التاثيرات الجانبية (الوراثية الخلوية) للعقار ميثوتريكسات Methotrexate في الخلايا الجنسية الذكرية للفأر المختبري *Mus musculus*

The side effects (cytogenetics) of Methotrexate drug on male germ cells of *Mus musculus*

عبــاس عبدالله محمد الجنابي علي عبدالله التميمي أحمد عبد الأميرالعامري
فرع التقانات الاحيائية/الجامعة التكنولوجية

Abbas A. Mohammed Ali A. Al-Temimi
Ahmed AbdulAmier Hussain Al-Amiery
Division of Biotechnology University of Technology

المستخلص

هدفت الدراسة الى جانبين شمل الأول الكشف عن التأثير السمي الخلوي و الوراثي لعقار (MTX) Methotrexate الذي يستخدم بشكل واسع لمرضى سرطان المثانة وذلك في الخلايا الجنسية الذكرية للفئران المختبرية ، أذ أختبرت ثلاث جرع (0.01,0.02, 0.04ملغم/كغم من وزن الجسم) من العقار . لقد تم الفحص من خلال (5) أختبارات وهي معامل الانقسام الخلوي و التجمع المركزي للكروموسومات و تشكيل النوى الصغيرة و التغيرات الكروموسومية للخلايا الجنسية و كذلك التشوهات في رؤوس النطف . تبين من النتائج أن هذا العقار له تأثير معنوي في أنخفاض معامل انقسام الخلايا الجنسية . لكنه عمل على زيادة معدل التجمع المركزي للكروموسومات وزيادة في تشكيل النوى الصغيرة و زيادة معدل التغيرات الكروموسومية وزيادة في معدل التشوهات في رؤوس النطف مقارنة بمعدل العينة القياسية بعد 21 و35 من حقن الدواء . شمل الجانب الثاني دراسة علاقة تركيب الدواء مع القدرة العلاجية عن طريق حساب الشحنة الذرية للدواء مع القواعد النيتروجينية الأدنين و الكوانين والسايتوسين و اليوراسيل .

Abstract

In this study three doses (0.01, 0.02, 0.04) mg\kg B.W of methotrexate drug which used, in the treatment of bladder cancer, were investigate in male germ cells of *Mus musculus*. Five tests were considered (mitotic index, chromosomal central associated, micronuclei, chromosomal aberration and sperm–head abnormalities). The results showed that's these doses were presentel with high inhibitory effect of cell division, as well as, they induced significantly higher number of chromosomal central associated, micronuclei, chromosomal aberration and sperm head abnormalities especially after (21, 35) days after treatment at equal rate in control. We study the relationship between the structures of drug with it medical effect by study the atomic charge of each atom of drug and adenine, guanine, cytosine and uracil.

المقدمـة

تعد بعض الادوية و العقاقير الطبية مصدر مهم للعلاج الكيميائي Chemotherapy و التي تمثل مجموعة متنوعة من العقاقير الكيميائية التي يكون تأثيرها على الخلايا السرطانية أقوى منه على الخلايا السليمة . لهذا تعد مصدر مهماً لعلاج الكثير من الحالات المرضية السرطانية . لكن في نفس الوقت يحتوي بعضها على بعض المواد التي تحث التطفير و التسرطن في مواقع معينة من جسم الكائن الحي [1] .

لذا أصبح من الضروري البحث عن هذه المواد و أجراء الدراسات عنها خصوصاً التي استخدمت بهيئة كيميائية كمضادات للتسرطن و التي لها القدرة على القضاء على النمو الشاذ و أغلبها تعتبر سموم خلوية Cytotoxic لها القدرة على تثبط أنقسام الخلاياالتي تنتقل عبر الدورة الدموية الى جميع أعضاء و أنسجة الجسم المختلفة لكي

Keyword:cytogenetics, atomic charge, methotrexate, *Mus musculus*

تستطيع الحد من الخلايا السرطانية فعلى سبيل المثال لا الحصر عقار Cyclophosphamide يعمل على تفتيت الدنا (DNA) و بالتالي يعيق عملية انقسام الخلية [1] و كما أن العقاقير 6-mercaptopurine و Cytarabine و Fluorouracil(5FU-5) [2] و بعضها لها تأثيرات سلبية على الرنا (RNA) مثل Adriamycin و mitomycin -C و bleomycin وبالتالي تعمل على آعاقة عمليات البناء الحيوي للبروتينات النووية مما يؤدي الى موت الخلايا السرطانية [3] في حين بعضها يؤثر على انزيمات اصلاح الـ DNA (DNA-repair) منها etoposide و topotecan[4].

أن التأثيرات الجانبية المصاحبة للعلاج الكيميائية كثيرة وتشمل بدرجة أساسية الخلايا سريعة النمو كأنسجة الفم و المرئ و المعدة و الامعاء و جذور الشعر و الخلايا التناسلية و بعضها لها تأثيرات على الاعضاء الحيوية مثل القلب و الرئة و الكلى و الكبد و الجهاز العصبي و التناسلي [5] ، يستخدم عقار ميثوتريكسات لعلاج سرطانات المثانة في الأنسان [3] ، لذلك تهدف الدراسة لمعرفة التأثيرات الوراثية الخلوية على خلايا التناسلية في الفئران .

المواد و طرائق العمل

استخدمت ذكور فئران البيض albino mice التي جلبت من البيت الحيواني / لمختبرات الصحة المركزية / بغداد ، بعمر 10-12 أسبوع و بمعدل وزن 25 غم. أستخدم في التجربة (55) فأراً ذكر قسمت الى خمسة مجاميع ووزعت بالشكل التالي : المجموعة الأولى (5 فئران) حقنت بالماء المقطر استعملت كسيطرة سالبة .المجموعة الثانية (5 فئران) حقنت بـ 0.002 ملغم/كغم من Cyclophosphoamide أستعملت كسيطرة موجبة . المجموعة الثالثة (15) فأراً حقنت تحت الغشاء البريتوني بـ 0.01 ملغم/كغم من وزن الجسم من العقار ولثلاث فترات خلال فترة التجربة في اليوم 1 و 14 و 28 من بدأ التجربة. المجموعة الرابعة (15) فأراً حقنت بـ 0.02 ملغم/كغم من العقار ولثلاث جرع للايام 1 و 14 و 28 خلال فترة التجربة . المجموعة الخامسة (15) فأراً حقنت بـ 0.04 ملغم/كغم من العقار و لثلاث جرع أيضاً للايام (1, 14 , 28) خلال فترة التجربة .وجرى الفحص بعد اليوم 7و21و35 من الحقن الفئران لكل مجموعة معاملة بالعقار.

لغرض الحصول على الكروموسومات الخلايا الجنسية :

جرى استئصال الخصية من الحيوان ،وأزيل غلافها وقطعت الى قطع صغيرةووضعت في محلول سترات الصوديوم الثلاثية بتركيز 1% و لمدة 20 دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة ، و عمل طرد مركزي بسرعة 1500دورة/دقيقة لمدة5 دقائق ، و تم التخلص من الجزء العالق و أضيف 5 مل من محلول ناقص التوتر Hypotonic و تركت في الحاضنة تحت 37م° لمدة ساعة تم خلالها رج عدة مرات ، عمل طرد مركزي بسرعة 1500 دورة /دقيقة لمدة 5 دقائق وتم التخلص من الجزء العالق بعد ذلك أضيف له 5 مل من المثبت Fixative (3 حجوم من الميثانول مع 1حجم من حامض الخليك الثلجي) الى الجزء الراسب في البداية قطرتين على الجدران الداخلية للانبوبة مع الرج المستمر حتى مزج المحلول بصورة جيدة . وضعت في الثلاجة4 م° لمدة نصف ساعة. حضرت الشرائح لتجف في مكان نظيف تحت درجة حرارة الغرفة ثم جرى صبغها بملون كمزة (Giemsa stain) [6] . ولتحضيرالنطف أعتمدت طريقة وضعت الأنابيب الناقلة للنطف في محلول سترات الصوديوم الثلاثية بتركيز1% ولمدة 20 دقيقة تحت درجة حرارة الغرفة ، وجرى تقطيعها بواسطة سكين حادة الى قطع صغيرة وعمل طرد مركزي بسرعة1500 دورة/دقيقة لمدة5 دقائق ، وتم التخلص من العالق بعد ذلك أضيف المثبت .

في حين جرى حساب تشكيل النواة الصغيرة مع اجراء بعض التحويرات البسيطة [6] و تم حساب النسبة المئوية لتشكيل النوى الصغيرة و التجمع المركزي للخلايا في 100 خلية .

وجرى حساب معامل الانقسام(MI)وفق المعادلة التالية[7]:

$$\text{معامل الأنقسام} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي}} \times 100$$

و حسبت التغيرات الكروموسومية في 100 خلية جنسية في الطور الاستوائي الاول و الحاوية على 20 زوج من الكروموسومات مفصولة بشكل جيد [8] . أعتمدت طريقة استخراج حالات التشوهات في رؤوس النطف [9] وبعد تحضيرها جرى حسابها بواقع 100 نطفة ضمن كل شريحة .

قورنت المعدلات المختلفة باستخدام طريقة أقل فرق معنوي LSP و على مستوى5 % وكذلك أختبار t-test لأيجاد أهم الفروق بين القراءات للفئران المعاملة وغير المعاملة بالعقار[10].

النتائج و المناقشة

1. تأثر العقار في مؤشر انقسام الخلايا الجنسية

يظهر جدول (1) المعدل لمؤشر انقسام الخلايا الجنسية للفئران المختبرية المعاملة أقل من متوسط مؤشر انقسام الخلايا الجنسية للفئران غير المعاملة (السيطرة) ، كما يلاحظ زيادة التثبيط لمؤشر انقسام الخلايا الجنسية بازدياد التراكيز ، و أن التركيز0.04 ملغم/كغم كان أكثر التراكيز في احداث تثبيط في مؤشر الانقسام مقارنة بالتركيزين (0.01 و0.02) ملغم/كغم للفئران المعاملة بالعقار. تؤثر الفترة لزمنية التي تستغرقها المعاملة بالعقار على مؤشر انقسام الخلايا الجنسية حيث كانت أعلى نسبة تثبيط بعد الاسبوع الثالث و الخامس من المعاملة .

لقد أكد التحليل الاحصائي أختبار t (t-test) للجرعة0.01 ملغم/كغم من وزن الجسم عدم وجود فرق معنوي للفئران المعاملة مقارنة بالسيطرة خلال فترة التجربة. اما الجرعة 0.02 ملغم/كغم فقد أظهر الاسبوع الثالث من المعاملة اختلاف معنوي ($P<0.05$) مقارنة بالسيطرة في حين لم يلاحظ وجود فرق معنوي لباقي الايام . اما الجرعة (0.04) ملغم/كغم فقد أظهرت فرقاً معنوياً خلال الاسبوع الاول من المعاملة بمستوى ($P<0.05$) أما الاسبوع الثالث فقد كان بمستوى ($P<0.01$) في حين أظهر الاسبوع الخامس فرقاً معنوياً أعلى بمستوى ($P<0.001$) مقارنة بالسيطرة .

لقد أظهرت النتائج بأن هناك تثبيط في معدل مؤشر الانقسام الطبيعي للخلايا الجنسية Germ cells يناسب طردياً مع زيادة التركيز العقار ، أي أن تأثير العقار يعتمد على الجرعة المستخدمة و أعلى فترة تثبيط كانت بعد الاسبوع الثالث و الخامس من المعاملة.

تقوم بعض العقاقير الطبية مثل العقار Cyclophosphamide بتفتيت هيكلية الحامض النووي و كذلك العقاقير 6-mercaptopurine و Cytarabine و 5 FU-5 Fluorouracil المستخدمة في العلاج لكثير من الحالات السرطانية [11،12،13] . حيث تعمل على تحطيم أغلب العمليات الايضية داخل الخلية و بالتالي توقف فعاليات الانقسام ، أو قد تؤدي الى خلل في تركيب خيوط المغزل Spindle microtubules أثناء عملية الأنقسام الخلوي ، وقد يكون لهذه المادة تأثير في تثبيط أنزيمات بلمرة الـDNA (DNApolymerases) أذ لا تستطيع أتمام عملية الأنقسام حتى يتم تضاعف المادة الوراثية [14 ،15،16] ، أي أن هذا العقار يدخل ضمن المواد ذات القابلية السمية الخلوية Cytotoxic[17] .

2. تشكيل النواة الصغيرة

جدول (1) يظهر المعدل والخطأ القياسي لمعدل تشكيل النوى الصغيرة لكل من الفئران السيطرة (السالبة والموجبة) والفئران المعاملة بالعقار MTX ، اذ يلاحظ حصول زيادة في معدل تشكيل النوى الصغيرة وأختلفت معنوياً(($P<0.05$) ، كما يلاحظ زيادة ظهور النوى الصغيرة بزيادة الجرعة أي أن التأثير يعتمد على الجرعة المعطاة . أشارت نتائج تحليل التباين الى وجود تأثير معنوي بمستوى ($P<0.05$) بين كل من التركيز وفترة المعاملة والتداخل فيما بينها . أن تشكيل النوى الصغيرة ناتج عن حالات غير الطبيعية في أنقسام القطع المركزية Centromeres للكروموسومات اوناتجة بسبب أضرار في الـDNA تقود الى عدم فعالية وعدم تشكيل خيوط المغزل [8،11،13] ومعروف مثل هذه الحالات أثناء أستخدام العقارMMC أذ يعمل على تفتيت الـDNA وتقطيعة وبالتالي تؤدي الى ظهور قطع كروموسومية خالية من القطع المركزية لديها القدرة على التحام نهاياتها وتكوين تشكيلات كروية صغيرة تشبة النواة [1 ،8] .

3. التجميع المركزي للكروموسومات

تشير نتائج تحليل التباين الى وجود تأثير عالي المعنوية بمستوى ($P<0.01$) لحالة التجمع المركزي للكروموسومات في الخلايا الجنسية بعد معاملة الفئران بعقار MTX و في كل التركيز ، الفترة الزمنية وللتداخل فيما بينها . جدول (1) يظهر متوسط القيم للتجمع المركزي للكروموسومات الحاصلة بفعل العقار لكل من الفئران غير المعاملة (السيطرة) و الفئران المعاملة بالعقارCFA ، أذ يلاحظ زيادة معدل التجميع المركزي

للكروموسومات في الخلايا الجنسية بزيادة التركيز ، وأظهرت علاقة طردية بين زيادة التركيز وعدد حالات التجميع المركزي للكروموسومات أذ تزداد بزيادة التركيز ، لقد أشارت نتائج المقارنة بين عينات الفئران غير المعاملة والعينة القياسية السالبة باختبار t الى وجود فرق معنوي بين المتوسطات لجميع التراكيز الأحتمالية أقل من(0.05) . في حين أظهرت نتائج أختبار t للجرعتين (0.02 ،0.04) ملعم/كغم أعلى قيم تجمع للكروموسومات في الأيام(21 ،35) بعد المعاملة.أن هذة النتائج تتفق مع دراسة لعقار "Sustanon"100 المنشط للهرمونات الجنسية والذي يؤدي الى زيادة معدل الأنقسامات الخلوية للخلايا الجنسية فوق معدلاتها الطبيعية [15] .

4. قابلية عقار ميثوتركسيت في استحثاث التغيرات الكروموسومية في الخلايا الجنسية:

الاختبارالرابع المستخدم لتحديد مقدار تأثير العقار في التركيبة الكروموسومية هو أختبار التغيرات الكروموسومية ، حيث أن التغيرات الكروموسومية يمكن أن تحدث ذاتياً Spontanous و التي تكون ضمن كفاءة أنظم الاصلاح Repair systems للكائن الحي و يمكن أن تحدث من خلال عوامل قد تؤثر في الطبيعة التركيبية للكروموسوم أو على ميكانيكية الحركة أثناء الانقسام او كلاهما . لقد أظهرت متوسطات قابلية العقار في استحثاث التغيرات الكروموسومية مقارنة مما هو عليه في الفئران غير المعاملة (السيطرة) جدول (2) ، كما يلاحظ زيادة التغيرات بزيادة التركيز أما على مستوى الفترة الزمنية فقد أظهر الاسبوع الثالث و الخامس أعلى تأثير في استحثاث التغيرات الكروموسومية في الخلايا الجنسية .

لقد أشارت نتائج المقارنة بين عينة الفئران المعاملة و العينة القياسية باستخدام اختبار t بأن الكسر الكروماتيدي أظهر فرقاً جوهرياً عالي المعنوية و الاحتمالية أقل من 0.025 لتراكيز الثلاث و للايام (7،21، 35) . أما بالنسبة للكسر الكروموسومي و القطع الكروموسومية فقد أظهرت اختبارات t وجود فرق معنوي عالي (P<0.001) للفئران بعد (7،21،35) يوم من المعاملة لجميع الجرع المستخدمة.

هناك العديد من الادوية ذات السمية الخلوية لها القدرة الكامنة على الاقل ان تكون مواد مطفرة Mutagenic agents تكون لها القدرة في استحثاث التغيرات الكروموسومية Chromosomal aberration [3،15]، لذا يعد هذا الاختبار من الاختباراات الحيوية المهمة في كشف قابلية بعض العقاقير الطبية المستخدمة في علاج السرطان في استحثاث التغيرات و بالتالي الطفرات او التسرطن .

5. التشوهات في رؤوس النطف

درس تأثير عقار ميثوتراكسيت المستخدم لعلاج حالات سرطان المثانة بتراكيز و فترات مختلفة في رؤوس النطف. و يتضح من جدول (3) وجود زيادة في معدل استحثاث التشوهات في رؤوس النطف في الفئران المعاملة بالعقار مقارنة بالعينة القياسية و المتمثلة بالمعيوب الجسم الطرفي Acrosome defective و انحراف قمة كلاب الرأسApical hook defective و أنتفاخ في الرأس Swollen head و فقدان كلاب الرأس Blunt hook أضافه الى تشوهات أخرى Other's defective ممثلة بـ (رأس غير منتظم الشكل ، شبه مطرقة ، رأس ذو نتؤين و غيرها من الاشكال غير الطبيعية) و كان مستوى الاحتمالية (P<0.01) لجميع تلك التشوهات. أكد تحليل التباين وجود فرق معنوي عال بمستوى (P<0.01) لجميع تلك التشوهات و للمعاملات الثلاث ، كذلك أظهر التداخل ما بين التركيز و فترة المعاملة فرق معنوي بمستوى (P<0.01) .

لقد كانت أعلى فترة تأثير التي تستغرقها المعاملة بالعقار في معدل حصول التشوهات في رؤوس النطف (21 ،35) يوم لأغلب التشوهات مما يعني أن العقار يؤثر على مرحلة الخلايا Spermatogonia المرحلة التي تحتوي على الخلايا النطفية الاولية Primary spermatocytes والخلايا النطفية الثانوية Secondary spermatocytes أي أن هذه الخلايا كانت أكثر حساسية للعقاروهذه تتفق مع دراسات للعديد من المواد الكيميائية وبعض الأدوية[6،8،18،15] . كذلك يتضح أن التركيزان (0.02 ، 0.04) ملغم/كغم من وزن الجسم قد أحدثا أعلى نسبة من التشوهات في رؤوس النطف في حين أعطى التداخل ما بين التراكيز أختلافاً معنوياً عال (P<0.01) . أن تناول مقدار قليل جداً لن يكون فعالاً في معالجة السرطان وتناول مقادير كبيرة قد تسبب تأثيرات جانبية خطرة .

حسابات المقارنة باستعمال الشحنة الذرية

تم حساب الشحنات الذرية للعقار جدول رقم (4)موضوع الدراسة مقارنة مع الشحنات الذرية لكل من الادنين جدول (5) و الكوانين جدول (6) ، السايتوسين جدول (7) واليوراسيل جدول (8) ، حيث وجد ان مجموعة الامين الموجودة في العقار (ذرة النتروجين السادسة وقيمتها 0.623-) موضوع الدراسة لها شحنة ذرية مقاربة

للشحنة الذرية في الكوانين (ذرة النتروجين الخامسة وقيمتها 0.55-) . اما اعلى شحنة ذرية عند العقار موضوع الدراسة فهي -0.885 لذرة الاوكسجين رقم 22 وعند مقارنتها مع القواعد النتروجينية الاربع نلاحظ ان اعلى شحنة ذرية هي الكوانيين -0.927 لذرة الاوكسجين رقم عشرة، وللسايتوسين هي-0.959 لذرة الاوكسجين رقم ثلاثة ، ولليوراسيل هي-0.913 لذرة الاوكسجين رقم ثلاثة [19] . وهذا يعطي انطباع اولي لكيفية الارتباط وحدوث الطفرة فضلا عن معرفة ان احتمالية حدوث الطفرة عن طريق الادنين ضعيفة مقارنة مع باقي القواعد النتروجينية . اضافة الى دراسات مستقبلية حول تصنيع العقاقير المضادة للتسرطن والعقاقير المسرطنة .

جدول (1): المعدل ± الخطأ القياسي لتأثير العقار في مؤشر أنقسام الخلايا الجنسية وتشكيل النواة الصغيرة والتجمع المركزي للكروموسومات لذكور الفئران المختبرية

الحالة			معامل الأنقسام	تشكيل النوى الصغيرة	التجمع المركزي للكروموسومات
			المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي
العينة القياسية (السيطرة السالبة)			0.06 ± 15.34	0.03 ± 0.05	0.04 ± 0.05
العينة القياسية(السيطرة الموجبة)سايكلوفوسفوأمايد			±4.25 0.36	±3.15 0.45	1.16 ± 4.13
الفئران المعاملة	الجرعة	يوم			
0.01	ملغم/كغم	7	0.06 ± 15.24	*0.07± 0.95	*0.05 ±1.55
		21	*0.08 ± 12.05	*0.06 ± 2.64	*0.06 ±2.54
		35	* 0.05 ± 10.33	*0.05 ± 4.54	* 0.05 ±5.12
0.02	ملغم/كغم	7	1.23 ± 14.06	* 0.66 ± 1.63	*0.60 ±2.05
		21	**0.05 ± 9.55	*1.43 ± 5.23	*0.33 ± 4.66
		35	**0.45± 8.56	**0.04 ± 8.05	**0.55 ± 7.84
0.04	ملغم/كغم	7	**0.73 ± 9.12	*0.42± 3.43	*0.05 ±4.34
		21	**0.08 ± 7.84	**0.55 ± 7.87	**0.68 ±7.45
		35	***0.65 ± 5.65	***0.05 ± 9.75	***0.05 ± 9.55

MI=mitotic index, MN= micronuclei, CCA= chromosomal central associated

*** (مستوى الأختلافات المعنوية في المقارنة مع العينة السيطرة السالبة)p<0.05, **p<0.025,***p<0.01**

جدول (2): المعدل± الخطأ القياسي للتشوهات الكروموسومية في الخلايا الجنسية لذكور الفئران المختبرية

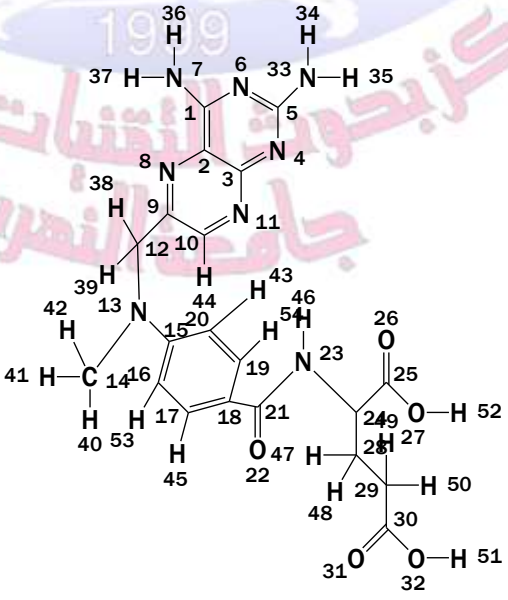
الحالة			كسر كروموسومي المتوسط ± الخطأ القياسي	كسر كروماتيدي المتوسط ± الخطأ القياسي	قطع كروموسومية المتوسط ± الخطأ القياسي	كروموسوم حلقي المتوسط± الخطأ القياسي
حيوانات السيطرة السالبة			0.01 ± 0.02	0.01 ± 0.03	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00
حيوانات السيطرة الموجبة			0.05±0.11	*0.05 ± 0.17	0.03±0.06	0.02±0.04
الحيوانات المعاملة بالعقار	الجرعة	فترة المعاملة / يوم				
	0.01 ملغم/كغم	7	0.04 ± 0.08	*0.05 ± 0.22	0.04 ± 0.07	* 0.01± 0.03
		21	*0.05 ± 0.54	**0.05 ± 1.22	*0.05 ± 0.45	*0.04 ± 0.07
		35	**0.03 ± 0.88	**0.05 ± 3.06	*0.05 ± 0.66	*0.05 ± 0.43
	0.02ملغم/كغم	7	*0.05± 0.23	** 0.05 ± 0.85	*0.06 ± 0.22	*0.04 ± 0.13
		21	**0.06 ± 1.23	***0.06 ± 3.23	**0.05 ± 0.86	* 0.05 ± 0.22
		35	**0.05 ± 1.76	***0.06 ± 4.05	**0.05 ± 1.04	* 0.05 ± 0.78
	0.04ملغم/كغم	7	**0.05 ± 0.66	***0.06 ± 2.62	*0.33 ± 0.54	** 0.07± 0.25
		21	***0.07 ± 1.55	***0.05 ± 4.07	***0.56 ± 1.02	**0.05± 0.67
		35	***0.05 ± 2.34	***0.04 ± 5.03	***0.06 ± 1.64	***0.34 ± 0.88

(مستوى الأختلافات المعنوية في المقارنة مع العينة السيطرة السالبة)*p<0.05,p<0.025,***p<0.01**

جدول (3): المعدل± الخطأ القياسي لتشوهات رووس النطف بعد المعاملة بالعقار MTX للفئران المختبرية

مصدر التباين	معيوب الجسم الطرفي المتوسط± الخطأالقياسي	أنحراف قمة كلاب الرأس المتوسط± الخطأ القياسي	أنتفاخ الرأس المتوسط± الخطأ القياسي	فقدان كلاب الرأس المتوسط± الخطأ القياسي	تشوهات آخرى المتوسط± ألخطأ القياسي
حيوانات السيطرة السالبة	0.02 ± 0.05	00.0± 0.00	0/02 ±0.05	0.02± 0.04	0.04 ± 0.22
حيوانات السيطرة الموجبة(سايكلوفوسفوأمايد)	** 0.06 ± 0.80	0.05 ± * 0.55	0.06 ± **0.65	**0.06 ± 1.33	0.05 ± **1,65
الحيوانات المعاملة بالعقار الجرعة يوم					
0.01 ملغم/كغم 7	0.33 ± 0.38	0.06± *0.43	0.22 ± 0.46	0.05 ± 0.34 *	0.15 ± 0.48
21	0.45 ± 0.52	0.05 ± 0.65	*0.23± 0.56	0.11± 0.55 *	*0.05 ± 0.56
35	*0.22 ± 0.88	0.24 ± *0.88	0.15 ± 0.68 *	0.42± 0.84	0.42 ± 0.86
0.02 ملغم/كغم 7	*0.22 ± 0.68	0.14 ± *0.78	*0.15 ± 0.55	0.12± 0.46 *	0.14 ± 0.66 *
21	* 0.06± 0.88	*0.35 ± 0.89	*0.12 ± 0.66	0.22 ± 0.74 *	0.05 ± 0.22
35	**0.05± 1.76	**0.12 ± 1.22	*0.22 ± 0.69	0.43 ± 1.33 *	0.05 ± 1.78 **
0.04 ملغم/كغم7	* 0 42 ± 0.84	*0.55 ± 1.45	0.42 ± 0.68	0.42 ± 0.88	0.05 ± 1 .44 **
21	** 0.07 ± 1.55	*0.64 ± 1.86	0.05± 1.06 **	*0.7± 1.83	0.77 ± 1.66
35	***0.05 ± 2.34	*0.45 ± 1.98	0.22± 1.62 **	**0.15 ± 1.45	* 0.66 ± 2.48

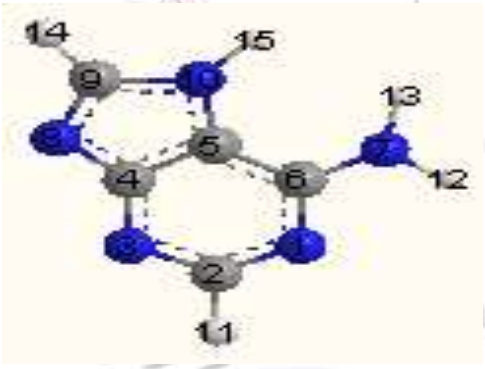
(مستوى الأختلافات المعنوية في المقارنة مع العينة السيطرة السالبة) *p< 0.05 , **p<0.01 , *** p< 0.025



جدول (4): يمثل قيم الشحنات الذرية للعقار

Charges	Charges	Charges	Charges	Charges
C 0.233 [C(1)]	C -0.036 [C(12)]	N 0.200 [N(23)]	H 0.090 [H(34)]	H 0.475 [H(45)]
C -0.211 [C(2)]	N 0.313 [N(13)]	C 0.052 [C(24)]	H 0.086 [H(35)]	H 0.094 [H(46)]
C 0.214 [C(3)]	C -0.062 [C(14)]	C 0.673 [C(25)]	H 0.321 [H(36)]	H 0.037 [H(47)]
N -0.602 [N(4)]	C 0.154 [C(15)]	O -0.775 [O(26)]	H 0.026 [H(37)]	H 0.192 [H(48)]
C 0.384 [C(5)]	C -0.326 [C(16)]	O -0.194 [O(27)]	H 0.029 [H(38)]	H 0.027 [H(49)]
N -0.623 [N(6)]	C -0.237 [C(17)]	C -0.044 [C(28)]	H 0.036 [H(39)]	H 0.028 [H(50)]
N 0.043 [N(7)]	C -0.137 [C(18)]	C -0.094 [C(29)]	H 0.039 [H(40)]	H 0.053 [H(51)]
N -0.382 [N(8)]	C -0.363 [C(19)]	C 0.594 [C(30)]	H 0.031 [H(41)]	H 0.053 [H(52)]
C 0.149 [C(9)]	C 0.360 [C(20)]	O -0.680 [O(31)]	H 0.021 [H(42)]	H 0.192 [H(53)]
C 0.240 [C(10)]	C 0.349 [C(21)]	O -0.123 [O(32)]	H 0.145 [H(43)]	H 0.084 [H(54)]
N -0.382 [N(11)]	O -0.885 [O(22)]	N 0.036 [N(33)]	H 0.023 [H(44)]	H 0.083 [H(55)]

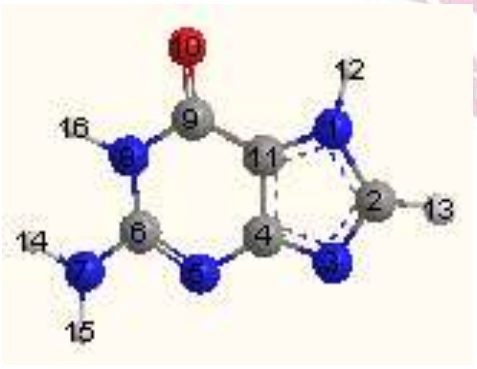
Adenine



جدول (5): يمثل قيم الشحنات الذرية للادنين

Charges	Charges	Charges	Charges	Charges
N -0.437 [N(1)]	C 0.194 [C(4)]	N 0.084 [N(7)]	N 0.341 [N(10)]	H 0.086 [H(13)]
C 0.193 [C(2)]	C -0.062 [C(5)]	N -0.452 [N(8)]	H -0.034 [H(11)]	H -0.001 [H(14)]
N -0.455 [N(3)]	C 0.275 [C(6)]	C 0.094 [C(9)]	H 0.089 [H(12)]	H 0.085 [H(15)]

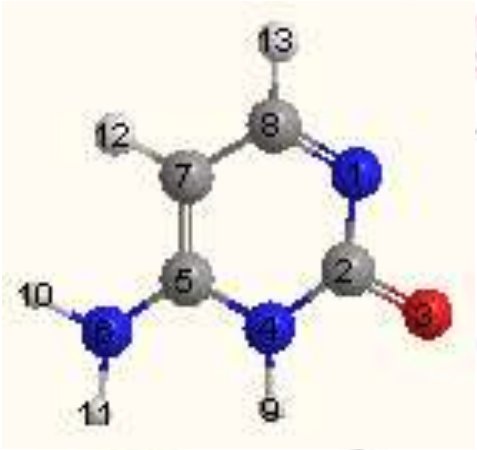
Guanine



جدول (6): يمثل قيم الشحنات الذرية للكوانيين

Charges	Charges	Charges	Charges	H -0.001 [H(13)]
N 0.333 [N(1)]	C 0.218 [C(4)]	N 0.041 [N(7)]	O -0.927 [O(10)]	H 0.086 [H(14)]
C 0.074 [C(2)]	N -0.552 [N(5)]	N 0.334 [N(8)]	C -0.127 [C(11)]	H 0.086 [H(15)]
N -0.480 [N(3)]	C 0.390 [C(6)]	C 0.355 [C(9)]	H 0.084 [H(12)]	H 0.086 [H(16)]

Cytosine



جدول (7): يمثل قيم الشحنات الذرية للسايتوسين

Charges	Charges	Charges	Charges	Charges
N -0.418 [N(1)]	N 0.374 [N(4)]	C -0.314 [C(7)]	H 0.089 [H(10)]	H -0.002 [H(13)]
C 0.497 [C(2)]	C 0.304 [C(5)]	C 0.157 [C(8)]	H 0.088 [H(11)]	-
O -0.959 [O(3)]	N 0.083 [N(6)]	H 0.083 [H(9)]	H 0.018 [H(12)]	-

Uracil

جدول (8): يمثل قيم الشحنات الذرية لليوراسيل

Charges	O -0.913 [O(3)]	O -0.842 [O(6)]	H 0.087 [H(9)]	H 0.014 [H(12)]
N 0.479 [N(1)]	N 0.337 [N(4)]	C -0.262 [C(7)]	H 0.101 [H(10)]	-
C 0.453 [C(2)]	C 0.393 [C(5)]	C 0.124 [C(8)]	H 0.029 [H(11)]	-

المصادر

1. Pillans, P., Ponz, S. and Parker, M. (1989) Cyclophospamide induced DNA strand breaker in mouse embryo cephalic tissue in vivo. Carinog enesis. 10(1): 83-85.
2. Crook, R. and Mlean, A. (1986) Cytotoxicity DNA cross linking and single strand break induce by activated cyclophophamide and acrolein in human leukemia cells. Cancer Res. 46(10): 5029-5034.
3. Barakat, A. (2007) Cytogentic effects of 6-TG and MTX on human blood lymphocytes from bladder cancer patients. Thesis, M.Sc. College of science/Al-Nahran univ.
4. Ohno, M., (1965) Human chromosome technology .ed Yunis, J. J. New York. Academic Press. 166.
5. Ortiz, A. And Yamauchi, P.S. (2007) A treatment strategy for psoriasis transitioning from systemic therapy to biologic agents. Skin med. 5:475-8
6. Allen, I., Collins, B. and Evansky, P. (1994) Sperm, micronucleus analysis of tricholore ethylene and chloralhydrate effects in mice. Mut. Res: 323: 81-88.
7. Stick, M., and San, C. (1981) Topics environmental physiology and medicine in (Short-Term Test for Chemical Carcinogen), Springer Veriag. New York.PP116.
8. Au, and Zhu, S., (1990) Function of chromosomal aberration male mouse. Mut. Res. 244:209-214.
9. 9-yrobek, A. and Bruce, W. (1978) Chemical Mutagens: Principle and Methods for their Detection (Ed. By A. Hollaender and J. Desesses) Plenum Press. New York 5, 257-285.
10. خاشع محمود ، و خلف الله ، عبد العزيز (1986) تصميم و تحليل التجارب الزراعية . وزارة التعليم العالي و البحث العلمي . دار الكتب للطباعة و النشر ،جامعة الموصل صفحة 488.
11. Kim, Y.F.(2004)Colorectal carcinogenesis and DNA methylation :lessons from animal studies .Environ.Mol.Mutagen. 44:10-25.
12. Zimecki,M. and Artym,J.(2004)Effect of methotrexate on the immune response in selected experimental models .Postepy Hig. Med.Dosw.58:226-35.
13. Kolli,V.; Abraham,P. and Rabi,S.(2008) Methotrexate-induced nitrosative stress may play a critical role in small intestinal damage in the rat.Arch.Toxicol.82:763-70.
14. -محمد ، عباس عبدالله (2008)التأثير السمي الوراثي لمبيد القوارض البروديفاكوم في الخلايا المولدة للنطف والخلايا الأميةللبيوض في الفئران .المجلة العراقية للتقانات الحياتية . المجلد 7(1)86-95.
15. - محمد،عباس عبدالله (2009) التأثيرات السمية الخلوية والسمية الوراثيةلعقار 'Sustanon'100 في الخلايا الجنسية الذكرية للفآر المختبري*Mus musculus* بحث مقبول للنشر ، المجلة العراقية للتقانات الحياتية المجلد 8(1).
16. Kappas, A., Vachkova, R., Lacher, S. and Tzoneva, M. (1990) Genotoxicity studies on the OPP. Mut. Res. 240: 203-208.

17. Hadnagy, w. and Semayer, M. (1991) In vito cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy by pariticulate pollutants. Toxic. 5: (516) 507-510.

18. Shiraishi, Y. (1978) Chromosome aberration induced germ cells of mice. Mut. Res. 57: 313-324.

19. Redha,I.;Ahmed,A. and Yasmien,K.(2010)Design,synthesis and bioassay of novel coumarins.African J.of Pure and Applied Chemistry .4(6):74-86

Biotechnology Research Center
1999
مركز بحوث التقنيات الاحيائية
جامعة النهرين