الذكري في الجرذان البيض Albino Rats(Rattus norvegicus) المعرضة للكرب التأكسدي. اطروحة دكتوراه. كلية التربية – جامعة تكريت. **(2008)**.

39. I. Falconer**,** M. Burch, B. Coverdale & D. Steffensen. The use of pigs as an animal model for Human Microcystis Toxicity. In: Blue-green algal blooms - new developments in research and management. A symposium convened by the Australian

Centre for Water Quality Research and the University of Adelaide. 17th Feb., 1993, Adelaide. **(1993)**.

40. حميد أحمد، الحاج. "التحضيرات المجهرية الضوئية (التقانات المجهرية) الاسس النظرية والتطبيقات" مركز الكتب الأردني، الطبعة الأولى، عمان – الأردن. **(1998)**.

41. D. G. Pease. Histological Techniques for Electron Microscopy. 2nd ed. Academic Press, New York. (**1964**).

42. L. G. Luna. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Mc Graw-Hill Book company,New York. (**1968**). Pp38-39.

43. عبد الهادي ابراهيم، حسين. تأثير الحلبة والحبة السوداء على الأداء الفسلجي للغدة اللبنية دراسة مقارنة. رسالة ماجستير. كلية التربية للبنات. جامعة تكريت. **(2008)**.

44. خاشع محمود، الراوي و محمد خلف الله، عبد العزيز. تصميم وتحليل التجارب الزراعية.كلية الزراعة والغابات، جامعة الموصل– دار الكتب للطباعة والنشر. **(1982)**.

45. I. Chorus & J.Bartram. Toxic Cyanobacteria in Water: A guide to their public health consequences, monitoring and management. London and New York. First published 1999 by E & FN Spon, an imprint of Routledge11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE© 1999 WHO Printed and bound in Great Britain by St Edmundsbury Press, Bury St Edmunds, Suffolk. (**1999**).

46. P.S. Gathercole & P.G. Thiel. Liquid chromatographic determination of the cyanoginosins, toxins produced by the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa. J. Chromat.* (**1987**). 408,435-440.

47. D.P. Botes**,** P.L. Wessels, H. Kruger, **M.T.C.** Runnegar, S. Santikarn, R.J. Smith, J.C.J Barna and D.H.Williams. Structural studies on cyanoginosins-LR, -YR, -YA, and -YM, peptide toxins from ***Microcystis aeruginosa.*** *J. Chem. Soc., Perkin Transactions, I.* (**1985**). 2747-2748.

48. P.Henriksen. Toxic cyanobacteria/blue-green algae in Danish fresh waters. Thesis, Dept. of Phycology, University of Copenhagen**. (1996b)**.

49. Y.G. Yanni & W.W.Carmichael. Screening of cyanobacteria isolated from soil, rice fields and water resources of the Nile Delta for production of cyanotoxins. Abstract, In: VIII International Conference on Harmful Algae, 25-29 June, 1997. **(1997)**.

50. K. Sivonen, S.I .Niemela, R.M. Niemi, L. Lepisto, T.H. Luoma & L.A. Rasanen. Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia* .**(1990)**. 190,267-275.

51. K. Sivonen, M. Namikoshi, W.R. Evans, B. Gromov, W.W.Carmichael & K.L.Rinehart. Isolation and structures of five microcystins from a Russian Microcystis aeruginosa strain CALU 972. *Toxicon* 30(11).**(1992b)**. 1481-1485**.**

52. T. C. Elleman, I. R.Falconer, A. R. B.Jackson & M. T.Runnegar. Isolation, characterization and pathology of the toxin from ***Microcystis aeruginosa*** (= ***Anacystis cyanea***) bloom. Aust. *J. Biol. Sci.*, **31**. **(1978)**. 209-218.

53. K. J. James, I. R.Sherlock& M. A.Stack. Anatoxin-a in Irish freshwater and cyanobacteria, determined using a new fluorimetric liquid chromatographic method. *Toxicon*, **35**(6).(**1997**). 963-971.

54. V.R. Beasley, A.M. Dahlem, W.O. Cook, W.M. Valentine, R.A. Lovell, S. B.Hosser, M.Suzuki & W. W.Carmichael. Diagnosticand clinically important aspects of cyanobacterial (blue-green algae) toxicosis. *J. Vet. Diagn. In z w t.* 1.**(1989)**. 359-365.

55. K.L. Swanson, C.N.Allen, R.S. Aronstam, H.Rapoport & E. X.Albuquerque. Molecular mechanisms of the potent and stereospecificnicotinic receptor agonist (+) – anatoxin-a. *Mol. Pharmacol.* 29.**(1986)**. 250-257.

56. D.C. Main, P.H. Berry, R.L. Peet & J.P. Robertson. Sheep mortalities associated with the blue-green alga ***Nodularia spumigena***. *Aust. Vet. J.* 53. **(1977)**. 578-581.

57. A.R.B. Jackson, A. McInnes, I.R. Falconer & M.T.C. Runnegar. Clinical and pathological changes in sheep experimentally poisoned by the blue-green alga Microcystis aeruginosa. *Vet. Pathol.* 21. **(1984)**. 102-113.

58. I.R. Falconer**,** M.D. Burch, D.A. Stefffensen, A.Choice & O.R. Coverdale. Toxicity of the blue-green alga (cyanobacterium) Microcystis aeruginosa in drinking water to growing pigs, as an animal model for human injury and risk assessment. *Environ. Toxicol. WaterQual.* (in press)**. (1994)**.

59. S.B. Hooser, V.R. Beasley, R.A. Lovell, W.W. Carmichael & W.M.Haschek. Toxicity of microcystin-LR, a cyclic heptapeptide hepatotoxin from Microcystis aeruginosa to rats and mice. *Vet. Pathol.* 26.**(1989**). 246-252.

60. W.C. Theiss, W.W. Carmichael, J. Wyman & R.Bruner. Blood pressure and hepatocellular effects of the cyclic heptapeptide toxin produced by the freshwater cyanobacterium (blue-green alga) ***Microcystis aeruginosa*** strain KC-7820. *Toxicon* 26(7).**(1988)**. 603-613.

61. K. Berg, J. Wyman, W.W. Carmichael & A.Dabholkar. Isolated rat liver perfusion studies with cyclic heptapeptide toxins of ***Microcystis*** and ***Oscillatoria*** (freshwater cyanobacteria). *Toxicon.* 26(9). (**1988)**. 827-837.

62. A.M. Dahlem, A.S. Hassan, S.P. Swanson, W.W. Carmichael & V.R. Beasley. A model system for studying the bioavailability of intestinally administered microcystin-LR, a hepatotoxic peptide from the cyanobacterium Microcystis aeruginosa in the rat. *Pharmacol. Toxicol.* 63.(**1988**). 1-5.

63. G.A. Miura, N.A.Robinson, T.W.Geisbert, K.A.Bostian, J.D.White & J.G.Pace. Comparison of in vivo and in vitro toxic effects of microcystin-LR in fasted rats. *Toxicon* 27(11). **(1989)**. 1229-1240.

64. M.T. Runnegar, I.R.Falconer & J.Silver. Deformation of isolated rat hepatocytes by a peptide hepatotoxin from the blue-green alga *Microcystis aeruginosa. Arch. Pharmacol.* 317.**(1981).** 268-272.

65. J.E. Eriksson, H.Hagerstrand & B.Isomaa. Cell selective cytotoxicity of a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa. Biochem. Biophys. Acta* 930. **(1987).** 304-310.

66. M.T.C. Runnegar & I.R.Falconer. Effect of toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* on ultrastructural morphology and actin polymerization in isolated hepatocytes. *Toxicon* 24(2). **(1986).**109-115.

67. M.T.C. Runnegar, J.Andrews, R.G.Gerdes & I.R.Falconer. Injury to hepatocytes induced by a peptide toxin from the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa. Toxicon* 25(11).**(1987).**1235-1239.

Inhibition of protein phosphatases by microcystin and nodularin associated with hepatotoxicity. *Cancer Res. Clin. Onocol.* 116.**(1990)**. 609-614.

73. N.A. Robinson, C.F. Matson& J.G. Pace. Association of microcystin-LR and its biotransformation product with a hepatic-cytosolicprotein. *J. Biochem. Toxicol.* 6(3).**(1991).** 171-180.

74. R. Nishiwaki-Matsushima, T. Ohta, S. Nishiwaki, M. Suganuma, K.Kohyama, T.Ishikawa, W.W. Carmichael & H.Fujiki. Liver tumor promotion by the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin-LR. *Cancer Res. Clin. Oncol.***118.**(**1992)**. 420-424

75. R. Nishiwaki-Matsushima, R.Nishiwaki, T.Ohta, S. Yoshizawa, M. Suganuma, K. Harada, M.F. Watanabe, & H.Fujiki. Structure-function relationships of microcystins, liver tumor promoters, in interaction with protein phosphatase. *Jpn. J. Cancer Res.* **(1991)**. 82,993-996.

68. Falconer, I.R., & Yeung, D.S.K. (**1992)**. Cytoskeletal changes in hepatocytes induced by *Microcystis* toxins and their relation to hyperphosphorylation of cell proteins. *Chem.- Biol. Interact.* 81, 181-196.

69. J.E. Eriksson, G.I.L.Paatero, J.A.O.Meriluoto, G.A.Codd, G.E.N.Kass, P.Nicotera, & S.Orrenius. Rapid microfilament reorganization induced in isolated rat hepatocytes by microcystin-LR, a cyclic peptide toxin. *Exp. Cell. Res.* 185**.(1989a).**86-100.

70. S.B. Hooser, V.R. Beasley, L.L.Waite, M.S. Kuhlenschmidt, W.W. Carmichael & W.M .Haschek. Actin filament alterations in rat hepatocytes induced *in vivo* and *in vitro* by microcystin-LR, a hepatotoxin from the blue-green alga, *Microcystis aeruginosa. Vet. Pathol.* 28.(**1991)**.,259-266.

71. I.R. Falconer, Algal toxins in seafood and drinking water. Academic Press, London. **(1993a)**.

72. S. Yoshizawa, R .Matsushima, M.F. Watanabe, K.I. Harada, A. Ichihara, W.W. Carmichael & H.Fujiki.

Isolation and identification some kinds of toxins that produced by cyanobacteria species *Anabaena Oryzae* local isolated and study of effect on laboratory mice

[1] Aeman A. Saleem, [2] Hammed S. Khamees , [3] Ehssan M. Abdullah

[1] *Salahaldin Education General directorate, Salahaldin, Iraq.*

[2] *Education college for women Tikrit university , Tikrit, Iraq .*

[3] *Medicine College Tikrit university, Tikrit, Iraq.*

Abstract

Anabaena oryzae species of cyanobacteria was obtained locally from Tikrit region and cultured on a selective ASM-1 media, in shaker orbital incubator under light intensity of 2500 lux and 26°C.

Bioproducts extracts were obtained according to scientific methods to obtain the bioproducts and were identificated according to the new technology: HPLC-MS, IR and NMR methods were used.

Identification was proved presence of hepatic toxin Microcystin in its various forms MCYST-LAba, MCYST-YM(O), [D-Asp^3,Dha^7]MCYST-LR and MCYST-YA, as well presence of the neurotoxin Anatoxin-a in bioproducts of ***Anabaena oryzae*** species of cyanobacteria .

These bioproducts were trial on laboratory mice by two methods, feeding and injection in concentrations of (1000, 2000, 3000) µg/kg of mouse weight. Results showed that the bioproduct of the cyanobacteria ***Anabaena oryzae*** was caused of induction of tumer as well as cytotoxic of liver tissue, results also shown poisoning nervous symptoms for the first hours to test. While the results showed hepatic poisoning symptoms on the dissecting animals, which included changes the color of the liver to darkening and appearance of necrosis, in addition to becoming lobbed and swollen some times with bleeding .

While the poisoning effects on dissecting tissues of livers of the animals showed a strident swollen of the cells and aggregation of fluids in protoplasm and increases in lymphatic cells with multi-nuclei in white blood with increasing in nuclei cells sizes and irregular cells forms and lysis in high concentrations and destruction of liver tissue, with presence some cells in division phase consequently probably more induce of cancer in the liver of the animals, these symptoms affected by dose and type of bioproduct.