وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة كربلاء
كلية التربية – قسم علوم الحياة

دراسة بعض التأثيرات الوراثية لمستخلص حبوب لقاح نحل العسل في ذكور الفئران البيض

رسالة تقدم بها

باسم كاظم بريسم القيسي

الى مجلس كلية التربية جامعة كربلاء وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة/ الحيوان

بكلوريوس / علوم حياة 2004

بإشراف

أ. د .علي حمود السعدي

أ. م. د .ستار جاسم حتروش

ربيع الثاني
1431هـ

نيسان
2010 م

ٱ ب ب

چ ڈ ژ ژ ڑ ڑ چ

صَدَقَ اللهُ العليُّ العظيم

القلم الآية (١)

إقرار المشرفين على الرسالة

نشهد بان اعداد هذه الرسالة قد جرى تحت اشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الحيوان

التوقيع: التوقيع:

الأسم : د. ستار جاسم حتروش الأسم: د. علي حمود محيسن السعدي

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد المرتبة العلمية: أستاذ

العنوان: كلية التربية- جامعة كربلاء العنوان: كلية العلوم – جامعة بابل

إقرار رئيس قسم علوم الحياة

اشهد بان اعداد هذه الرسالة قد جرى في جامعة كربلاء / كلية التربية / قسم علوم الحياة وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الحيوان

التوقيع:

الأسم: د. قيس حسين عباس

المرتبة العلمية: مدرس

العنوان: كلية التربية – جامعة كربلاء

إقرار رئيس لجنة الدراسات العليا

اشارة الى التوصيات المتوفرة ارشح هذه الرسالة الى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها

التوقيع:

الأسم: د.

المرتبة العلمية:

العنوان: كلية التربية – جامعة كربلاء

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة [دراسة بعض التأثيرات الوراثية لمستخلص حبوب لقاح نحل العسل في ذكور الفئران البيض] تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية وبذلك أصبحت الرسالة مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير .

التوقيع:

الاسم: د. محمد حسين عبد الله المهداوي

المرتبة العلمية: مدرس

الكلية والجامعة: كلية التربية – جامعة كربلاء

التأريخ: / /2010

إقـرار لجنــة المنـاقشــة

نشهد نحن اعضاء لجنة المناقشة ادناه ، بإطلاعنا على الرسالة الموسومة [دراسة بعض التأثيرات الوراثية لمستخلص حبوب لقاح نحل العسل في ذكور الفئران البيض] وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ما يتعلق بها ووجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير (امتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الوراثة .

رئـيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. محمد صبري عبد الرزاق

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة بابل – كلية الطب

التاريخ : / / 2010

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د. علي حسين دحية

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة بغداد –كلية العلوم

التاريخ : / / 2010

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : د.علي حسين مكي الكبيسي

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء – كلية التربية

التاريخ : / / 2010

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الاسم : د. ستار جاسم حتروش

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء – كلية التربية

التاريخ : / / 2010

عضو اللجنة (المشرف)

التوقيع :

الاسم : د. علي حمود محيسن السعدي

المرتبة العلمية : أستاذ

العنوان : جامعة بابل – كلية العلوم

التاريخ : / / 2010

مصـادقة عمـادة كليـة التربيـة

أُصادق على مـا جـاء في قـرار اللجنـة اعـلاه

التوقيع :

الاسم : د. حسين كاظم القطب

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : جامعة كربلاء – كلية التربية

التاريخ : / / 2010

الإهداء

إلى الحب الكبير ..... العراق

إلى من أثرى الإنسانية بإنسانيته ..... الإنسان

إلى من علمني حروفاً من المعرفة ..... المعلم

إلى روح من زرع فِيَّ حب العلم ..... والدي..رحمه الله

إلى ينبوع العطاء والمودة الذي لا ينضب ..... والدتي الحنونة

إلى من نذر عمره في سبيل سعادتي ..... أخي حيدر

إلى من كانتا عوني في رحلتي ..... أختاي

اهدي ثمرة جهدي المتواضع

شكرٌ وعرفانٌ

الحمد لله على ما كان ونستعينه من أمرنا على ما يكون والصلاة والسلام على الرسول محمد وعلى آله وصحبه أجمعين .اما بعد ...

فمن دواعي العرفان بالجميل أن أتقدم بخالص الشكر الوافر والاحترام الفائق إلى أستاذي الفاضل الدكتور علي حمود السعدي على اختياره موضوع البحث وعلى متابعته المستمرة لي والذي كان بمنزلة الأستاذ والأخ وفقه الله ورزقه الصحة من اجل إغناء مسيرة العلم والمعرفة , كما أتقدم بالشكر للدكتور ستار جاسم حتروش لمتابعته إياي خلال فترة البحث , ويُلزمني واجب الوفاء بأن أتوجه بالشكر والامتنان إلى عمادة كلية التربية والى قسم علوم الحياة لاحتضانه إياي طوال مدة الدراسة . كما أتقدم بالشكر الى الاستاذ الدكتور حيدر كامل زيدان والدكتور عصام كظوم من جامعة بابل لمساعدتهما إياي خلال مدة البحث , وأتقدم بالشكر إلى السيد نصير ميرزا والسيدة لقاء حسون لمساعدتهما خلال مدة الدراسة .

واجد من الواجب ان اتقدم بالشكر الوافر الى الاخ خماط بريسم الذي كان خير أخ وخير ناصح وفقه الله , وأتقدم بالشكر العميق والامتنان الخالص إلى زملائي في قسم الدراسات العليا وأخص بالذكر منهم الأخوان رفيقي المسيرة العلمية جاسم عبد العباس وعلاء عبد الحسين والى السيدة هدى عبد الرضا الآنسة زهراء عبد الرزاق . ولا أنسى أن أتقدم بالشكر الجزيل إلى الإخوان احمد زاجي وعلي مالك وحيدر عبد الرزاق واسعد عباس ومحمد رمضان لما قدموه إلي من مساعدة خلال مدة الدراسة .

ولا يسعني إلا أن أتوجه بالشكر والعرفان إلى الإخوان الذين لازموني طوال فترة دراستي السيد مهند عبد الكريم والسيد عادل جعفر والسيد رحيم عويد لمساعدتهم لي في انجاز هذا البحث طوال فترة الدراسة . وأخيراً أسجل وافر ثنائي وعظيم امتناني إلى كل من علمني ويسر لي دربي والذين أنستني آفة النسيان ذكرهم فجزاهم الله عني خير الجزاء .

الباحث

الخـلاصـة

تضمنت الدراسة الحالية اختبار فعالية المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح كمضاد للأكسدة والتطفير , إذ تم الكشف عن التأثيرات الضارة لعقار السايكلوفوسفامايد ومحاولة الحد منها باستخدام هذا المستخلص .

لقد تم توصيف هذا المستخلص باستخدام كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC إذ بينت النتائج وجود اكثر من مكون لهذا المستخلص عند استخدام عدة اطوار سائلة مختلفة . وعند فحص الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين لوحظ ظهور فعالية مضادة للأكسدة في عدة حزم . وقد حددت الفعالية المضادة للأكسدة لهذه الحزم من خلال احتفاظها باللون الاصفر مما يدل على وجود فعالية مضادة للأكسدة في بعض مكونات مستخلص حبوب اللقاح .

لقد اظهر نمط الترحيل الكهربائي لـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران ان المعاملة بجرعة 20 ملغم/كغم من السايكلوفوسفامايد ادت الى ظهور مسحة كبيرة بحجم جزيئي تراوح بين 9.4– 0.9 كيلو زوج قاعدي والتي كان فيها مستوى التحلل 8.5 كيلو زوج قاعدي مقارنة مع السيطرة السالبة , اما عند اجراء التداخلات للجرعة 5 ملغم/كغم من مستخلص حبوب اللقاح فقد لوحظ بأن مستويات التحلل في الـ DNA للتداخل الاول والثاني والثالث كان بحدود (0, 1.4, 8.5) كيلو زوج قاعدي على التوالي. أما عند إجراء التداخلات لجرعة 15 ملغم/كغم من مستخلص حبوب اللقاح فقد لوحظ بأن التداخلات الأول والثاني والثالث اعطت مستويات تحلل بحدود (3.1, 3.8, 8.5) كيلو زوج قاعدي على التوالي.اما عند اجراء التداخلات لجرعة 30 ملغم / كغم فقد اعطيت التداخلات الاول والثاني والثالث مستويات تحلل بحدود (4.8, 5.3, 8.5) كيلو زوج قاعدي على التوالي. وهذا يدل على أن التداخل الأول لجرعة الـ 5 ملغم / كغم هو الأفضل في التقليل من مستوى التحطم في الـ DNA ويليه في ذلك التداخل الثاني بينما لم يؤدَّ التداخل الثالث في كافة الجرع إلى أي تغيرات إيجابية ملموسة في منع تحطم الـ DNA .

وقد بينت نتائج دراسة معامل الانقسام (MI) ان متوسط الـ MI لخلايا نقي العظم للفئران المعاملة بجرع (5 و15 و30) ملغم / كغم من مستخلص حبوب اللقاح وجرعة 20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات ، إذ بلغت قيم MI للتداخلات (قبل , مع , بعد) للجرعة 5 ملغم/كغم 20.2 , 18.86 , 8.6 على التوالي اما للجرعة 15 ملغم/كغم فهي 14.1 , 13.5 , 8.14 على التوالي اما للجرعة 30 ملغم/كغم فهي 10.34 , 10.08 , 8.5 على التوالي ولوحظ

أيضاً وجود فرق معنوي ($P< 0.01$) في قيمة MI عند مقارنة التداخل الأول والثاني من الجرعة الاولى من مستخلص حبوب اللقاح والتداخل الاول والثاني من الجرعة الثانية من مستخلص مستخلص حبوب اللقاح مع السيطرة الموجبة والتي أدت الى رفع معامل الانقسام .

وفيما يتعلق بنتائج التشوهات الكروموسومية , فقد تبين أن الجرعة 5 ملغم / كغم في التداخل الاول والثاني أدت الى حدوث فرق معنوي ($P < 0.01$) مقارنة مع السيطرة الموجبة , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي. اما عند اجراء الجرعة 15 ملغم/كغم فقد تبين بان التداخل الاول والثاني ادى الى اختلاف معنوي ($P < 0.01$) , في حين كانت نتائج التداخل الثالث غير معنوية , اما الجرعة 30 ملغم/كغم فقد ادى التداخل الاول والثاني الى حدوث فرق معنوي ($P < 0.01$) , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي .

اما عند اجراء اختبار الكشف عن التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية فقد تبين بان الجرعة 5 ملغم / كغم في التداخل الاول والثاني أدت الى حدوث فرق معنوي ($P < 0.01$) مقارنة مع السيطرة الموجبة . في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى اختلافات معنوية , وعند اجراء الجرعة 15 ملغم/كغم تبين أن التداخلين الاول والثاني ادى الى حدوث اختلافات معنوي , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى حدوث اختلافات معنوية , وعند الجرعة 30 ملغم/كغم فقد ادى التداخل الاول والثاني الى حدوث اختلافات معنوية ($P < 0.01$) , في حين لم يؤدِ التداخل الثالث الى فرق معنوي .

ومن نتائج الدراسة الحالية يمكن ان نستنتج أن المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح يمتلك فعالية مضادة للأكسدة والتطفير عند اعطائه قبل ومع المطفر وبجرع واطئة في كل من الخلايا الجسمية والجرثومية.

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
الفصل الاول	1
1. المقدمة	1
الفصل الثاني	3
2. استعراض المراجع	3
1.2 الدراسات المتعلقة بحبوب اللقاح	3
1.1.2 مكونات حبوب اللقاح	3
2.1.2 الفعالية المضادة للأكسدة لحبوب اللقاح	5
3.1.2 دور حبوب اللقاح في منع الاصابة بالامراض بالاضافة الى الآثار الفسيولوجية	6
1.3.1.2 حبوب اللقاح والسرطان	6
2.3.1.2 الفعالية المضادة للبكتريا	7
3.3.1.2 حبوب اللقاح والمناعة	7
4.3.1.2 التأثيرات الايضية لحبوب اللقاح	8
2.2 دور النباتات في تثبيط الطفرة والوقاية من السرطان	9
3.2 دور العناصر والمركبات في الغذاء في تثبيط الطفرة والوقاية من السرطان	11
4.2 السايكلوفوسفامايد	12
1.4.2 الخصائص الفيزيائية والكيميائية	15
5.2 اختبارات التحليلات الوراثية الخلوية	16
1.5.2 اختبار معامل الانقسام	16
2.5.2 اختبارالتشوهات الكروموسومية	17
6.2 اختبار تحلل الـ DNA	18

7.2 اختبار التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية	20
الفصل الثالث	21
3. المواد وطرائق العمل	21
1.3 المواد	21
1.1.3 المواد الكيميائية المستعملة في التجربة	21
2.1.3 الاجهزة والمستلزمات المستعملة في التجربة	22
3.1.3 مصدر المستخلص	23
4.1.3 حيوانات التجربة	23
2.3 طرائق العمل	24
1.2.3 تحضير المستخلص النباتي	24
2.2.3 توصيف المستخلص النباتي بوساطة كروموتوغرافيا الطبقة الرقيقة	24
3.2.3 اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين	25
4.2.3 تحديد الجرعة المثلى للسايكلوفوسفامايد	25
5.2.3 تحضير المحاليل	25
1.5.2.3 المحاليل الخاصة بالتحليلات الوراثية	25
1.1.5.2.3 محلول السايكلوفوسفامايد	25
2.1.5.2.3 تحضير جرع المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح	25
3.1.5.2.3 محلول الكولجسين	26
4.1.5.2.3 محلول واطئ التوتر KCl	26
5.1.5.2.3 المحلول المثبت	26
6.1.5.2.3 دارئ سورنسن	26
7.1.5.2.3 محلول ملون كمزا	26
8.1.5.2.3 محلول دارئ التحميل	26
2.5.2.3 المحاليل الخاصة باختبارات رؤوس الحيوانات المنوية	27
1.2.5.2.3 محلول ملون ازرق المثلين	27
2.2.5.2.3 محلول داريء الفوسفات الملحي	27

6.2.3 تصميم التجارب	27
7.2.3 تحضير الـ DNA	28
1.7.2.3 استخلاص الـ DNA من الدم	28
2.7.2.3 الترحيل الكهربائي لـ DNA على هلام الاكاروز	29
8.2.3 اختبار معامل الانقسام	30
9.2.3 تحضير كروموسومات نقي العظم	31
10.2.3 تحضير الحيوانات المنوية للفئران	31
3.3 التحليل الاحصائي	31
الفصل الرابع	32
4 . النتائج	32
1.4. توصيف المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	32
1.1.4. اختبار الكشف عن الفعالية المضادة للاكسدة باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين	39
2.4. الاختبارات البيولوجية الجزئية والوراثية الخلوية	46
1.2.4 تحلل الـ DNA لخلايا الدم البيضاء للفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح	46
3.2.4. دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران	49
4.2.4. دراسة التشوهات الكرموسومية في خلايا نقى العظم للفئران	51
5.2.4 دراسة التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية	56
الفصل الخامس	60
5. المناقشة	60
1.5. توصيف المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC)	60
2.5 اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بوساطة طريقة الرش بالبيتاكاروتين	61

3.5. الاختبارات البيولوجية الجزيئية والوراثية الخلوية	62
1.3.5. تحلل الـ DNA لخلايا الدم البيضاء للفئران	62
2.3.5. دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران	67
3.3.5. دراسة التشوهات الكرموسومية في خلايا نقى العظم للفئران	69
4.3.5.دراسة التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية للفئران	71
الاستنتاجات	74
التوصيات	75
المصادر العربية	76
المصادر الاجنبية	77

قائمة الاشكال

الموضوع	رقم الصفحة
شكل (2-1) التركيب الكيميائي للسايكلوفوسفامايد	15
شكل (3-1) حبوب لقاح نحل العسل	23
شكل (4-1) ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح على صفائح الـ TLC باستخدام الطور السائل (بتروليوم ايثر , ميثانول , بنزين , كلوروفورم) (V/V/V/V1:1:1:1)	34
شكل (4-2) ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح على صفائح الـ TLC باستخدام الطور السائل (ايثر , ايثانول , كلوروفورم , بنزين) (V/V/V/V 1:1:1:1)	36
شكل (4-3) ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح على صفائح الـ TLC باستخدام الطور السائل (هكسان , ايثانول , كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1)	38
شكل (4-4) فحص الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاوتين للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (بتروليوم ايثر , ميثانول , بنزين , كلوروفورم) (V/V/V/V 1:1:1:1)	41
شكل (4-5) فحص الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاوتين للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (ايثر , ايثانول , كلوروفورم , بنزين) (1:1:1:1 V/V/V/V)	43
شكل (4-6) فحص الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاوتين للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (هكسان , ايثانول , كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1)	45
شكل (4-7) يبين نمط الترحيل الكهربائي للـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء لذكورالفئران بعد المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وبجرع مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح	48
شكل (4-8) زيادة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا)	53
شكل(4-9) قلة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكورالفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا)	53
شكل (4-10) كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة	54

بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (1600 × ، ملون جمزا)	
شكل(4–11) كسر كروماتيدي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكورالفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (1600 × ، ملون جمزا)	54
شكل (4–12) الكروموسوم الحلقي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (1600 × ، ملون جمزا)	55
شكل(4–13) نطف فاقدة للراس لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير 1600 X , ملون أزرق المثلين)	58
شكل (4–14) A. نطفة فاقدة للذنب B. نطفة فاقدة للرأس لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير 1600 X , ملون أزرق المثلين)	58
شكل (4–15) نطفة فاقدة كلاب الرأس لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير 1600 X , ملون أزرق المثلين)	59
شكل (4–16) نطف ذات رأس كروي لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير 1600 X ,ملون أزرق المثلين)	59

قائمة الجداول

الجدول	رقم الصفحة
جدول (4–1) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (بتروليوم ايثر , ميثانول , بنزين , كلوروفورم)(V/V/V/V1:1:1:1)	33
جدول (4–2) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (ايثر : ايثانول : كلوروفورم: بنزين) (V/V/V/V 1:1:1:1)	35
جدول (4–3) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (هكسان , ايثانول , كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1)	37
جدول (4–4) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام اختبار الرش بالبيتا كاروتين (استخدم الطور السائل بتروليوم ايثر :ميثانول:بنزين:كلوروفورم)	40
جدول (4–5) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام اختبار الرش بالبيتا كاروتين (استخدم الطور السائل ايثر :ايثانول:كلوروفورم:بنزين)	42
جدول (4–6) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام اختبار الرش بالبيتا كاروتين (استخدم الطور السائل هكسان:ايثانول:كلوروفورم)	44
(4–7) يبين مستوى تحلل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران بعد المعاملة وبتراكيز وسفامايد مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح	47
جدول (4 – 8) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران المعاملة بجرع (5 و15 و30) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح وجرعة 20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات	50
جدول (4–9) التغيرات في معدلات تشوهات الكروموسومية (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة	52
(4–10) التغيرات في معدلات التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الفئران المعاملة بجرع (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة .	57

الفصل الأول
المقدمة

الفصل الأول

المقدمة Introduction

تُعد حبوب اللقاح (Pollen grains) وحدات تكاثرية ذكرية صغيرة تتكون في متك ازهار النباتات وتقوم عاملات النحل بجمعها من مصادر نباتية متباينة وتحتوي على العديد من المغذيات الدقيقة والمركبات الغنية بالطاقة ووجد ان لعاملات النحل القابلية على اختيار حبوب اللقاح ذات القيمة الغذائية العالية (El-Siddig *et al.,* 2006).

يتدرج اللون في حبوب اللقاح من الابيض المصفر الى الازرق الغامق بحسب النوع بسبب احتوائها على كثير من الصبغات النباتية مثل الكاروتينات (Carotenes) والفلافوزانثينات (Flavoxanthins) والزانثوفيلات (Xanthophylles) والكربتوزانثينات (Cryptoxanthins) واسترات الليوتين (Lutein esters) والانثوسيانيات (Anthocyanins) و يعد البيتاكاروتين مصدر مهم وكمادة اولية (Precursor) لفيتامين A بالاضافة الى فعاليته كمضادة للاكسدة (Owayss , *et al*.,2004) .

كذلك أشار Martin وجماعته (2006) ان حبوب لقاح نحل العسل تمتلك فعالية مضادة للأكسدة عالية لإحتواءها على العديد من المركبات المضادة للأكسدة كالفيتامينات والفينولات المتعددة .

تحتوي حبوب اللقاح على كثير من المواد ذات التاثيرات المختلفة مثل المواد المضادة للاكسدة كالفينولات والفيتامينات والاحماض الدهنية غير المشبعة وكذلك تحوي على الاحماض الامينية والكربوهيدرات والبروتينات والتي اضفت عليها اهمية خاصة فهي بالاضافة الى استخدامها كغذاء تمتلك بعض الخواص المهمة منها الفعالية المضادة للاكسدة والتي يمكن من خلالها استخدامها في الخصائص العلاجية كمضاد للتطفير (Antimutagenicity) (Almas *et al*.,2001) , وتحتوي حبوب اللقاح على الفينولات التي تستخدم للعلاجات المناعية كمضاد للالتهابات (Anti-inflammatory) (Gebara *et.al*., 2002) وكمضاد للبكتريا (Antibacterial) (Carpes *et al*.,2007) وايضاً في علاجات التهابات الكبد الحادة واليرقان (Jellin *et al.,* 2000) .

تحتوي حبوب اللقاح على العديد من المركبات الفينولية المضادة للأكسدة مثل Flavanoids وبصورة رئيسية الفلافونولات Flavonols والفلافونات Flavones و الفلافونونات Flavanones وهذه المركبات من العوامل المضادة للتطفير وانها من المواد المضادة للأكسدة والتي تضفي عليها

اهمية في الوقاية من السرطان في الفئران والجرذان في المراحل الاولى من نشوءه (Najai *et al.*,2007) .

كذلك وجد ان للمستخلص الكلوروفورمي لحبوب اللقاح المتواجدة في نحل العسل تأثيرات تثبيطية عالية في الخطوط الخلوية السرطانية المستزرعة خارج جسم الكائن الحي وهي : (PC-3 و LNCaP و MCF-7 و Hela و BEL7902 و BCG-823 و KB و A549 و HO8910) إذ يعمل المستخلص على تعجيل دخول الخلايا الى عملية الموت الخلوي المبرمج Apoptosis (Wu and Lou , 2007) .

تحوي حبوب لقاح نحل العسل على كميات عالية من المركبات المضادة للاكسدة التي تمتلك فعالية تحفيزية للجهاز المناعي وبسبب ذلك فان هذه الحبوب تكون جيدة للمرضى الذين يتعاطون العلاج الكيميائي , فالعلاج الكيميائي يرتبط مع الخلايا الورمية (Tumor cell) بينما حبوب لقاح نحل العسل تحفز الجهاز المناعي لمهاجمة الخلايا الورمية (Wier , 2008) .

كذلك وجد Roman وجماعته ان المستخلص المائي لحبوب لقاح نحل العسل يحتوي على المركب الفلافونيدي Apigenin ومشتقاته . ويعد هذا المركب عاملا مهما في تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية لابيضاض الدم النخاعيني وسرطان القولون البشري *in vitro* (Wang *et al.*, 2000) .كذلك وجد Picott (2005) ان مستخلص حبوب اللقاح يعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية في البروستات *in vitro* بوساطة تعجيل عملية الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis).

تهدف الدراسة الحالية إلى :

1 . فحص الفعالية المضادة للاكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب لقاح نحل العسل.

2. دراسة تأثير مطفر السايكلوفوسفامايد (Cyclophosphamide) في كروموسومات خلايا نقي العظم للفئران و الحامض النووي منقوص الاوكسجين DNA (Deoxyribonucleic acid) المستخلص من خلايا الدم البيض للفئران وفي رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الفئران.

3 . محاولة الحد من تلك التأثيرات الضارة لهذا المطفر باستخدام جرع مختلفة من مستخلص حبوب اللقاح من خلال إجراء ثلاثة تداخلات للمستخلص مع المطفر لمعرفة ما إذا كان لهذا المستخلص تأثير وقائي أو علاجي محتمل.

الفصل الثاني
استعراض المراجع

الفصل الثانـي

2. استعراض المراجع Literature Review

1.2 الدراسات المتعلقة بحبوب اللقاح

1.1.2 مكونات حبوب اللقاح

لتحديد قيمة حبوب اللقاح بوصفها مجهزاً غذائياً للنحل فمن الضروري معرفة نوع النبات الذي تم الحصول عليها منه , إذ تختلف حبة اللقاح في مكوناتها من نوع الى آخر وليس هناك نوع واحد يحوي كل المكونات الموجودة في حبوب اللقاح (Kerel , 1996) .

فقد وجد Shawer وجماعته (1987) و Muniategai وجماعته (1989) ان هنالك 16 حامضاً دهنياً في حبوب اللقاح , أكثرها اهمية حامض البالمتيك (Palmitic acid) وحامض المايرستك (Myristic acid) وحامض الاوليك (Oleic acid) وحامض اللينوليك (Linoleic acid) وحامض اللينولينك (Linolenic acid) وحامض الستيارك (Stearic acid) . كما وجد في حبوب اللقاح انزيمات مثل Glucosoxidase , وجرت دراسات عدة لمكونات حبوب اللقاح في بعض النباتات من البروتين ووجد ان المحتوى البروتيني لحبوب لقاح الحمضيات 6.2 – 20.7 % و الذرة الصفراء 23.2 % و الأجاص 28.6 % و طلع النخيل 23.72 – 29.72 % و البرسيم 23.4 % و زهرة الشمس 27.9 % (Gilliam *et al*.,1980) . وعموماً فقد وجد Tabio وجماعته (1988) ان مكونات حبوب اللقاح التي يجمعها النحل تحوي 7% ماء , 20% بروتينات , 3% رماد , 5% كربوهيدرات ودهون , 36% سكريات مختزلة , 1% سكريات غير مختزلة , 28% مركبات غير معروفة .

في حين اشارت Crane (1990) الى ان مكونات حبوب اللقاح التي يجمعها النحل هي 11% ماء , 21% بروتين , 3% رماد , 5% كربوهيدرات ودهون , 25% سكريات مختزلة , 3% سكريات غير مختزلة , 3% نشأ , 29% مركبات غير معروفة اضافة الى ذلك فقد وجدت الباحثة ان تلك الحبوب تحوي فلافونيات وكاروتينات وفيتامين C و E و فيتامينات B مثل الرايبوفلافين وحامض البانتوثينك والبايوتين والنياسين وكذلك وجدت بعض العناصر مثل (الخارصين Zn , الحديد Fe , السليكون Si , المنغنيز Mn , المغنيسيوم Mg , الكلور Cl , اليود I , الالمنيوم Al , الكبريت S , الصوديوم Na , الكالسيوم Ca , البوتاسيوم K , الفوسفور P , البورون B , والتيتانيوم Ti) , اضافة الى احتواءها على الاقل على (6) حوامض عضوية مثل الـ (Phenolic acid) ,

فضلاً عن الحوامض الامينية لاسيما البرولين المتوافر والسائد في حبوب اللقاح والحوامض النووية DNA و RNA واكثر من 100 انزيم ومنظمات نمو مثل Auxins , Brassins , Kinins , Gibberellines .

وقد بين Royden (1994) ان مكونات حبوب لقاح المتواجدة في نحل العسل الطازجة تحتوي على الاحماض الامينية (آرجنين , ليوسين , ايزوليوسين , لايسين , ميثيونين , فنيل النين , ثريونين , تربتوفان , فالين) وعلى عناصر (الكالسيوم Ca و المغنيسيوم Mg و البوتاسيوم K و النحاس Cu و الحديد Fe و السليكون Si و فوسفور P و كبريت S و كلور Cl و منغنيز Mn) , فضلاً عن الفيتامينات مثل الثيامين , رايبوفلافين , حامض النيكوتينك , بايريدوكسين , حامض البانتوثينك , بايوتين , حامض الفوليك , لاكتوفلافين , الفا / بيتا كاروتين A و B_2 , B_{12} , C , D , E , Inositol والهرمونات , وتحتوي حبوب لقاح نحل العسل على الصبغات : Flavoxanthin , Xanthophyll epoxide , Carotene , Flavonols , Epiphasic caratinoids , Ethylic ether , Quercitin , Zeaxanthin , Lycopene , Crocetin .اما بقية المكونات فكانت : ماء , سكريات مختزلة , سكريات غير مختزلة , نشأ , احماض امينية حرة , بروتين , عامل هرمون النمو البشري .

كما بين Albritton (2004) ان حبوب اللقاح يتركز فيها الفيتامينات مثل حامض البانتوثينك وفيتامين C و E والكيمياويات الضوئية (Photochemicals) وبقية المغذيات مثل الكاروتينات والفلافونيدات والستيرولات , وان 20% من الحبوب تتكون من احماض امينية وتحتوي ايضاً على اكثر من 5000 انزيم ومرافق انزيمي . وبينت نتائج التحليل الكروموتوغرافي من نوع كروموتوغرافيا السائل ذي الكفاءة العالية (Higher Performance Liquid Chromatography) HPLC وبوساطة الطيف الكتلي MS (Mass Spectrum) لحبوب لقاح نحل العسل انها تحتوي على عدة صبغات مختلفة : Anthocyanin و Petunidin 3-o-rutinoside و Delphinidin و Cyanidin و Petunidin-3-o-glucoside (Naranjo et al ,2004) . كذلك قام الباحث Roman وجماعته (2007) بتحليل المركبات الفينولية الموجودة في مستخلص حبوب اللقاح بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الشعري (Capillary Electrophoresis) المقترن مع تقنية الرش الكهربائي الايوني للطيف الكتلي MS وقد تبين ان المستخلص يحتوي على عدة مركبات فينولية :

Galloyl glucose و 2′,4′,6′-trihydroxy-3′- formyldihydrochalcone و Acetin glucoside و 7 - O - methylherbacetin - 3 - sophoroside و Apigenin -6-8-di-c-glucoside و Genistein - 7 - O - β - D - glucoside و Quercetin - 3 – rutinoside و Apigenin - 7 - O – glucoside و Luteolin -7-O-glucoside .

2.1.2 الفعالية المضادة للأكسدة لحبوب اللقاح

The antioxidant activity of pollen grains

ان الفعالية المضادة للأكسدة لحبوب اللقاح يمكن تشخيصها من خلال احتواءها على مواد تعمل كمواد كاسحة (Scavenger) للجذور الحرة (Free redicals) وكمثبطات لعملية بيروكسدة الدهن (Lipid peroxidation) , إذ تتفاعل هذه المواد مع الجذر الحر للمركب DPPH (2,2-diphenyl -1-picrylhydrazyl) وتعمل على التقليل من فعاليته نتيجة حجز الجذور الحرة لهذا المركب وقد تبين ان الفعالية المضادة للاكسدة تختلف في كل نوع من انواع حبوب لقاح نحل العسل المتجمعة من اصول نباتية مختلفة وتبين ان حبوب لقاح نبات الـ *Amaranthus hybridus* اظهرت فعالية عالية في حجز الجذور الحرة لـ DPPH اما جنس الـ *Tagetes sp.* فانه يحوي مستوى اعلى من الفعالية في تثبيط الجذور الحرة (Abarca *et al.*, 2004) .

تعد حبوب اللقاح مصدر للطاقة للاستهلاك البشري فهي تحتوي على مركبات مغذية مثل الكربوهيدرات والبروتينات والاحماض الامينية واللبيدات والفيتامينات والمعادن والمغذيات الدقيقة , فضلاً عن ذلك تحتوي على كميات مهمة من المركبات المتعددة الفينول وبصورة رئيسة الفلافونويدات (Flavonoids) والتي تمتاز بخصائص اختزالية تسمح لها بأن تكون عوامل مختزلة وواهبة للهيدروجين (Almedia-Muradian *et al.*, 2005) .

ان خصائص الفعالية البايولوجية لمستخلصات حبوب لقاح المتواجدة في نحل العسل يمكن ان تزداد عندما يتم استخدام مذيب مناسب للاستخلاص , فقد وجد Carpes وجماعته (2007) ان استخلاص حبوب لقاح نحل العسل بوساطة الكحول الايثانولي بتركيز (من 40% الى 90%) يعطي فعالية مضادة للأكسدة مختلفة اعتماداً على تراكيز المركبات الفينولية , وقد تراوحت الكميات الكلية للفينولات بمعدل مابين 8.1 – 3.6 ملغم / كغم و 10.9–6.9 ملغم / كغم لكل من حبوب

لقاح نبات *Alagaous state* وحبوب لقاح نبات *Parana state* على التوالي وان الدرجة الاعلى للفعالية المضادة للاكسدة وجدت في المستخلص الايثانولي (90%) لحبوب لقاح نبات *Parana state* والذي يحتوي على اعلى تركيز من المركبات الفينولية .

3.1.2 دور حبوب اللقاح في منع الاصابة بالامراض بالاضافة الى الآثار الفسيولوجية

1.3.1.2 حبوب اللقاح والسرطان

تحتوي حبوب اللقاح على العديد من المركبات الفينولية المضادة للأكسدة مثل Flavanoids وبصورة رئيسية Flavonols و Flavones و Flavanones وهذه المركبات من العوامل المضادة للتطفير وانها من المواد المضادة للأكسدة والتي تضفي عليها اهمية في الوقاية من السرطان في الفئران والجرذان في المراحل الاولى من نشوءه (Najai *et al.*,2007) .

ان الاطباء السريريون في اوربا يستخدمون حبوب لقاح المتوجدة في نحل العسل الجاف الذي يسمى Cernilton لمعالجة التهاب البروستات وسرطان البروستات إذ ان الـ Cernilton يحتوي على مواد تثبط النمو في خلايا البروستات المتورمة ويعمل على تثبيط الخط الخلوي السرطاني *in vitro* بمعدل 50 % بعد يومين من المعاملة بجرعة 5 ملغم / مل (Habib , 1995) . كذلك بين Picott (2005) ان مستخلص حبوب اللقاح يعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية في البروستات *in vitro* بوساطة تعجيل عملية الموت الخلوي المبرمج (Apoptosis).

وجد Aliyvazicioglu وجماعته (2005) ان استخدام تراكيز مختلفة من مستخلص حبوب اللقاح والبروبوليس (Propolis) (0 , 12.5 , 25 , 50) ملغم / مل وباستعمال DMSO (Dimethyl Sulfoxide) كمذيب يعمل على تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية المستزرعة *in vitro* (مزرعة خلايا K-562 ومزرعة الخلايا الوحيدة الانوية السرطانية) والمحضرة من نماذج الدم المحيطي للانسان وقد تراوحت نسبة التثبيط من (20%–83%) حسب التركيز المستخدم ويعمل المستخلص على تثبيط النمو في الخطوط الخلوية السرطانية .

2.1.3.2 الفعالية المضادة للبكتريا

تحتوي حبوب اللقاح على الزيوت الاساسية التي تمتلك قابلية تثبيطية لنمو العديد من الاحياء المجهرية فقد وجد Janssen (1986) ان مستخلص حبوب اللقاح يعمل على تثبيط بكتريا (*Escherichia coli , Staphylococcus aureus , Bacillus subtilis*) وبكفاءة عالية . كذلك وجد Boukraa وجماعته (2006) ان لحبوب اللقاح المخلوطة مع العسل فعالية مضادة لبكتريا *Staphylococcus aureus* إذ استخدم المزيج (حبوب اللقاح والعسل) بنسب 5 % و 19 % و 25 % مع الوسط الزرعي للبكتريا . يمتلك مستخلص حبوب اللقاح فعالية مضادة للبكتريا عند استخدام تراكيز مختلفة من المستخلص الايثانولي (من 40% الى 90%) وقد وجد ان المستخلص الايثانولي بتركيز 90% يعمل على تثبيط البكتريا (*Bacillus subtilis* , *Pseudomonas aeruginosa , Klebsiella sp.*) اكثر من بقية التراكيز باستعمال طريقة انتشار القرص (Carpes *et al.*,2007) .

3.1.3.2 حبوب اللقاح والمناعة

تحتوي حبوب اللقاح على العديد من المواد والمغذيات والعناصر التي تعمل على بعض التأثيرات في الجهاز المناعي (Stickl ,1980) . فقد وجد عند تجريع الفئران من المستخلص الفينولي لحبوب اللقاح يعمل على تثبيط الوذمة (Oedema) وتثبيط انتاج بروتين الـ Ovalbumin وتثبيط انتاج الكلوبيولينات المناعية IgG و IgE وتسبب انخفاض معدل هجرة كريات الدم الى القصبات التنفسية (Medeiros *et al.*,2008) . وبسبب الخصائص المضادة للألتهابات لحبوب اللقاح فانها تعمل على تثبيط نمو خلايا البروستات و تعمل على تثبيط فرط التنسج للبروستات الحميد (Benign prostatic hyperplasia) (Buck *et al.*,1990) . وجد ايضاً ان حبوب اللقاح تساعد في تقليل الحساسية إذ تثبط انتاج الهستامين الذي يسبب الالتهابات ففي احدى الدراسات وجد انه عند تناول اشخاص مصابين بالحساسية والحمى حبوب اللقاح يومياً يحصل لديهم تحسن بنسبة 75% (Alibriton , 2004).

4.1.3.2. التأثيرات الايضية لحبوب اللقاح

تحتوي حبوب اللقاح على الكثير من المواد المضادة للاكسدة والمغذيات الاخرى التي لها عدة تأثيرات ايضية في داخل جسم الكائن الحي وان لمستخلص حبوب اللقاح تأثيرات وقائية إذ يعمل على تقليل فعاليات GOT (Glutamate Oxaloacetate Transaminase) و GPT (Glutamate Pyruvate Transaminase) في مصل الدم للحيوانات التي تجرع المستخلص (Wojcicki *et al.* ,1985) .

وقد وجد Wojcicki وجماعته (1986) ان لمستخلص حبوب اللقاح تاثير علاجي في الارانب التي تعاني من مرض تصلب الشرايين والتي قد اعطيت المستخلص لمدة اكثر من 12 اسبوع وقد تبين ان محتوى الكوليسترول الكلي في المصل والكبد قد انخفض بنسبة 67 % و 45 % على التوالي , بينما ارتفعت مستويات البروتين الدهني العالي الكثافة للكوليسترول HDL - C (High Density Lipoprotein Cholesterol) في المصل و الفا البروتين الدهني (α- lipoprotein) بنسبة 19 % و 14.6 % على التوالي . بينما تبين ان مادة Isorhamnetin 3- O-rhamnosyl – glucoside الموجودة في حبوب اللقاح تعمل على تحفيز انتاج البروستوكلاندين G_1 (Prostaglandin – G_1) (Zhao *et al .,*1990) .

بين El-Desoky وجماعته (1995) تأثير حبوب اللقاح في ذكور واناث الجرذان إذ وجد ان لها تأثير مخفض لهرمون الشحمون الخصوي (Testosterone) في ذكور الجرذان اما في الاناث فتعمل الحبوب على تحفيز تحرير الهرمون المحفز للجريبات (Follicle stimulating hormone) والهرمون اللوتيني (Luteinizing hormone) , وفي دراسة لمعرفة التأثيرات الايضية لحبوب لقاح نبات *Phoenix dactylifera* على الجرذان التي اعطيت مزيج من عليقة صناعية وحبوب اللقاح بنسبة 2% و 4 % لمدة 35 يوما , اظهرت النتائج ارتفاع مستويات حامض الستيارك والاراكيدك واللجنوسيرك بالمقارنة مع مجموعة السيطرة (جرذان اعطيت عليقة صناعية فقط) (Al-Shgrawi , 1998) .

وجد Eraslan وجماعته (2009) ان تجريع الجرذان بجرعة 50 ملغم / كغم من المستخلص المائي لحبوب اللقاح يؤدي الى انخفاض مستويات الـ Creatinine وحامض اليوريك والبليروبين والبروتين الكلي في الدم .

2.2 دور النباتات في تثبيط الطفرة والوقاية من السرطان .

تؤدي مختلف أجزاء وأنواع بعض النباتات دوراً مهما في التقليل من حدوث الطفرات الوراثية والوقاية من الأورام السرطانية المختلفة وقد تم إثبات ذلك في عدد كبير من الدراسات والبحوث وباستخدام أنظمة اختبارية مختلفة من الأحياء المجهرية والكائنات الراقية وذلك لفهم الدور الحقيقي للنباتات سواء عند استخدامها بصورة طبيعية أو تحويلها إلى مستخلصات بمذيبات كيميائية مختلفة (Deflora and Ramel, 1988) .

وأظهرت الدارسات الوبائية العلاقة العكسية بين استهلاك الثوم (Garlic) ومعدل الوفيات عن طريق سرطان المعدة (Stomach Cancer) في المجتمعات الصينية وهذه الدراسات اقترحت دور الثوم في منع السرطان البشري (Lan *et al*., 1990) . كما تم استخدام النبات *Phyllanthus orbicularis* في علاج بعض الأمراض الفيروسية التي تصيب الإنسان والحيوان ولوحظ إن المستخلص المائي لهذا النبات يمتلك قدرة تثبيطية للمطفر m-phenylene diamine عند اختباره على بكتيريا *Salmonella typhimurium* (Ferrer *et al*., 2001).

كما استخدم المستخلص الكحولي لنبات *Murdannia* لاختباره كمضاد للطفرة والسرطان بأجراء اختبار الطفرة بالسالمونيلا ، إذ يعمل هذا المستخلص على تثبيط المطفر Azoxy methane وسرطان القولون في ذكور الجرذان خاصة خلال طور البدء من مراحل تطور السرطان (Intigot *et al*., 2002) .

كما يمتلك النبات *Serratula Strangulate* خصائص مضادة للسرطان ، إذ عزل منه أربعة أنواع من الستيرويدات (Steroids) التي أثبتت قدرتها مختبرياً كمواد مضادة للأكسدة ، فقد ساهمت تلك الستيرويدات في حماية خلايا الدم البيض للإنسان من التحلل الدموي التأكسدي المستحث بوسطة 2,2-azobis - 2- amindino propane hydrochlorine , أيضاً تعمل هذه الستيرويدات على تثبيط التأثير البيروكسيدي في خلايا كبد الجرذان المستحث بالجذور الحرة الهيدروكسيلية (Hydroxyl radical) (Cai *et al*., 2002) .

يمكن ان يتم التقليل من ضرر الأكسدة الذاتية بوساطة بعض المكونات الكيمياوية النباتية (Phytochemicals) المتواجدة في الغذاء ، إذ أثبت Polsa وجماعته (2004) أن لنبات الكركم (Tumeric) دور وقائي ضد تلف الـ DNA لخلايا الدم اللمفاوية في الإنسان المستحث بالمطفر Benzo [a] pyrene والذي يسبب كسور في شريط الـ DNA. وقد ذكر الجنابي (2004) أن مزيج مستخلصي نبات الثوم والحبة السوداء يمتلك فعالية كبيرة في تثبيط انقسام الخلايا

السرطانية لمرضى ابيضاض الدم النخاعيني المزمن فضلاً عن كون هذه المستخلصات تمتلك فعالية مضادة للتطفير , إذ قللت من السمية الوراثية الخلوية للمطفر Methotrexate .

كما اختبر تأثير مستخلصات نباتي *Maytenus , peltastes* في المادة الوراثية والذي يستخدمه البرازيليون في علاج العديد من الأمراض لمعرفة قدرتها كمضادات طفرة بإجراء اختبار ايمز على بكتيريا السالمونيلا لبعض المواد المطفرة مثل Aflatoxin B1 و2-nitrofluorene وSodium azide إذ لوحظ انخفاض معنوي في معدل الطفرة باستخدام المستخلصات المائية للنباتين أعلاه (Horn *et al.* , 2003) .

وأشار Malencic وجماعته (2000) إلى أن نبات *Salvia reflexa* يحتوي في مستخلصاته المختلفة على كميات كبيرة من حامض الـ Rosmarinic الذي يكسب هذا النبات الفعالية المضادة للأكسدة عند اختباره على الجذور الحرة لمركب DPPH (Dauksas *et al* ., 2001) . كذلك وجد ان مستخلص الشاي الاخضر يعمل على تثبيط نمو الخط الخلوي البشري لسرطان الثدي (MDA-MB231) *in vivo* في الفئران (Sartippour *et al.,* 2001) .

كذلك توصل Osakabe (2004) إلى أن مستخلص نبات *Perilla Frutescens* ذو فعالية مضادة للسرطان ، فقد حقنت الفئران بمادة Dimethybenz[a]anthracene لبدء السرطان ثم بمادة Tetradecanoyl Phorbol-13- Acetate , 12 وذلك لتحفيز السرطان، وبعد ذلك حقنت بـ 2 ملغم/كغم من المستخلص النباتي , إذ أشارت النتائج إلى انخفاض معنوي في سرطان الجلد لتلك الفئران . كما وجد Ibrahim (2005) ان المستخلصات المائية والكحولية لنبات الميرمية تأثيرا مثبطاً في نمو خطوط الخلايا السرطانية *in vitro* ومنها سرطان الحنجرة البشري وسرطان الغدد اللبنية للفأر.

وقد وجد الجريصي(2007) ان المستخلصات الخام لنوى وثمار تمر الزهدي *Phoenix dactylifera cultivar Zahdi* تمتلك فعالية تثبيطية في نمو بعض الخطوط الخلوية السرطانية *in vitro* .

3.2. دور العناصر والمركبات في الغذاء في تثبيط الطفرة والوقاية من السرطان

يوجد عدد كبير من العناصر والمركبات المهمة الموجودة في الاغذية والتي تكمن فائدتها في الحماية من الطفرة والوقاية من الأورام السرطانية المختلفة , وتتوزع هذه العناصر والمركبات ضمن عدد من النباتات الطبية والخضر والفواكه والمنتجات الغذائية الأخرى ، ففي دراسة قام بها Azuine وجماعته (1992) تضمنت التحري عن قدرة أربع كاروتينات وهي الكانازانثين والبيتاكاروتين و-8 apo-btacarotenal , 8-apo-beta Carotenal merhylester موجودة في زيت النخيل (Palm oil) واثبت دورها في إخماد المطفرين *benzoalphrene* و *1-methyl - 3-Nitrosoguanidine* عند إجراء اختبار ايمز باستخدام السلالة TAl00 لبكتيريا السالمونيلا .

ويعد فيتامين E عنصراً مهماً وله دور مميز في الإخصاب وعامل مضاد للالتهاب (Anti - inflammatory) كما يمتلك أهمية كمضاد للتطفير والتسرطن (Flodin , 1988) .

ويمتلك حامض الأسكوربك (Ascorbic acid) القدرة على تثبيط المطفرات الكيميائية إذ أشار Siddique وجماعته (2007) إلى قدرة فيتامين C إلى تقليل فعالية المطفر Norethynodrel نتيجة لتفاعله معه ومن ثم التقليل من فعاليته كمستحث للتشوهات الكروموسومية . وايضاً وجد ان فيتامين E و A يعملان على تقليل التحلل في الـ DNA المستحث بوساطة Benzo[a]pyrene في خلايا الدم البيض في الفئران وكذلك التقليل من التشوهات الكروموسومية التي يسببها ذلك المركب (Sram *et al.,* 2009) .

وللعناصر المتواجدة في الأغذية دور في الوقاية من السرطان ، إذ يعد الكالسيوم Calcium عامل مضاد لتعزيز (antipromoter) الورم السرطاني في القولون اتجاه المسرطنات (Lapre , 1992) , كذلك السيلينيوم من العناصر الغذائية المهمة في الثدييات إذ يدخل في تركيب العديد من الانزيمات ومن ضمنها انزيم Glutathione peroxidase وقد وجد ان نقصه يسبب بعض الاورام السرطانية في الجرذان (Nishimura *et al*., 2001) . ويعد مركب Apigenin وهو احد الفلافونيدات عاملا مهما في تثبيط الخطوط الخلوية السرطانية لابيضاض الدم النخاعيني وسرطان القولون البشري *in vitro* من خلال تأثيره على الانزيمات المسئولة عن انتقال الخلايا من طور النمو الثانوي (Secondary Growth) الى طور الانقسام الخلوي ومن ثم تبقى الخلية متوقفة في طور النمو الثانوي لتدخل الخلايا بعدها الى مرحلة الموت الخلوي المبرمج (Wang *et al*., 2000) . كذلك وجد Liu وجماعته (2000) ان مركبات Procyanidins التي توجد في حبات العنب لها دور مضاد للاكسدة اذ تعمل كسح الجذور الحرة التي قد تسبب السرطان . ان فعالية

المركبات الفينولية ومنها الفلافونيدات (Flavonoids) تتمثل بامتلاكها فعالية مضادة للاكسدة اذ تعمل على ازالة الجذور الحرة المتولدة وتوجه الخلية للدخول في مرحلة الموت الخلوي المبرمج ومن الامثلة على الخلايا السرطانية التي تكون حساسة للمركبات الفينولية هي خلايا سرطان الحنجرة البشري Hep-2 وخلايا سرطان عنق الرحم والقولون وسرطان البروستات البشرية *in vitro* (Forkman and Martens, 2001) . وان مركبات نبات الزنجبيل Gingerol ، Paradol لها تأثير مثبط في حيوية وتصنيع الـ DNA في الخطوط الخلوية لابيضاض الدم النخاعيني *in vitro* (Tjendraputra *et al.*,2001) .

تؤثر المركبات الفينولية المتعددة أيضاً وخاصة منها المركبات الفينولية المضادة لعملية الأكسدة (Antioxidant) في نمو الخلايا السرطانية بشكل كبير بسبب امتلاكها القابلية على تنظيف (Scavenging) الجذور الحرة المتولدة عند تحول الخلايا الطبيعية إلى خلايا سرطانية, ومن بين الخطوط الخلوية السرطانية *in vitro* التي تثبطها تلك المركبات هي : HEP-2 و BC1 و CASK1 و DV145 (Lopez –Lazaro , 2002) .

يلعب مركب الـ Lycobetaine وهو مركب قلويدي موجود في النبات *Lycaris radiate* دوراً مهماً له في معالجة سرطان عنق الرحم والمبايض والمعدة فضلا على قابليته على التأثير في الخلايا السرطانية خارج الجسم الحي مثل الخط الخلوي لسرطان الدم , وسرطان الرئة ويقوم هذا المركب بتثبيط فعالية كل من Topoisomerase I , II ويوقف عملية انقسام الـ DNA Tang (2003 , *et al.*) . وقد أظهرت مركبات الـ Isoflavones المستخلصة من بعض النباتات القابلية على تقليل أصابة ذكور الجرذان بسرطان البروستات عند حقنها بالمادة المسرطنة 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine مرتين في الأسبوع بجرعة 200 ملغم / كغم من وزن الحيوان (Atsuya *et al* ., 2004)

كذلك يؤدي مركب Astylsalicin المشتق من الـ Salicin وهو احد الكلايكوسيدات الفينولية والموجود في بعض المستخلصات النباتية مثل الصفصاف دور مهم في تثبيط نمو الخلايا السرطانية *in vitro* (Drew *et al*., 2005) , ويؤدي مركب Quercetin الموجود في العسل دور مهم كمثبط للنمو في الخط الخلوي السرطاني HL-60 (Mandal and Jaganathan ,2009) .

4.2. السايكلوفوسفامايد Cyclophosphamide

يعتبر عقار السايكلوفوسفامايد شكل (2-1) من مثبطات النمو ويستخدم في حالات زرع الأعضاء وذلك كمثبط للمناعة ويستخدم بصورة واسعة كعامل مضاد للتطفير، إذ يتطلب هذا العقار تنشيط أيضي إلى 4 - hydroxy Cyclophosphamide لتظهر فعاليته وهو يمتلك عدة أشكال تأيضية أخرى مثل aldophosphamide وPhosphoramide mustard (Kwon *et al* , 1987) . ولا يتواجد بصورة حرة في الطبيعة (Iarc, 1975) وهو أستر فوسفامايد حلقي للميكلورايثامين Acyclic Phosphamide Ester of Mechlorethamine , وهذا التحوير سمح بإستخدامه في معالجة الأنسجة المصابة بالأورام بدلاً من عوامل المعالجة الكيميائية الأخرى المكتشفة (Haskell, 1990) . وأشار العديد من الدراسات إلى أن السايكلوفوسفامايد والعديد من العوامل العلاجية الكيميائية تسبب حدوث طفرات جينية وكسور كروموسومية وإعادة ترتيب الكروموسومات في الخلايا الجسمية فضلاً عن زيادة تكرار الأورام الثانوية المرتبطة بالمعالجة في الاشخاص المصابين بالسرطان (Ben-Yehuda *et al*., 1996) .

أما من ناحية ارتباطه بالـ DNA فقد بين Pieper وجماعته (1989) إن العقار له القدرة على الارتباط التساهمي مع مجموعة N_7 الخاص بقاعدة الجوانين ومن ثم إيقاف الاستنساخ في هذه المواقع بتأثير القنوات المتكونة بين العقار وشريط الـ DNA فيشفر عن ذلك جزيئات RNA كبيرة منفصلة ومتميزة .تتحدد فعالية العقار بعدد من العوامل والظروف منها تأثره ببعض المواد ، إذ تزداد فعالية العقار بواسطة مادة الاكرولين (Acrolein) وبذلك يستطيع العقار تعزيز الاستجابة المناعية في داخل جسم الكائن الحي *in vivo* و خارجه *in vitro* عن طريق تثبيط توالد خلايا T المساعدة (Kawabata and White , 1988), وتقل فعالية العقار بتأثير بعض المواد إذ يعمل فيتامين K و C على اختزال قوة العقار وسميته لا سيما إذا أعطيت هذه الفيتامينات قبل العقار للفئران المصابة بسرطان الكبد (Taper *et al* ., 1987) . وقد أشار Kwon وجماعته (1987) إلى قدرة الألبومين الموجود في بلازما الإنسان في التعجيل من تحلل 4 - hydroxy Cyclophosphamide وهو أحد الأشكال الفعالة للعقار وبالتالي التقليل من فعاليته وسميته ضد الخلايا السرطانية L1210 *in vitro* .

هذا ويؤدي السايكلوفوسفامايد إلى عدد من التأثيرات الوراثية والفسيولوجية إذ يحث العقار على تولد ابيضاض الدم الخاعيني في الإنسان (Harris, 1979) . كذلك يعمل العقار على كسر أشرطة الـ DNA من نوع كسر الشريط المفرد (Single strand break) وربط أشرطة الـ DNA

فقد توصل Crook وجماعته (1986) إلى قدرة العقار على التأثير السمي وربط أشرطة الـ DNA بنوعين هما ارتباط تصالبى بين الـ DNA والبروتين (DNA- protein cross link) وارتباط تصالبى بين شريطي الـ DNA في خلايا كبد الجرذ والخلايا البشرية السرطانية K562 عند إضافة العقار إلى الوسط الزرعي لكلا النوعين من الخلايا وتنشيطه بواسطة الاكرولين ، كذلك يعمل العقار على ربط أشرطة الـ DNA بنوعين هما ارتباط تصالبى في نفس شريط الـDNA وارتباط تصالبى بين شريطي الـ DNA عند تعريض أجنة الجرذ بعد عشرة أيام من غرسها إلى 4 - hydroxy Cyclophosphamide و Phosphoramide mustard وهما الشكلان الفعالان للعقار (Litte and Mirkes, 1987) (كما توصل Pillans وجماعته (1989) إلى إن تعريض الفئران الحوامل لجرعات من العقار في اليوم الحادي عشر من الحمل يؤدي إلى كسر أشرطة الـ DNA في رأس الأجنة أثناء تطور الجنين .

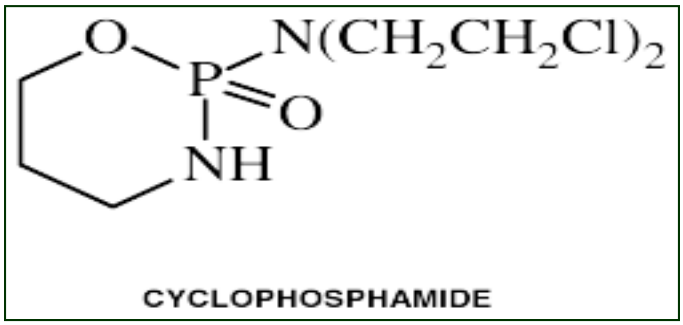
ويؤدي العقار إلى كسر وربط أشرطة الـ DNA في الخلايا اللمفاوية لأشخاص مصابين باللوكيميا المزمنة وفي خلايا الفئران المصابة بابيضاض الدم النخاعيني المزمن فضلاً عن خلايا نقي العظم للفئران الطبيعية (Deneve *et al* .,1989) ، كما ويؤثر العقار في الخلايا الجنسية إذ يعمل على ربط أشرطة الـ DNA بنوعين هما ارتباط تصالبى بين شريطي الـ DNA ارتباط تصالبى في نفس شريط الـ DNA في الخلايا الجنسية لمبيض الجرذ وفي الوقت نفسه يغير من تركيب ووظيفة المبيض من خلال تأثيره على الخلايا الحبيبية التي تعد هدفاً مناسباً مؤدياً بذلك إلى صغر قطر الحويصلات المبيضية وعددها (Ataya *et al* ., 1989) . كذلك يعمل العقار على التبادل الكروماتيدى الشقيقى فلقد أشار Wilmer وجماعته (1986) إلى دور متايضات العقار 4 - hydroxy Cyclophosphamide و Phosphoramide mustard في زيادة تكرار التبادل الكروماتيدى الشقيقي في الخلايا الليمفاوية للإنسان في الوسط الزرعي ، وفي دراسة أجريت داخل الجسم *in vivo* بينت تأثير العقار في أحداث التبادل الكروماتيدى الشقيقي لخلايا كبد الجرذ (Eckl *et al* ., 1987) ، كما أشار Lugo وجماعته (1989) إلى قدرة العقار على حث التبادل الكروماتيدى الشقيقي في نقي عظم الفئران .

يعطى السايكلوفوسفامايد بوصفه علاجاً مساعداً مع عقار 5-florouracil وعقار Methotrexate بعد إجراء العملية الجراحية لاستئصال سرطان الثدي وقد اظهر نتائج جيدة عند

استخدامه لمعالجة مرض ابيضاض الدم وسرطان عنق الرحم وسرطان المبيض (Michael , 2004).

1.4.2 الخصائص الفيزيائية و الكيميائية Chemical and Physical Properties

السايكلوفوسفامايد بلورات صلبة بيضاء اللون ، عديمة الرائحة ،ذات طعم مر لاذع نوعاً ما، درجة انصهاره 49.5–53 °م، يتميع عند فقدانه لماء تبلوره ،حساس للتعرض للضوء والرطوبة والأكسدة ، يذوب في الماء المقطر بنسبة 25:1 ، ويذوب في الكحول بنسبة 1:1 ، وهو قليل الذوبانية في البنزين والكلوروفورم وقليل الذوبانية جداً في الإيثر والأسيتون (Lewis,1997 ; Lewis , 1993). الوزن الجزيئي للعقار هو 261.10 دالتون والصيغة الجزيئية له هي C_7-H_{15}-Cl_2-N_2-O_2-P (Budavari,1989) .



شكل (1.2) التركيب الكيميائي للسايكلوفوسفامايد عن (Saly,2002)

5.2. التحليلات الوراثية الخلوية Cytogenic Analysis Assaies

1.5.2. اختبار معامل الانقسام MI (Mitotic Index Assay) .

يمثل معامل الانقسام MI نسبة عدد الخلايا المنقسمة في المراحل الانقسامية المختلفة إلى العدد الكلي للخلايا ، ويستخدم معامل الانقسام لبيان التأثير السمي الوراثي للعوامل الفيزيائية

والبيولوجية في الخلايا ، فغالباً ما تؤثر العوامل المطفرة والمسرطنة (Carcinogenic and Mutagenic agents) في عدد الانقسامات ومعامل الانقسام (Stich and Sana , 1981) .

وقد تم استخدام هذا الاختبار في دراسات عديدة ففي دراسة أجريت على بعض الأشخاص المدخنين وغير المدخنين لوحظ زيادة معنوية في معامل الانقسام لخلايا الدم للأشخاص المدخنين (Hasgafvel , 1987) , وفي دراسة أخرى للكشف عن القدرة التطفيرية والتسرطنية لبعض المبيدات لوحظ حصول تثبيط في معامل الانقسام للخلايا اللمفاوية للإنسان نتيجة المعاملة بالمبيدات الفسفورية العضوية (Sobti *et al*., 1982) . كذلك أشار EL-Nahas وجماعته (1988) إلى قدرة المبيد Curacron داخل جسم الكائن الحي إلى تثبيط معامل الانقسام لخلايا نقي العظام (Bone Marrow Cells) في الفئران المعاملة بالمبيد ، كما يستخدم هذا الاختبار للكشف عن القدرة السمية و التطفيرية لبعض العقاقير الطبية فقد أشار Littlefield وجماعته (1980) إلى تأثير عقار المايتومايسين C في تثبيط معامل الانقسام في الخلايا اللمفاوية للإنسان . كما استخدم هذا الاختبار للكشف عن التأثير المطفر والسمي الخلوي لبعض النباتات الطبية الهندية مثل *Maytenus ilicifolia* و *Bauhinia canolicans* باختبار المستخلص المائي لهذين النباتين على نظامي خلايا القمم النامية في جذور البصل وخلايا نقي العظم لم يؤدَّ المستخلص إلى انخفاض معنوي في MI إذ كان الانخفاض ضعيف جدا مقارنة بالسيطرة السالبة باختباره على خلايا القمم النامية في جذور البصل ، كذلك أعطى زيادة ضعيفة جدا وغير معنوية باختباره على خلايا نقي العظم (Marjori *et al* ., 2001) .

كذلك بين Ataya وجماعته (1989) تأثير عقار السايكلوفوسفامايد في الخلايا الحبيبة لمبيض الجرذ وتثبيطه معامل الانقسام لخلايا نقي العظم عند الكشف عن القدرة السمية والتطفيرية لهذا العقار . وفي دراسة لمعرفة مدى تأثير جرعات مختلفة من المايتومايسين C في خلايا نقي العظم للفئران تبين ان الجرعة 4 ملغم / كغم من العقار تسبب انخفاض ملحوظ في قيمة معامل الانقسام (Podder *et al.,* 2008) .

2.5.2. اختبار التشوهات الكروموسومية Chromosomal Aberration Assay

يمكن أن تحصل التغيرات الكروموسومية أما نتيجة لحدوث كسر في أحد الكروماتيدين أو كلاهما ويعتمد نوع التغير على موقع الكسر أو إعادة ترتيب اشرطه الـ DNA بصورة تختلف عن حالتها الطبيعية فينتج نقصا أو تضاعفاً (Evans and Oriordan 1975) .وهناك بعض الفرضيات التي توضح حدوث مثل هذه التغيرات منها تأثير هذه العوامل يظهر عن طريق التحطيم

المباشر للعمود الفقري لـ DNA بفعل الأشعة المؤينة (ionizing radiation) أو النظائر المشعة (Radioisotopes) أو يحدث التأثير نتيجة لحدوث التشوهات في الحلزون المزدوج للحامض النووي DNA والناتج عن المواد الداخلة بين شريطي الـ DNA (Shubber and AL-Allak , 1986 ; Crook *et al* ., 1986) . ويتم الكشف عن التغيرات الكروموسومية في الخلايا التي في الطور الاستوائي (Metaphase) من دورة انقسام الخلية (Bauchinger *et al.* , 1983) .

إذ تحدث التغيرات تلقائياً (Spontaneous) ، أو بواسطة أي عامل يؤثر على التكامل الطبيعي للكرموسومات أو على ميكانيكية حركتها خلال الانقسام الخلوي أو كلاهما لذا فأن العديد من ملوثات البيئة ومواد مكافحة المبيدات أو المواد المضافة للأغذية والمخدرات والمنبهات وغيرها من المواد ذات السمية للخلايا لها القدرة على أن تكون مواد مطفرة وتمتلك القدرة على استحثاث التغيرات الكروموسومية (Chromosomal Aberration) لذلك يعد هذا الاختبار من الاختبارات المهمة في هذا المجال (Malh and Grover, 1987) .

لقد استخدام هذا الاختبار للكشف عن التأثيرات الوراثية الناجمة عن المواد الكيميائية المستخدمة في بعض الصناعات ، فقد توصل Al - Hakkak وجماعته (1986) إلى وجود زيادة معنوية عالية في معدل التغيرات الكروموسومية لعمال معمل صناعة البطاريات في بغداد وأوضح إن هذه الزيادة مرتبطة بالتعرض لأوكسيد الرصاص أثناء عملية الخلط , كذلك يستخدم هذا الاختبار للكشف عن القدرة التطفيرية لبعض المبيدات إذ أشار الباحثان Behera و Bhunya (1988) إلى قدرة المبيد Monocrotophes في إحداث التغيرات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفأر السويسري .

كما استخدم الاختبار للكشف عن القدرة التطفيرية لبعض العقاقير الطبية ولا سيما تلك المستخدمة في علاج السرطان ، فقد بين Miura وجماعته (1983) قدرة العقار مايتومايسين C على حث تكوين التغيرات الكروموسومية في الخلايا الليمفاوية ، كذلك أشار Pillans وجماعته (1989) إلى قدرة عقار السايكلوفوسفامايد في إحداث التغيرات الكروموسومية لكسور أشرطة الـ DNA في النسيج الرأسي لأجنة الفأر.

لقد وجد Abou-Tarboush وجماعته (1999) انه عند حقن 4 ملغم / كغم من المايتومايسين C في التجويف البريتوني في ذكور واناث الفئران تسبب حدوث انحرافات كروموسومية في خلايا نقي العظم بعد (12 , 24 , 48 , 72 , 84 , 96) ساعة من الحقن وكذلك تحدث

انحرافات كروموسومية للاجنة بعمر 13 يوم عند اناث الفئران الحوامل بجرعة 6 ملغم / كغم من العقار بعد 24 ساعة من الحقن .

وفي دراسة اجراها Muneera وجماعته (2000) على 193 من الازواج السعوديين الذين يعانون من اجهاض متكرر وجد تشوهات كروموسومية مختلفة تراوحت بين تشوه كروموسومي من نوع انتقال متبادل (Reciprocal translocation) وانتقال روبرتسونيا (Robertsonia translocation) وانقلاب كروموسومي (Inversion) وكروموسوم جنسي احادي موزائيكي (Mosaic X- chromosme monosomy) . وقد بين Prabhu و جماعته (2004) تأثير اشعة كاما بوجود مادة (2-Deoxy Glucose) التي تعمل كمادة واقية في الخلايا اللمفية حيث ان المعاملة باشعة كاما للخلايا الدموية المزروعة بجرع 1.0 الى 3.0 كري في الدقيقة تسبب حدوث تشوهات كروموسومية تركيبية متعددة وتنخفض هذه التشوهات بوجود مادة (2-Deoxy Glucose) .

6.2 اختبار تحلل الـ DNA DNA Fragmentation Test

يعد الـ DNA من الجزيئات الحياتية التي تتأثر بالعديد من العوامل الكيميائية والفيزيائية التي قد تسبب له العديد من التحويرات الكيميائية مثل تكسير الشريط المزدوج الى شريط مفرد وتكوين الوحدات الثنائية للبيرميدين (Pyrimidine dimmers) والتجزؤ الى قطع نيوكليوتيدية متعددة (Kumari *et al.,* 2008) .

تؤدي المستخلصات النباتية دوراً مهماً في منع الطفرة ومنع الحاق الضرر بالـ DNA بوساطة حمايتها او عن طريق تنشيط انظمة الاصلاح في الخلية وبذلك تعمل كمضادات حيوية للمطفرات (Junshi , 1992) . ففي دراسة لمعرفة تأثير نبات *Alpinia oxyphylla* على اورام الجلد في اناث الفئران تبين ان المستخلص الميثانولي للنبات يعمل على تجزؤ الـ DNA للخلايا الورمية بعد ترحيل الـ DNA المستخلص بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي بالهلام ويدخل الخلايا الى مرحلة الموت المبرمج (Lee *et al.*,1998) .

وفي دراسة اخرى بينت ان الاشعة فوق البنفسجية (Ultraviolet ray) تستحث على ظهور اعراض الموت المبرمج للخلايا من خلال حدوث تجزؤ للـ DNA فعند تعريض خلايا الطحال (Splenocytes) بالاشعة فوق البنفسجية في الجرذان واستخلاص الـ DNA منها لوحظ ظهور مسحة كبيرة من الـ DNA باستخدام تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي بعد 24 ساعة من المعاملة

بالاشعة فوق البنفسجية (Radziszeuska *et al* ., 2000) . تسبب الاشعة المؤينة العديد من التغيرات التركيبية والكيميائية في الاحماض النووية فعند تعرض الجرذان بجرعة من اشعة كاما مقدارها 6 كري تسبب تجزؤ في الـ DNA والـ RNA في خلايا الكلية (Slovinska *et al* ., 2001) , عند حقن الجرذان بجرع من الكادميوم 1.5 و 3.0 ملغم / كغم في منطقة التجويف البريتوني لوحظ بعد 4 ايام من المعاملة حدوث تجزؤ في الـ DNA المستخلص من خلايا التوثة عن طريق تقنية الترحيل الكهربائي بالهلام ونفس هذه النتائج حصلت على خط خلايا T في الانسان وتوثة الفأر (Krichah *et al* .,2003) .

تعد تقنية الترحيل الكهربائي للخلايا المفردة (Single Cell Electrophoresis gel) او اختبار كمت (Comet assay) من الطرق المهمة للكشف عن التجزؤ والاضرار في الـ DNA ففي دراسة اجريت على 24 شخص تضمنت 12 امرأة مصابة بسرطان العنق و 7 نساء من الحوامل و 5 نساء طبيعية كمجموعة سيطرة إذ بينت نتائج التحليل ان اطوال الذنب للـ DNA كانت اطول في المرضى المصابين بسرطان العنق ومستويات عالية من الضرر في الاعمار من 41 – 45 سنة (Gandhi and Singh , 2007) .

بين Tang وجماعته (2008) تأثير مادة Simustine في الخلايا المسرطنة في الانسان بوساطة الترحيل الكهربائي بهلام الاكاروز إذ ان هذه المادة تعتبر مادة مضادة للسرطان وبينت النتائج على ان اعلى تجزؤ للخلايا السرطانية يحصل بعد 8 ساعات من المعاملة بهذه المادة . وقد وجد Moura وجماعته (2008) ان للمستخلصات النباتية تأثير على تجزؤ الـ DNA فقد بين ان مستخلصات نبات *Clusia alata* المعاملة للفئران بجرعات عالية لها تأثيرات مطفرة فعندما تحقن بتركيز 2000 ملغم / كغم من المستخلص تسبب اضرار عالية في DNA الفئران ويظهر الـ DNA بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الهلامي على شكل مسحة كبيرة .

7.2 اختبار التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية Sperms Head Abnormality Assay

يعتمد هذا الاختبار على التغيرات الحاصلة في الشكل الخارجي (Morphology) لرأس الحيوان المنوي (Sperm head) كدليل لمعرفة التأثير المطفر والمسرطن للمواد المختلفة إذ وجد ان المواد المطفرة والمسرطنة تسبب ارتفاع نسبة التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية (Trevino *et al* ., 2004) .

في دراسة حول تأثير الإعطاء طويل الأمد للـ Triptolide (وهو عبارة عن Diterpene tripoxide يعزل من بعض النباتات الصينية ويستخدم كمادة مانعة للحمل من خلال منعها لتكوين النطف عند الرجال) في عملية تكوين النطف والخصوبة لذكور الجرذان ، تبين ظهور تشوهات واضحة على النطف مثل انفصال الرأس عن الذيل وحدوث عدم تكثف كروماتيني قبل النضج لأنوية النطف وغياب كامل في الأغشية البلازمية للقطعة الوسطية للنطف مع اختلالات تنظيمية في أغشية المايتوكوندريا وتجمع لذيول النطف (Hua *et al*., 2000).

وفي دراسة للباحث Aguilar وجماعته (2002) لمعرفة مدى تأثير العلاج المزمن بالسايكلوفوسفامايد على الخلايا الجنسية في ذكور الفئران وجد أن السايكلوفوسفامايد يسبب قلة في عدد الحيوانات المنوية وبطئ في حركتها وعدم التخصيب وكذلك وجد أن العلاج بالسايكلوفوسفامايد يختزل عدد الجينات في الخلايا الجنسية وهذا يظهر بوضوح عند التعرض المزمن للسايكلوفوسفامايد إذ ينخفض مستوى التعبير الجيني للجينات المسئولة عن الصفات المظهرية للحيوانات المنوية . وللكشف عن تأثيرات الفورمالديهايد فقد بين Tang وجماعته (2003) انه عند حقن ذكور الفئران في التجويف الخلبي بجرع (0.2 , 2 , 20) ملغم /كغم من الفورمالديهايد فانه يسبب تشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية وتزداد هذه التشوهات بإزدياد الجرعة .

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

الفصل الثالث

3. المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3. المواد Materials

1.1.3. المواد الكيميائية المستعملة في التجربة

ت	المادة	الشركة المنتجة
1	ثنائي اثيل ايثر Diethyl Ether	BDH (England)
2	ايثانول Ethanol	BDH (England)
3	كلوريد البوتاسيوم (KCl) Potassium chloride	BDH (England)
4	كلوريد الصوديوم (NaCl) Sodium chloride	BDH (England)
5	فوسفات الصوديوم احادية الهيدروجين Na_2HPO_4	BDH(England)
6	اوكزالات البوتاسيوم Potassium Oxalate	BDH (England)
7	حامض الخليك الثلجي Glacial Acetic Acid	BDH(England)
8	فوسفات البوتاسيوم ثنائية الهيدروجين KH_2PO_4	BDH(England)
9	حامض الهيدروكلوريك Hydrochloric Acid HCl	BDH(England)
10	فورمالين Formalin	BDH(England)
11	ملون جمزا Giemsa stain	Sigma (USA)
12	ميثانول Methanol	BDH (England)
13	الكولجسين Colchicine	Kahira (Egypt)
14	سايكلوفوسفامايد Cyclophosphamide	Baxter(Germany)
15	الاكاروز Agarose	Sigma (USA)
16	سكروز Sucrose	BDH (England)
17	ايزوبروبانول Isoprobanol	BHD (England)
18	Genomic DNA Purification Kit	Promega (USA)
19	محلول TBE Solution TBE	Promega (USA)
20	ملون بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide Stain	Promega (USA)
21	ملون البروموفينول الزرقاء Bromophenol blue stain	Sigma (USA)
22	DNA اللامدا المقطع بالانزيم القاطع *Hin* d III	Promega (USA)
23	هكسان Hexane	BDH (England)
24	كلوروفورم Chloroform	BDH(England)
25	بنزين Benzene	BDH (England)
26	بتروليوم ايثر Ether Petrolum	BDH (England)

2.1.3 . الأجهزة والمستلزمات المستعملة في التجربة

ت	الجهاز	الشركة المصنعة
1	صفيحة ساخنة Hot Plate	Glassco (India)
2	حاضنة Incubator	GallenKamb (England)
3	خلية الترحيل الكهربائي Electrophoresis Cell	Labnet (Taiwan)
4	مصدر تيار كهربائي Power Supply	Labnet (USA)
5	مصدر الضوء فوق البنفسجي UV-Transliminator	Labnet (USA)
6	مصدر الضوء المرئي Visible Light	Labnet(USA)
7	مجهر ضوئي Microscope	HumanScope (Germany)
8	ميزان Balance	Sartorius (Germany)
9	مقياس الأس الهيدروجيني pH meter(pH)	Shimadzu (Japan)
10	جهاز المؤصدة Autoclave	AllAmerican (USA)
11	فرن Oven	QL- Lab.Chicago
12	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	Hermle (Germany)
13	حمام مائي Water Path	Labtech (Korea)
14	صفائح السيلكاجل (TLC) Silica Gel Plate	Sigma (USA)
15	جهاز المبخر الدوار Rotary Evaporator	Buchi (USA)
16	خلاط كهربائي Blender	TJL ASSCO (India)
17	جهاز المازج الدوار Vortex	VWR (India)
18	جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer	Shimadzu (Japan)
19	ماصة باستور Pasture Pipette	Brand (Germany)
20	ورق ترشيح Filter Paper	Ahlstrom (USA)
21	شاش طبي Medical Goss	Kahira (Egypt)
22	كاميرا رقمية Digital Camera	Sony (Japan)
23	ماصة دقيقة Micropipette	Brand (Germany)

3.1.3. مصدر المستخلص

أستخدمت حبوب لقاح نحل العسل شكل (3–1) المتجمعة من اصول نباتية مختلفة وتم جلبه من العديد من النحالين في محافظة كربلاء ومحافظة بابل.

شكل (3–1) حبوب لقاح نحل العسل

4.1.3. حيوانات التجارب

استخدمت في هذه الدراسة ذكور الفئران البيضاء السويسرية (*Mus musculus* L.) Swiss mice من سلالة BALB- C البالغة والتي تراوحت اعمارها بين 8–10 اسابيع والتي تم الحصول عليها من معهد ابحاث الاجنة وعلاج العقم التابع لجامعة النهرين في بغداد ومن مركز الرقابة الدوائية في بغداد وتم تربيتها في اقفاص معدنية اعدت لهذا الغرض في البيت الحيواني التابع لجامعة كربلاء– كلية التربية تحت ظروف مسيطر عليها من ماء وتهوية مناسبة وغذاء مكون من العليقة الحيوانية وحسب حاجتها, ودرجة حرارة (25–30)°م واعتمدت الاضاءة الاصطناعية طوال مدة التجربة بواقع 14 ساعة ضوء و 10 ساعات ظلام.

تركت الحيوانات فترة سبعة ايام لكي تتأقلم مع الظروف المشار اليها اعلاه قبل اجراء التجارب .

2.3. طرائق العمل Methods

1.2.3. تحضير المستخلص النباتي

حضر مستخلص حبوب لقاح نحل العسل ، حسب طريقة Sato وجماعته (1990) مع بعض التحوير وكما يلي : تم اخذ وزن محدد من الحبوب الجافة وخلطه بمعدل 1 غم من الحبوب : 3 مل من محلول الاستخلاص (1 كحول مثيلي : 4 ماء مقطر ,V / V) , وتم مجانسته بواسطة خلاط كهربائي (Blender) ولمدة نصف ساعة بدرجة حرارة الغرفة , رشح المحلول الناتج بواسطة قماش شاش للحصول على الراشح وركز باستخدام المبخر الدوار (Rotary Evaporator) ووضع في الحاضنة على درجة حرارة 50 م^0 لمدة 24 ساعة للحصول على المستخلص الجاف, حفظ المستخلص في مكان جاف لحين الاستخدام .

2.2.3. توصيف المستخلص النباتي بوساطة كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة TLC (Thin Layer Chromatography)

نشطت صفائح السيليكاجل بوضعها في الفرن لمدة ساعة عند درجة حرارة 105 م^0 وتم وضع حجم ما يقارب (100 , 300 ,500) ميكروليتر من المستخلص بعد اذابته بنفس الطور السائل المستخدم (بنسبة 1غم من المستخلص لكل 3 مل من المذيب) عند قاعدة الصفيحة , إذ استخدمت ثلاث انظمة من المذيبات كطور سائل لعملية الفصل وهي:

1- بتروليوم ايثر :ميثانول:بنزين:كلوروفورم , بنسب حجمية 1:1:1:1 .
2- ايثر :ايثانول:كلوروفورم:بنزين , بنسب حجمية 1:1:1:1 .
3- هكسان:ايثانول:كلوروفورم , بنسب حجمية 1:1:1 .

تم مراقبة عملية ارتفاع الطور السائل على الصفائح حتى وصوله بالقرب من الحافة العليا ، إخرجت الصفائح من الحوض وتركت لفترة معينة بدرجة حرارة الغرفة إلى أن تجف وأجريت عملية الفحص تحت الضوء المرئي والأشعة فوق البنفسجية وتم تصويرها بوساطة كاميرا رقمية (1993 Vekiari *et al* .,) , إذ تم تحديد عامل الاعاقة R_f (Retardation Factor) للحزم المتكونة بالإضافة إلى اللون وعدد تلك الحزم مع العلم بأن:

الـ R_f = المسافة التي قطعتها الحزمة / المسافة التي قطعها الطور السائل

3.2.3. أختبار الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين (β-carotene Spray Method)

أجريت عملية اختبار الفعالية المضادة للأكسدة على صفائح الـ TLC بأستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين المشار اليها من قبل Pratt و Miller (1984) , فقد أذيب 9 ملغم من البيتاكاروتين في 30 مل من الكلوروفورم ثم أضيف الى الخليط قطرتين من حامض اللينوليك Linoleic acid) (النقي و 60 مل من الايثانول , وتم رش هذا الخليط على صفائح الـ TLC وبعد عملية الرش عرضت الصفائح الى الضوء العادي حتى تم قصر لون الارضية (2-6 ساعات) , ان الحزم التي تحتفظ باللون الاصفر لأطول فترة ممكنة تمثل مكونات مضادة للأكسدة بحيث تتناسب كثافتها اللونية مع الفعالية .

4.2.3. تحديد الجرعة المثلى للسايكلوفوسفامايد

تم استخدام الجرعة المثلى للسايكلوفوسفامايد وهي الجرعة التي تمتلك قوة تطفيرية عالية بحيث تتناسب مع وزن الفأر والمتمثلة بـ 20 ملغم/كغم من وزن الجسم (Shubber , 1981) .

5.2.3. تحضير المحاليل

1.5.2.3. المحاليل الخاصة بالتحليلات الوراثية

1.1.5.2.3. محلول السايكلوفوسفامايد Cyclophosphamide Solution

حضر باذابة حبة (50) ملغم من السايكلوفوسفامايد في في 1 مل وجرع كل حيوان 50 مايكروليتر فموياً والتي تمثل الجرعة المثلى للتطفير .

2.1.5.2.3. محاليل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح Pollen grain Solution

تم تحضير ثلاثة جرع 5 و 15 و 30 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح بعد اذابة الوزن المناسب بالنسبة لوزن الفأر في 1 مل من الماء المقطر واعطيت الجرع فموياً (British herbal pharmacopeia ,1983).

3.1.5.2.3. محلول الكولجسين Colchicine Solution

اذيبت حبة واحدة بتركيز (0.5) ملغم من الكولجسين في 0.5 مل من الماء المقطر للحصول على جرعة 10 ملغم/كغم واستخدم المحلول آنيا .(Yaseen 1990) .

4.1.5.2.3. محلول واطئ التوتر KCl (0.075 M) Hypotonic Solution

تم اذابة 0.1118 غم من مسحوق الـ KCl في 50 مل من الماء المقطر للحصول على تركيز نهائي 0.075 M واستخدم المحلول آنياً (Allen *et al.*,1977) .

5.1.5.2.3. المحلول المثبت Fixative Solution

تم تحضيره من خلال مزج ثلاثة حجوم من الكحول المثيلي المطلق مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي واستخدم المحلول آنياً (Allen , *et al.*,1977) .

6.1.5.2.3. دارئ سورنسن Sorenson Solution

لتحضير 1000 مل منه ذوب 7.08 غم من ملح Na_2HPO_4 مع 6.74 غم من ملح KH_2PO_4 في 500 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 1000 مل من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة ثم حفظ في الثلاجة لحين الاستعمال (Yaseen *et al* ., 1998) .

7.1.5.2.3. محلول ملون كمزا Giemsa Stain

ذوب2 غم من مسحوق ملون جمزا في 100 مل من الكحول المثيلي المطلق وعدّ هذا المحلول خزيناً Stock، وعند الاستعمال خفف آنياً بمزج 1 مل صبغة مع 4 مل من دارئ سورنسن (Yaseen *et al* ., 1998) .

8.1.5.2.3. محلول دارئ التحميل Loading buffer

لتحضير 10 مل منه تم اذابة 0.025 غم من صبغة البروموفينول الزرقاء و 4 غم من السكروز في 5 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 10 مل من الماء المقطر .(Sambrook ,*et al*.,1989)

2.5.2.3. المحاليل الخاصة باختبارات رؤوس الحيوانات المنوية

1.2.5.2.3. محلول ملون ازرق المثلين Methylene Blue Stain

لتحضير 100 مل منه تم اذابة 0.5 غم من الصبغة و 1.6 غم من اوكزالات البوتاسيوم و 1 مل فورمالين في 70 مل من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر وحفظ بدرجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال (Coles *et al*., 1980) .

2.2.5.2.3. محلول داريء الفوسفات الملحي PBS Phosphate Buffer Saline

لتحضير 1000 مل منه تم أذابة 8 غم من NaC1 و 0.015 غم من Na_2HPO_4 و 0.2 غم من KH_2PO_4 و 0.2 غم KC1 في 500 مل ثم اكمل الحجم الى 1000 مل من الماء مقطر وضبط الـ pH على 7.2 وعقم بالمؤصدة وحفظ بدرجة حرارة 4 °م (Cruickshank *et al*., 1975) .

6.2.3. تصميم التجارب

قسمت التجربة الى 11 مجموعة كل مجموعة تمثلت بـ 5 فئران أي ان المجموع الكلي 55 فأرة وكالأتي :

1. المجموعة الاولى (السيطرة السالبة) : اعطيت ماء مقطر فقط وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة.
2. المجموعة الثانية (السيطرة الموجبة) : اعطيت السايكلوفوسفامايد فقط بجرعة 20 ملغم / كغم وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة .
3. المجموعة الثالثة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 5 ملغم/كغم قبل السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد اعطاء السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة .
4. المجموعة الرابعة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 5 ملغم/كغم مع السايكلوفوسفامايد وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة .
5. المجموعة الخامسة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 5 ملغم/كغم بعد السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة من اعطاء المستخلص .
6. المجموعة السادسة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 15 ملغم/كغم قبل السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد اعطاء السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة.

7. المجموعة السابعة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 15 ملغم/كغم مع السايكلوفوسفامايد وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة .
8. المجموعة الثامنة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 15 ملغم/كغم بعد السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة من اعطاء المستخلص.
9. المجموعة التاسعة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 30 ملغم/كغم قبل السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد اعطاء السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة .
10. المجموعة العاشرة : اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 30 ملغم/كغم مع السايكلوفوسفامايد وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة .
11. المجموعة الحادية عشر:اعطيت مستخلص حبوب اللقاح بجرعة 30 ملغم/كغم بعد السايكلوفوسفامايد بـ 24 ساعة وقتلت الحيوانات بعد 24 ساعة من اعطاء المستخلص .

وقد اجريت على كل مجموعة الاختبارات الآتية :

1. اختبار تحلل الـ DNA.
2. اختبار معامل الانقسام .
3. اختبار التشوهات الكروموسومية .
4. اختبار التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية .

7.2.3. تحضير الـ DNA

1.7.2.3. استخلاص الـ DNA من الدم DNA extraction from blood

اتبعت طريقة استخلاص وتنقية الـ DNA حسب دليل شركة Promega الامريكية مع بعض التحوير وكالاتي :

1- سحب 1 مل من الدم بوساطة محقنة معقمة ووضع في انبوبة اختبار تحتوي على مادة الـ EDTA و اضيف اليه 3 مل من محلول تحلل الخلايا (Cell Lysis Solution) وحركت الانبوبة بلطف حتى يمتزج الخليط.
2- حضن الخليط لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة لكي يتم تحلل خلايا الدم الحمراء وطرد مركزياً بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة عشر دقائق بدرجة حرارة الغرفة .

3- ازيل الراشح بدون اتلاف الطبقة الرائقة البيضاء ثم دور بوساطة جهاز المازج الدوار (Vortex) لمدة 10-15 ثانية حتى تصبح خلايا الدم البيضاء معلقة.

4- اضيف 1 مل من المحلول المحلل للانوية (Nuclei Lysis Solution) ثم حضن المحلول بدرجة 37 ° م لمدة ساعة .

5- اضيف 5 مايكروليتر من محلول تحلل الحامض النووي RNA (RNase Solution) ثم حضن بدرجة 37 ° م لمدة 15 دقيقة و ترك النموذج ليبرد بدرجة حرارة الغرفة.

6- اضيف 350 مايكروليتر من محلول ترسيب البروتين (Protein Precipitation Solution) ثم طرد مركزياً بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة .

7- نقل الراشح الى انبوبة بحجم 10 مل تحتوي على 1 مل من الايزوبروبانول ومزج الخليط بلطف ثم طرد مركزياً بسرعة 2000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة.

8- ازيل الراشح واضيف 1 مل من الايثانول 70% الى الراسب لغسل الـ DNA وطرد مركزياً بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق بدرجة حرارة الغرفة . شطف الايثانول بوساطة ماصة باستور (Pasteur pipette) وقلبت الانبوبة على ورق نشاف ولوحظ ترسب الـ DNA على جدران الانبوبة على شكل خيوط بيضاء .

9- اضيف الى الـ DNA المترسب 150 مايكروليتر من محلول اعادة هدرجة الـ DNA (DNA Rehydration Solution) وحضن بدرجة 65 ° م لمدة ساعة واحدة ثم خزن الـ DNA بدرجة من 2-8 ° م.

وتم تحديد نقاوة الـ DNA المستخلص باستخدام جهاز المطياف الضوئي على الطول الموجي 260nm و 280nm .

2.7.2.3. الترحيل الكهربائي لـ DNA على هلام الأكاروز Agarose gel electrophoresis DNA

اتبعت طريقة Prifer (1984) لترحيل الـ DNA على هلام الاكاروز إذ أذيب 0.7 غم من الاكاروز في 90 مل من محلول الـ TBE وبعد التسخين إلى درجة 100 م^0 برد في حمام مائي إلى درجة 50 م^0 تقريبا وأكمل الحجم بالمحلول نفسه إلى 100 ميلليتر واضيف اليه 5 مايكروليتر من محلول ملون بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide (بتركيز 5 ملغم / مل) . حضرت صفيحة

أسناد الاكاروز (Tray) الزجاجية ثم أضيف الهلام بعد غمس مشط الحفر (Comb) قرب إحدى نهايتي الصفيحة وترك الاكاروز ليتصلب بوضع أفقي لمدة 30 دقيقة تقريباً ، رفع المشط من الهلام المتصلب ثم ثبتت الصفيحة على مساندها في وحدة الترحيل الأفقية غطى الاكاروز المتصلب بمحلول الـ TBE وبعلو 1 مل ثم بوشر بتحميل DNA داخل الحفر المتكونة كالآتي : مزج 25 ما يكروليتر تقريباً من الـ DNA مع 5 ما يكروليتر من محلول دارئ التحميل Loading buffer , مزجت المحتويات بشكل جيد ثم ملئت في الحفرة المخصصة ووضع في احد الحفر DNA اللامدا المقطع بالانزيم القاطع *Hin* d III (بتركيز 0.5 ملغم / مل)الذي استخدم كدليل حجمي إذ رحلت العينات بجهد كهربائي يقارب 7 فولت / سم ولمدة 2 – 2.5 ساعة حتى بلوغ الصبغة الدالة قرب نهاية الهلام ، تم التقصي عن الـ DNA بعد تعريض الهلام إلى الأشعة فوق البنفسجية بوساطة كاميرا رقمية , وتم حساب مستوى التحلل حسب طريقة Risso – De Faverney وجماعته (2001) .

8.2.3. اختبار معامل الانقسام Mitotic Index (MI)

اتبعت طريقة Allen وجماعته (1977) وكما يلي :

1. حقن الحيوان بـ 0.25 مل من محلول الكولجسين المحضر آنياً في منطقة التجويف البريتوني بعد تعقيم المنطقة بالكحول وبعد ثلاث ساعات خدر الحيوان بوساطة ثنائي اثيل ايثر .

2. تم تثبيت الحيوان على ظهره فوق طبق التشريح وغسلت الأطراف السفلية بكمية من الكحول الأثيلي 70 % ، قص الجلد عند منطقة الفخذ وقطعت عضلات الفخذ ثم مسك عظم الفخذ بالملقط من المنطقة الوسطية وقطع ارتباطه بالمفصلين ونزعت الأقراص المرتبطة بالمفصلين ونظف العظم خارج الحيوان من بقايا العضلات وغسل بمحلول PBS .

3. نبذت الخلايا بسرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقائق واهمل الراشح واضيف للراسب 5 مل من محلول كلوريد البوتاسيوم (0.075 M) الدافيء (37 °م) وعلقت الخلايا جيداً ثم وضعت في حمام مائي بدرجة حرارة 37 °م لمدة 30 دقيقة مع المزج كل خمس دقائق .

4. نبذت الخلايا بسرعة 1000 دورة / دقيقة لمدة 5 دقائق واهمل الراشح واضيف للراسب 5 مل من محلول التثبيت البارد والمحضر آنياً بهيئة قطرات قليلة تنسال على جدار الانبوبة , مزجت المحتويات جيداً باستخدام ماصة باستور ووضعت الانبوبة في الثلاجة بحرارة 4 °م لمدة 30 دقيقة .

5. اعيدت الخطوة السابقة مرتين وبعدها علقت الخلايا في 1-2 مل من محلول التثبيت البارد , ثم تم تنقيط الخلايا على بعد 60 سم تقريباً على شرائح نظيفة وباردة وبمعدل 3–4 قطرات ثم جففت الشرائح على صفيحة ساخنة (45° م) .

6. لونت الشرائح بملون جمزا لمدة (10–12) دقيقة وغسلت بدارئ سورنسن ، تركت الشرائح لمدة 48 ساعة ثم فحصت تحت المجهر الضوئي بوساطة العدسة الزيتية (100 X) لحساب معامل الانقسام , إذ تم حساب عدد الخلايا المنقسمة لكل 1000 خلية. تم تقدير معامل الانقسام حسب المعادلة الآتية :

معامل الانقسام (%) = (عدد الخلايا المنقسمة ÷ العدد الكلي للخلايا) × 100 (Stich 1981 and Sana ,)

9.2.3. تحضير كروموسومات نقي العظم

لتحضير كروموسومات خلايا نقي العظام اتبعت طريقة Allen وجماعته (1977) والمشار اليها في في اختبار معامل الانقسام ، و تم الفحص تحت المجهر الضوئي بوساطة العدسة الزيتية لحصر التشوهات الكروموسومية لكل 1000 خلية .

10.2.3. تحضير الحيوانات المنوية للفئران

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

3.3. التحليل الاحصائي Statical Analysis

تم تحليل النتائج وفق نموذج التصميم العشوائي الكامل (Complete Randomized Design) بأستخدام اختبار F للإستدلال على المعنوية واستخدام اختبار اقل فرق معنوي (Least L.S.D. Significant Differention) لإظهار معنوية النتائج وتم ايضاً استخراج المتوسط الحسابي M (Arithmetic Mean) والخطأ القياسي Se (Standard error) (الراوي ,2000) .

الفصل الرابع
النتائج

الفصل الرابع

4 . النتائج Results

1.4. توصيف المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) :

تبين الأشكال (4−1 , 4−2 , 4−3) نمط ترحيل الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح عند فحصه بالضوء الاعتيادي والاشعة فوق البنفسجية التي تم تلخيصها في الجداول (4−1 , 4−2 , 4−3) والتي تبين خصائص الحزم من ناحية الـ R_f واللون وعدد الحزم الظاهرة , إذ لوحظ ظهور 5 حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي للطور السائل (بتروليوم ايثر , ميثانول , بنزين , كلوروفورم 1:1:1:1 V/V/V/V) وقد تراوحت قيم الـ R_f بين 0.07−0.89 في حين لوحظ ظهور 7 حزم عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية وتراوحت قيم الـ R_f لها بين 0.07−0.89.

اما عند استخدام الطور السائل (ايثر , ايثانول , كلوروفورم , بنزين 1:1:1:1 V/V/V/V) فقد لوحظ ظهور 7 حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي وتراوحت قيم الـ R_f بين 0.08 0.87 في حين لوحظ ظهور 12 حزمة عن الفحص بالاشعة فوق البنفسجية تراوحت قيم الـ R_f بين 0.08− 0.78 .

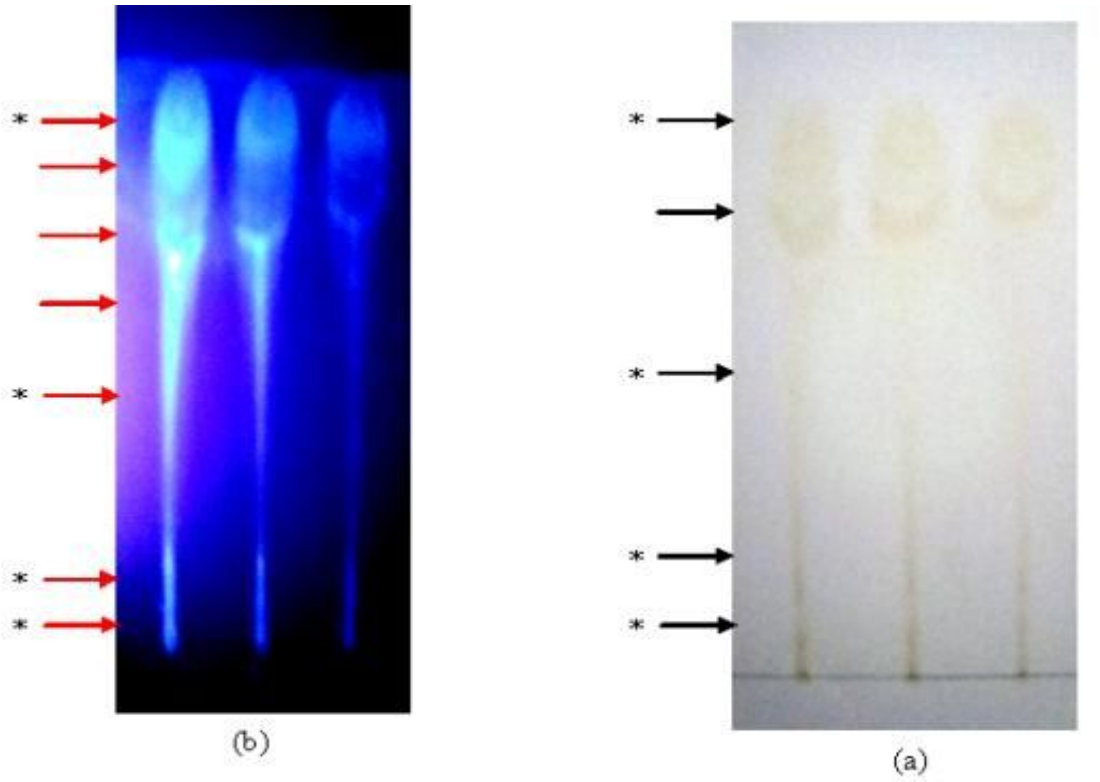
وعند استخدام الطور السائل (هكسان , ايثانول , كلوروفورم1:1:1V/V/V) لوحظ ظهور 5 حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي وتراوحت قيم الـ R_f بين 0.09 −0.9 وكذلك لوحظ ظهور 9 حزم عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية تراوحت قيم الـ R_f بين 0.05 −0.95 .

إذ تبين هذه النتائج وجود اكثر من مكون للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح عند استخدام عدة اطوار سائلة مختلفة .

جدول (4-1) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (بتروليوم ايثر , ميثانول , بنزين , كلوروفورم)(V/V/V/V1:1:1:1).

طريقة الفحص	خصائص الحزم		العدد
	R_f	اللون	
الضوء الاعتيادي (المرئي)	0.07*	بني مخضر	5
	0.18*	بني مخضر	
	0.47*	بني فاتح	
	0.73	بني فاتح	
	0.89*	بني مصفر	
الاشعة فوق البنفسجية	0.07*	ازرق مخضر	7
	0.18*	ازرق فاتح	
	0.47*	ازرق فاتح	
	0.64	ازرق مخضر	
	0.7	ازرق مخضر	
	0.81	ازرق فاتح	
	0.89*	ازرق فاتح	

*** الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والاشعة فوق البنفسجية**



شكل (4-1) ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح على صفائح الـــــ TLC باستخدام الطور السائل (بترواليوم ايثر ، ميثانول ، بنزين ، كلوروفورم) (V/V/V/V 1:1:1:1)

(a) عند الفحص بالضوء الاعتيادي

(b) عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية

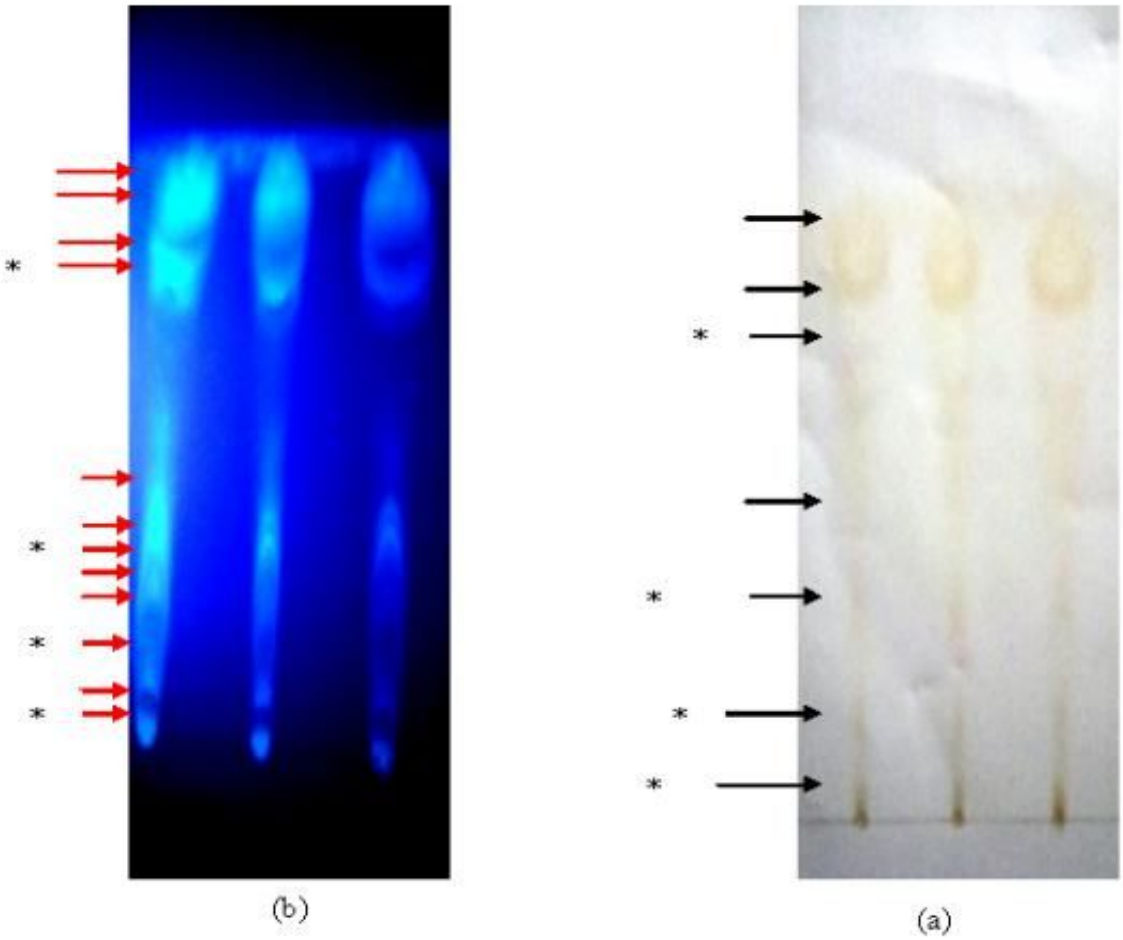
الاسهم تشير الى مواقع الحـــزم

* الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والاشعة فوق البنفســـجية .

جدول (4-2) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (ايثر : ايثانول : كلوروفورم: بنزين) (V/V/V/V 1:1:1:1).

طريقة الفحص	خصائص الحزم		العدد
	R_f	اللون	
الضوء الاعتيادي (المرئي)	0.08*	بني مخضر	7
	0.16*	بني مخضر	
	0.30*	بني فاتح	
	0.5	بني فاتح	
	0.64*	بني فاتح	
	0.82	بني مصفر	
	0.82	بني مصفر	
الاشعة فوق البنفسجية	0.08*	ازرق مخضر	12
	0.10	ازرق فاتح	
	0.16*	ازرق فاتح	
	0.21	ازرق فاتح	
	0.25	ازرق مخضر	
	0.30*	ازرق مخضر	
	0.32	ازرق مخضر	
	0.37	ازرق فاتح	
	0.64*	ازرق مخضر	
	0.68	ازرق مخضر	
	0.75	ازرق مخضر	
	0.78	ازرق مخضر	

*** الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والاشعة فوق البنفسجية**



(b) (a)

شكل (4-2) ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب التفاح على صفائح الـــــ TLC باستخدام الطور السائل (ايثر ، ايثانول ، كلوروفورم ، بنزين) (V/V/V/V 1:1:1:1)

(a) عند الفحص بالضوء الاعتيادي

(b) عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية

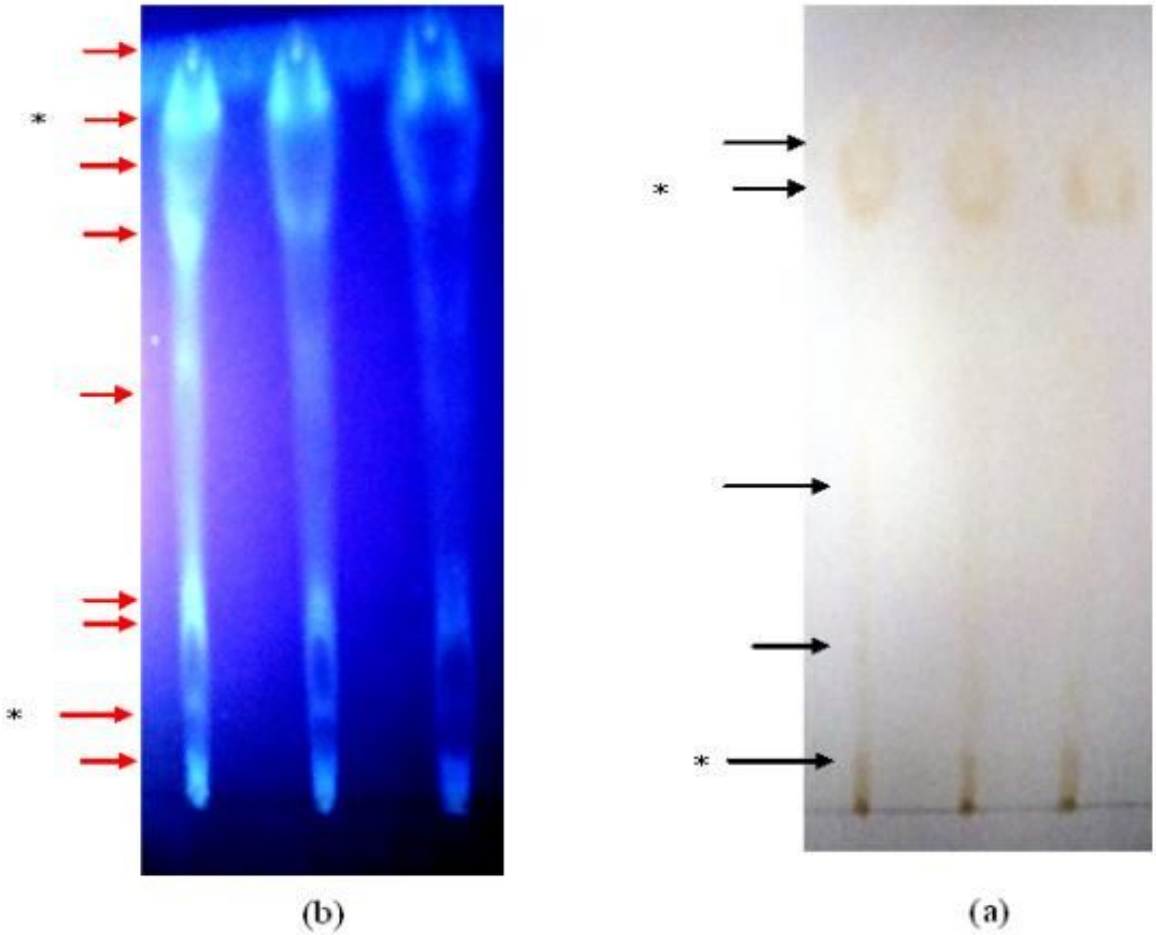
الاسهم تشير الى مواقع الحـــزم

* الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والاشعة فوق البنفســـجية .

جدول (4-3) توصيف الحزم المتكونة على صفائح الـ TLC للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الطور السائل (هكسان , ايثانول , كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1)

طريقة الفحص	خصائص الحزم		العدد
	R_f	اللون	
الضوء الاعتيادي (المرئي)	0.09*	بني مخضر	5
	0.19	بني فاتح	
	0.44	بني فاتح	
	0.84*	بني مصفر	
	0.9	بني مصفر	
الاشعة فوق البنفسجية	0.05	ازرق مخضر	9
	0.09*	ازرق فاتح	
	0.23	ازرق مخضر	
	0.25	ازرق مخضر	
	0.52	ازرق فاتح	
	0.72	ازرق فاتح	
	0.80	ازرق	
	0.84*	ازرق مخضر	
	0.95	ازرق فاتح	

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



شكل (4-3) ترحيل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب القاح على صفائح الـــــ TLC باستخدام الطور السائل (هكسان ، ايثانول ، كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1)

(a) عند الفحص بالضوء الاعتيادي

(b) عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية

الاسهم تشير الى مواقع الحـــزم

* الحزم المشتركة عند الفحص بالضوء الاعتيادي المرئي والاشعة فوق البنفســـجية .

1.1.4. اختبار الكشف عن الفعالية المضادة للاكسدة باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين :

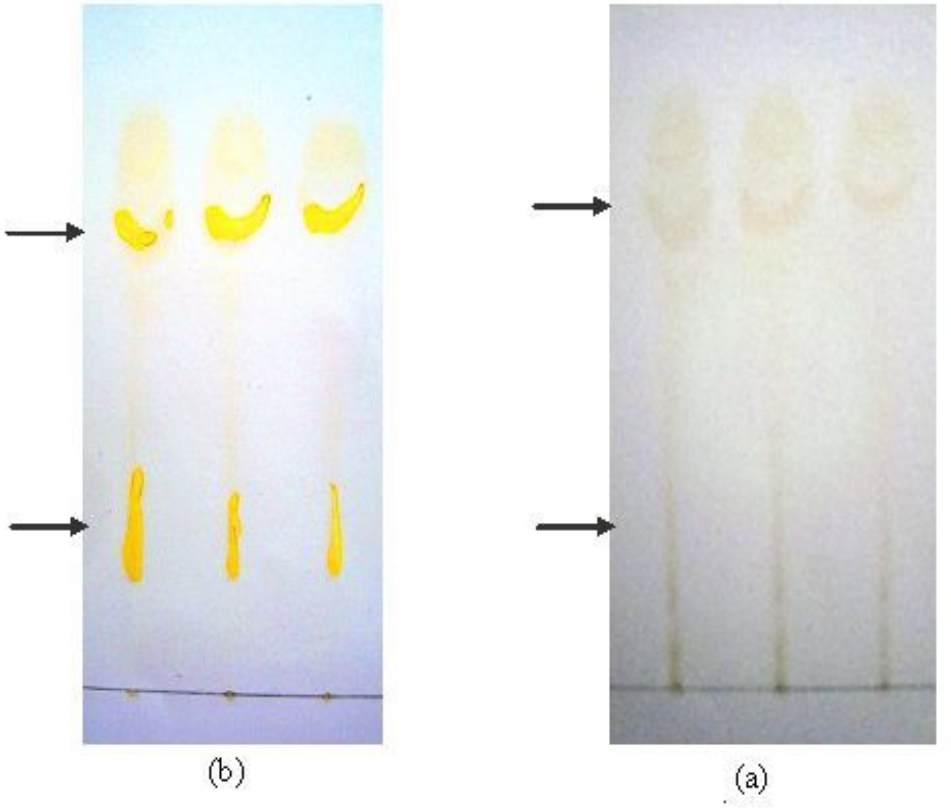
تبين الجداول (4-4 , 4-5 , 4-6) نتائج فحص القابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام طريقة الرش بالبيتاكاروتين , إذ لوحظ عند استخدام الطور السائل (بتروليوم ايثر , ميثانول , بنزين , كلوروفورم) (V/V/V/V1:1:1:1) ظهور فعالية مضادة للأكسدة في حزمتين الـ Rf = 0.18 ,0.73 , اما عند استخدام الطور السائل (ايثر , ايثانول , كلوروفورم , بنزين) (1:1:1:1 V/V/V/V) فقد لوحظ ظهور فعالية مضادة للأكسدة في 4 حزم الـ Rf = 0.30 ,0.32 , 0.75 , 0.78 في حين لوحظ عند استخدام الطور السائل (هكسان , ايثانول , كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1) ظهور فعالية مضادة للأكسدة في 3 حزم الـ Rf = 0.25 , 0.84 , 0.9 . وقد حددت الفعالية المضادة للأكسدة لهذه الحزم من خلال احتفاظها باللون الاصفر مما يدل على وجود فعالية مضادة للأكسدة في بعض مكونات مستخلص حبوب اللقاح .

جدول (4–4) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام اختبار الرش بالبيتا كاروتين (استخدم الطور السائل بتروليوم ايثر :ميثانول:بنزين:كلوروفورم).

الحزمة R_f	نتيجة الفحص
0.07	–
0.18	+
0.47	–
0.64	–
0.7	–
0.73	+
0.81	–
0.89	–

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

– : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة



شكل (4-4) فحص الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاوتين للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللفاح باستخدام الطور السائل (بترواليوم ايثر ، ميثانول ، بنزين ، كلوروفورم) (V/V/V/V 1:1:1:1)

(a) قبل الرش

(b) بعد الرش

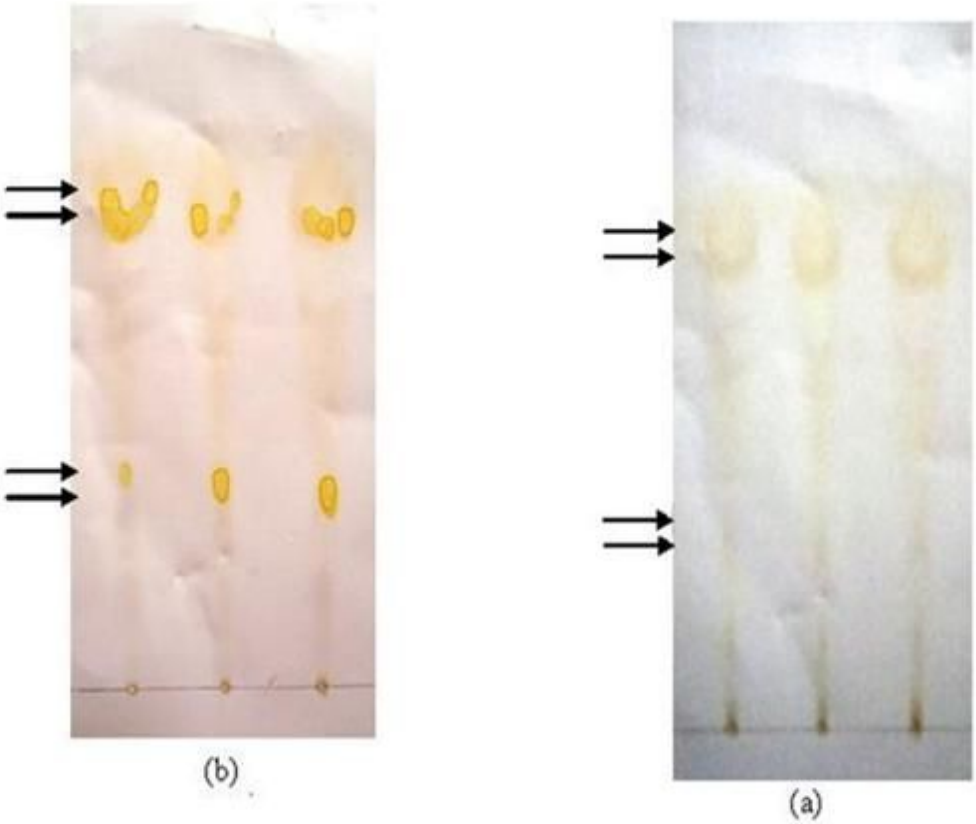
الاسهم تشير الى الحزم ذات الفعالية المضادة للاكسدة (التي احتفظت باللون الاصفر)

جدول (4–5) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام اختبار الرش بالبيتا كاروتين (استخدم الطور السائل ايثر:ايثانول:كلوروفورم:بنزين)

الحزمة R_f	نتيجة الفحص
0.08	–
0.10	–
0.16	–
0.21	–
0.25	–
0.30	+
0.32	+
0.37	–
0.5	–
0.64	–
0.68	–
0.75	+
0.78	+
0.82	–
0.87	–

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

– : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة



شكل (5-4) فحص الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللفاح باستخدام الطور السائل (إيثر ، إيثانول ، كلوروفورم ، بنزين) (V/V/V/V 1:1:1:1)

(a) قبل الرش

(b) بعد الرش

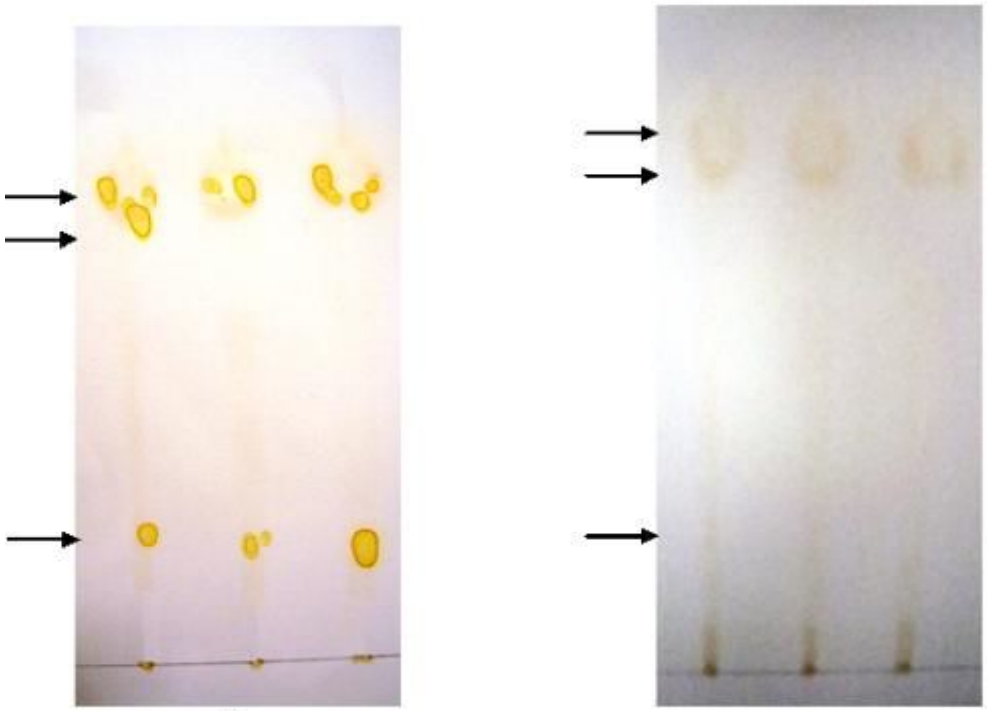
الاسهم تشير الى الحزم ذات الفعالية المضادة للأكسدة (التي احتفظت باللون الاصفر)

جدول (4–6) نتائج الفحص للقابلية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام اختبار الرش بالبيتا كاروتين (استخدم الطور السائل هكسان:ايثانول:كلوروفورم)

الحزمة R_f	نتيجة الفحص
0.05	–
0.09	–
0.19	–
0.23	–
0.25	+
0.44	–
0.52	–
0.72	–
0.80	–
0.84	+
0.9	+
0.95	–

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

– : عدم وجود فعالية مضادة للأكسدة



شكل (4-6) فحص الفعالية المضادة للاكسدة بطريقة الرش بالبيتاكاروتين للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللفاح باستخدام الطور السائل (هكسان ، ايثانول ، كلوروفورم) (V/V/V 1:1:1)

(a) قبل الرش
(b) بعد الرش
الاسهم تشير الى الحزم ذات الفعالية المضادة للاكسدة (التي احتفظت باللون الاصفر)

2.4. الاختبارات البيولوجية الجزئية والوراثية الخلوية

1.2.4 تحلل الـ DNA لخلايا الدم البيضاء للفئران المعاملة بالسايكلوفوسفمايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح

يبين الجدول (4–7) مستوى التحلل الحاصل في الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران بعد المعاملة بالسايكلوفوسفمايد وبتراكيز مختلفة من مستخلص حبوب اللقاح , إذ يلاحظ بأن عينة الـ DNA المستخلصة من دم الفئران المعاملة بالجرعة الاولى 5 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح قبل السايكلوفوسفمايد والمرحلة على هلام الاكاروز اعطت حزمة بحجم جزيئي 9.8 كيلو زوج قاعدي وهي حزمة مشابهة لعينة الـ DNA المستخلصة من مجموعة السيطرة السالبة والتي بلغت 9.8 كيلو زوج قاعدي إذ بلغ مستوى التحلل 0 كيلو زوج قاعدي , اما مستوى التحلل عند اجراء التداخل الثاني 1.4 كيلو زوج قاعدي في حين ادى التداخل الثالث الى ظهور مسحة مشابهة لمسحة عينة السيطرة الموجبة تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي والتي فيها مستوى التحلل 8.5 كيلو زوج قاعدي .

أما عند إجراء التداخلات الثلاثة لجرعة 15 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح فقد لوحظ بأن التداخل الأول أدى إلى ظهور مسحة تراوحت بين 9.4–6.3 كيلو زوج قاعدي إذ ارتفع مستوى التحلل إلى 3.1 كيلو زوج قاعدي وأدى التداخل الثاني إلى ظهور مسحة تراوحت بين 9.4–5.6 كيلو زوج قاعدي إذ ارتفع مستوى التحلل إلى 3.8 كيلو زوج قاعدي ، في حين أدى التداخل الثالث إلى ظهور مسحة تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي وبمستوى تحلل 8.5 كيلو زوج قاعدي مساوياً بذلك لمستوى تحلل السيطرة الموجبة .

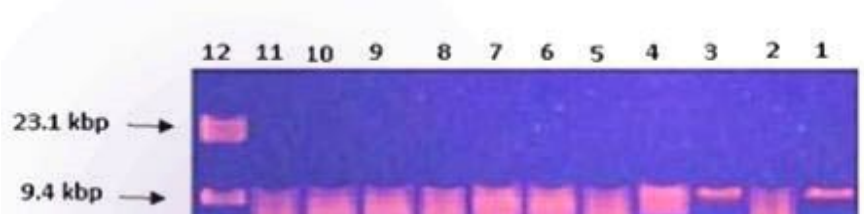
اما العينات في الجرعة 30 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح فقد اعطى التداخل الاول مسحة تراوحت بين 9.4–4.6 كيلو زوج قاعدي وبمستوى تحلل 4.8 كيلو زوج قاعدي اما التداخل الثاني فقد اعطى مسحة تراوحت بين مسحة 9.4–4.1 كيلو زوج قاعدي إذ ارتفع فيه مستوى التحلل الى 5.3 كيلو زوج قاعدي في حين اعطى التداخل الثالث مسحة مشابهة لمسحة عينة السيطرة الموجبة والتي تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي وبمستوى تحلل 8.5 كيلو زوج قاعدي .

وهذا يدل على أن التداخل الأول لجرعة الـ 5 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح هو الأفضل في التقليل من مستوى التحطم في الـ DNA ويليه في ذلك التداخل

الثاني بينما لم يؤدَّ التداخل الثالث في كافة الجرع إلى أي تغيرات إيجابية ملموسة في منع تحطم الـ DNA .

جدول (4-7) يبين مستوى تحلل الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران بعد المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وبتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح .

رقم المجال في الشكل (4-4)	التداخل	الحجم الجزيئي التقريبيKbp (Kilobase pair)	مستوى التحلل مقارنة بالسيطرة السالبة Kbp
1	DNA الفيروس لامدا λ (5مايكروليتر) المقطوع بالانزيم *Hin* dIII	6 حزم (23.1,9.4,6.5,4.3,2.2,2.0)	—
2	السيطرة السالبة	حزمة (9.8)	0
3	السيطرة الموجبة	مسحة (0.9-9.4)	8.5
4	الجرعة 5ملغم/كغم التداخل الاول	حزمة (9.8)	0
5	التداخل الثاني	مسحة (7.2-9.4)	2.2
6	التداخل الثالث	مسحة (0.9-9.4)	8.5
7	الجرعة 15ملغم/كغم التداخل الاول	مسحة (6.3-9.4)	3.1
8	التداخل الثاني	مسحة (5.6-9.4)	3.8
9	التداخل الثالث	مسحة (0.9-9.4)	8.5
10	الجرعة 30ملغم/كغم التداخل الاول	مسحة (4.6-9.4)	4.8
11	التداخل الثاني	مسحة (4.1-9.4)	5.3
12	التداخل الثالث	مسحة (0.9-9.4)	8.5



شكل (4–7) يبين نمط الترحيل الكهربائي لـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء لذكورالفئران بعد المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وبجرع مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح .

1- DNA دم فئران عينة السيطرة السالبة .
2- DNA دم فئران عينة السيطرة الموجبة معاملة بـ 20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد .
3- DNA دم فئران معاملة بـ 5 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح قبل السايكلوفوسفامايد .
4- DNA دم فئران معاملة بـ 5 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح مع السايكلوفوسفامايد .
5- DNA دم فئران معاملة بـ 5 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح بعد السايكلوفوسفامايد .
6- DNA دم فئران معاملة بـ 15 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح قبل السايكلوفوسفامايد .
7- DNA دم فئران معاملة بـ 15 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح مع السايكلوفوسفامايد .
8- DNA دم فئران معاملة بـ 15 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح بعد السايكلوفوسفامايد .
9- DNA دم فئران معاملة بـ 30 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح قبل السايكلوفوسفامايد .
10- DNA دم فئران معاملة بـ 30 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح مع السايكلوفوسفامايد .
11- DNA دم فئران معاملة بـ 30 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح بعد السايكلوفوسفامايد .
12- DNA الفيروس لامدا المقطوع بالانزيم *Hin* d III والمستخدم كدليل حجمي .

3.2.4. دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران :

يوضح الجدول (8.4) متوسط معامل الانقسام (MI) لخلايا نقي العظم للفئران المعاملة بجرع (5 و15 و30) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح وجرعة 20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات ، إذ بلغت قيم (MI) للتداخلات (قبل , مع , بعد) للجرعة 5 ملغم/كغم 20.2 , 18.86 , 8.6 على التوالي اما للجرعة 15 ملغم/كغم 14.1 , 13.5 , 8.14 على التوالي اما للجرعة 30 ملغم/كغم 10.34 , 10.08 , 8.5 على التوالي ولوحظ أيضاً وجود فرق معنوي في قيمة (MI) عند مقارنة التداخل الأول والثاني من الجرعة الاولى من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح والتداخل الاول والثاني من الجرعة الثانية المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح مع السيطرة الموجبة جدول (4 – 8) فروق معنوية ($P< 0.01$) والتي أدت الى رفع معامل الانقسام ويلاحظ أن جميع المقارنات كانت معنوية باستثناء المقارنة بين السيطرة الموجبة والتداخل الثالث من الجرعة الاولى والتداخل الثالث من الجرعة الثانية والتداخل الاول والثاني والثالث من الجرعة الثالثة إذ كانت (8.6 , 8.14 , 10.34 , 10.08 , 8.5) على التوالي .

جدول (4 – 8) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران المعاملة بجرع (5 و15 و30) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح وجرعة 20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات

المعاملة	M± Se (per 1000 cell)
السيطرة السالبة	20.4±0.687*
السيطرة الموجبة	8.28±0.255
الجرعة 5ملغم/كغم التداخل الاول	20.2±0.776*
التداخل الثاني	18.86±0.414*
التداخل الثالث	8.6±0.320
الجرعة 15ملغم/كغم التداخل الاول	14.1±0.646*
التداخل الثاني	13.5±0.313*
التداخل الثالث	8.14±0.366
الجرعة 30ملغم/كغم التداخل الاول	10.34±0.670
التداخل الثاني	10.08±0.832
التداخل الثالث	8.5±0.433

*فرق معنوي عند مستوى ($P<0.01$)

المعدل± الخطأ القياسي(M.±S.E.)

4.2.4. دراسة التشوهات الكروموسومية في خلايا نقى العظم للفئران:

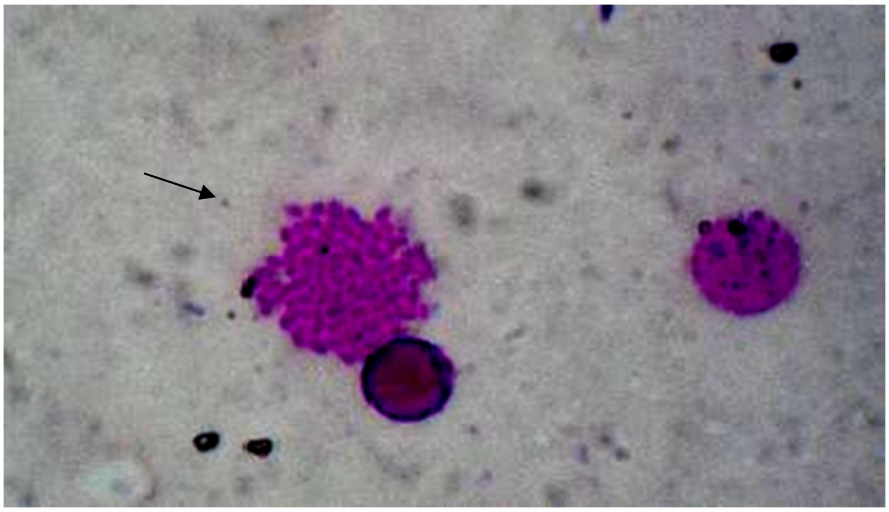
يوضح الجدول (4–9) التغيرات في معدلات تشوهات الكروموسومية (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة , إذ تبين بان الجرعة 5 ملغم / كغم في التداخل الاول والثاني أدتا الى حدوث اختلاف معنوي ($P < 0.01$) مقارنة مع السيطرة الموجبة , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي. اما عند اجراء الجرعة 15 ملغم/كغم فقد تبين بان التداخل الاول والثاني ادى الى اختلاف معنوي , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي بإستثناء التشوه من نوع الكسر الكروماتيدي. اما الجرعة 30 ملغم/كغم فقد ادى التداخل الاول الى حدوث اختلاف معنوي بإستثناء التشوه من نوع الكسر الكروماتيدي , اما التداخل الثاني فقد كانت الفروقات معنوية بإستثناء التشوه من نوع (الكسر الكروماتيدي و الكروموسوم الحلقي) , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي .

جدول (4–9) التغيرات في معدلات تشوهات الكروموسومية (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة

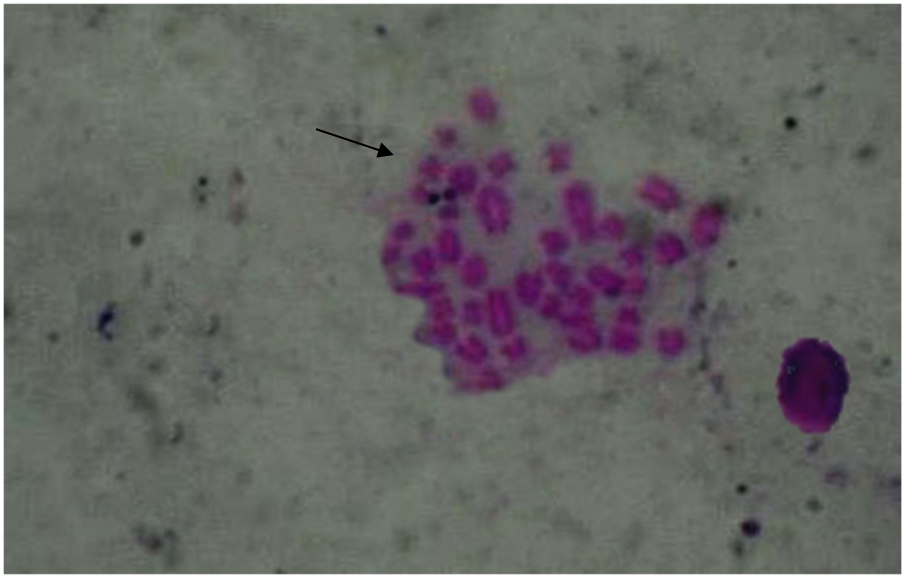
التشوه / المعاملة	زيادة المجموعة (per 1000 cell)	قلة المجموعة (per 1000 cell)	كسر كروموسومي (per 1000 cell)	كسر كروماتيدي (per 1000 cell)	كروموسوم حلقي (per 1000 cell)
السيطرة السالبة	0 *	0*	6.4±0.509*	6.2±0.583*	2.8±0.374*
السيطرة الموجبة	18.4±1.077	24.2±1.827	29.2±1.462	15.6±1.029	13.2±0.860
الجرعة 5ملغم/كغم التداخل الاول	0*	0*	5.8±0.583*	6.4±0.748*	3.4±0.748*
التداخل الثاني	1.6±0.748*	1.2±0.583*	9±0.948*	8±1.224*	4.2±1.200*
التداخل الثالث	19.4±0.509	25.6±1.913	30±2.039	18.6±0.509	13.4±0.927
الجرعة 15ملغم/كغم التداخل الاول	6.2±0.860*	7.6±0.400*	13.6±1.749*	10.4±0.509*	6.2±0.583*
التداخل الثاني	9.6±0.927*	10.8±0.734*	15.2±2.083*	11.6±0.812*	7.6±0.748*
التداخل الثالث	18.6±1.029	23.2±1.392	30.6±1.029	19.4±0.812*	13.8±1.496
الجرعة 30ملغم/كغم التداخل الاول	12.2±0.734*	15±0.707*	20.2±1.984*	14.8±0.583	8.8±0.583*
التداخل الثاني	14.2±1.240*	18.6±0.748*	22.6±0.927*	16.4±0.871	10±0.707
التداخل الثالث	18.8±0.583	22.6±0.927	30.6±1.503	18.2±0.663	12.6±0.979

***فرق معنوي عند مستوى (P<0.01)**

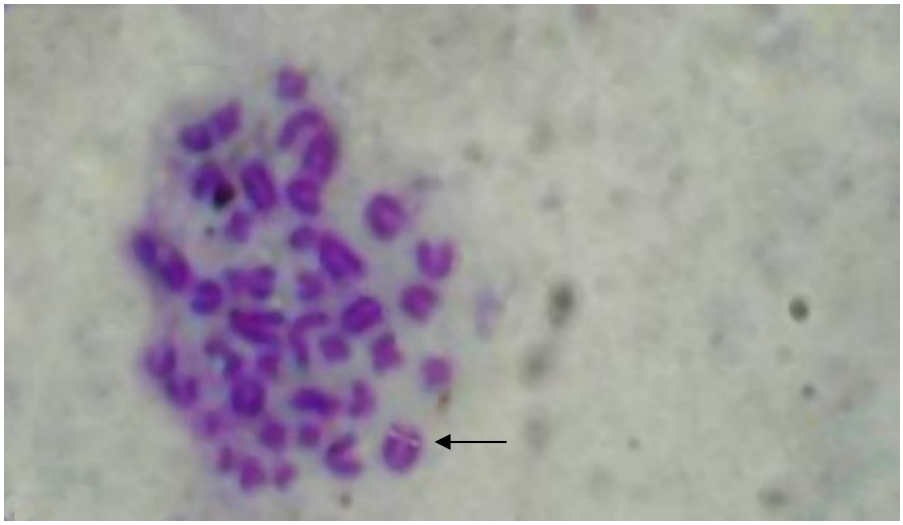
الخطأ القياسي ± المعدل (M..±S.e.)



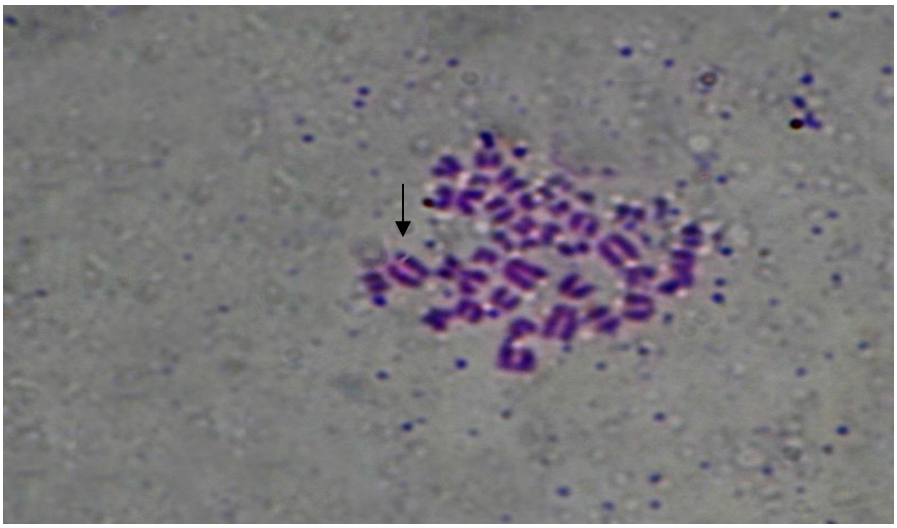
شكل (4–8) زيادة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا) .



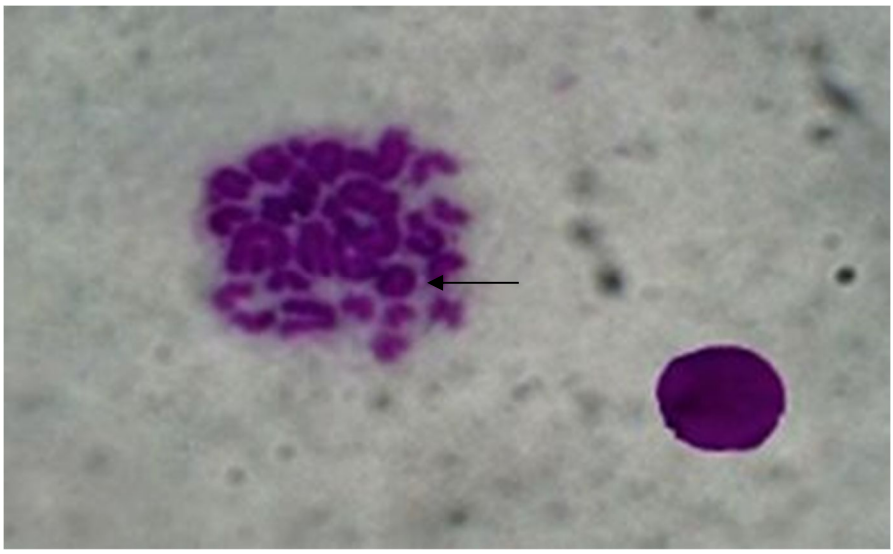
شكل (4–9) قلة المجموعة الكروموسومية في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا).



شكل (4–10) كسر كروموسومي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا).



شكل (4–11) كسر كروماتيدي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا).



شكل (4–12) الكروموسوم الحلقي في الطور الاستوائي لخلايا نقي عظم ذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (× 1600 ، ملون جمزا).

5.2.4. دراسة التشوهات في رؤوس الحيوانات :

يبين جدول (4–10) التغيرات في معدلات التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الفئران المعاملة بجرع (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة, إذ تبين بان الجرعة 5 ملغم / كغم في التداخل الاول والثاني أدتا الى حدوث اختلاف معنوي (P < 0.01) مقارنة مع السيطرة الموجبة (جدول 4–12) , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى اختلاف معنوي . اما عند اجراء الجرعة 15 ملغم/كغم فقد تبين بان التداخل الاول والثاني ادى الى اختلاف معنوي , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فروق معنوية .اما الجرعة 30 ملغم/كغم فقد ادى التداخل الاول الى حدوث اختلاف معنوي , اما التداخل الثاني فلم يؤدَّ الى فروق معنوية بأستثناء التشوه من نوع نطف فاقدة للرأس في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي باستثناء التشوه من نوع نطف فاقدة للذنب .

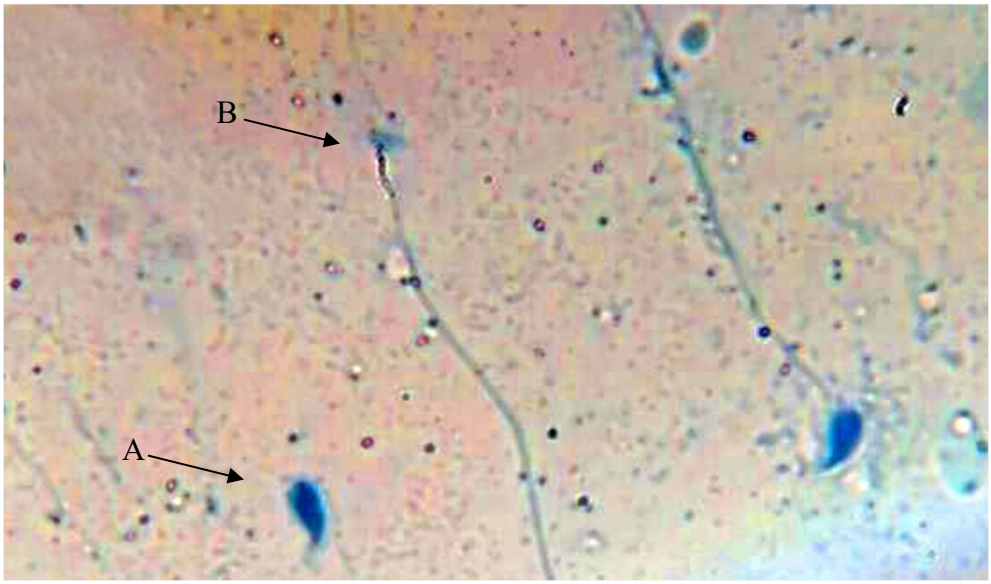
جدول (4-12) التغيرات في معدلات التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الفئران المعاملة بجرع (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة .

التشوه / المعاملة	فاقدة الرأس (per 1000 cell)	فاقدة الذنب (per 1000 cell)	فاقدة كلاب الرأس (per 1000 cell)	رأس كروي (per 1000 cell)
السيطرة السالبة	10.6±0.297*	18.0±0.707*	10.4±0.678*	7.2±0.800*
السيطرة الموجبة	79.2±3.469	48.2±1.319	53.8±1.593	51.0±3.807
الجرعة 5ملغم/كغم التداخل الاول	11.8±0.969*	23.8±1.655*	16.4±0.509*	11.2±0.734*
التداخل الثاني	17.6±0.871*	25.2±1.428*	28.6±0.812*	31.2±1.280*
التداخل الثالث	77.8±3.426	51.6±2.638	48.6±3.043	54.6±2.803
الجرعة 15ملغم/كغم التداخل الاول	37.6±1.720*	27.0±2.549*	33.4±0.927*	29.8±1.462*
التداخل الثاني	43.2±1.428*	36.8±3.624*	39.2±1.200*	40.2±1.157*
التداخل الثالث	81.2±2.083	48.6±1.568	49.2±2.576	51.2±1.496
الجرعة 30ملغم/كغم التداخل الاول	60.6±1.166*	52.4±1.077	50.6±2.063	49.4±2.767
التداخل الثاني	61.2±0.734*	53.3±3.352	53.8±1.280	50.4±1.964
التداخل الثالث	81.2±2.222	58.2±2.130*	52.6±2.657	54.4±4.308

***فرق معنوي عند مستوى (P<0.01)**

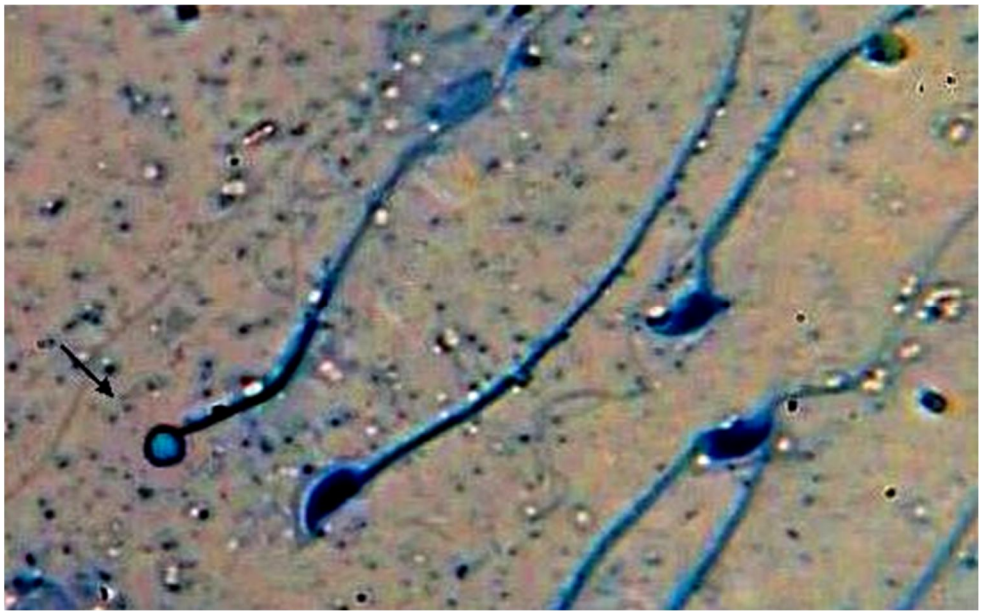
الخطأ القياسي ± المعدل (M.±S.e.)

شكل (4–13) نطفة فاقدة للراس لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير 1600 X , ملون ازرق المثلين) .



شكل (4–14) A.نطفة فاقدة للذنب B. نطفة فاقدة للرأس لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير 1600 X الصبغة المستخدمة : ملون ازرق المثلين) .

شكل (4–15) نطفة فاقدة كلاب الرأس لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير X 1600 الصبغة المستخدمة : ملون أزرق المثلين) .



شكل (4–16) نطفة ذات رأس كروي لذكور الفئران المعاملة بالسايكلوفوسفامايد وتراكيز مختلفة من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح (قوة التكبير X 1600 الصبغة المستخدمة : ملون أزرق المثلين) .

الفصل الخامس
المناقشة

الفصل الخامس

المناقشة Discussion

1.5. توصيف المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) .

لقد اظهرت نتائج توصيف المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح باستخدام الـTLC تنوعاً نسبياً في عدد الحزم فقد بين جدول (4-1) وشكل (4-1) ظهور 5 حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي للطور السائل (بترواليوم ايثر,ميثانول,بنزين,كلوروفورم) , و7 حزم عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية , واما عند استخدام الطور السائل (ايثر,ايثانول,كلوروفورم,بنزين) جدول (4-2) وشكل (4-2) لوحظ ظهور 7 حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي و 12 حزمة عن الفحص بالاشعة فوق البنفسجية , اما عند استخدام الطور السائل (هكسان,ايثانول,كلوروفورم) جدول (4-3) وشكل (4-3) فقد لوحظ ظهور 5 حزم عند الفحص بالضوء الاعتيادي و 9 حزم عند الفحص بالاشعة فوق البنفسجية .ويمكن تفسير ذلك بان حبوب اللقاح تحتوي على العديد من المكونات والتي من اهمها المغذيات مثل الاحماض الامينية والاحماض الدهنية والانزيمات ومرافقات الانزيم والفيتامينات والمركبات الفينولية والصبغات النباتية , فقد وجد ان حبوب اللقاح تحتوي على الفيتامينات مثل حامض البانتوثينك وفيتامين C و E والكيمياويات الضوئية وبقية المغذيات مثل الكاروتينات والفلافونيدات والستيرولات وان 20% من حبوب اللقاح تتكون من احماض امينية وتحتوي ايضاً على اكثر من 5000 انزيم ومرافق انزيمي (Albritton,2004).

فضلاً عن ذلك أشار Naranjo وجماعته (2004) ومن خلال الاعتماد على نتائج التحليل الكروموتوغرافي من نوع كروموتوغرافيا السائل ذو الكفاءة العالية (HPLC) وبوساطة الطيف الكتلي ان حبوب اللقاح تحتوي على عدة صبغات مختلفة منها: (Anthocyanin) و-3 (Petunidin o-rutinoside) و (Delphinidin) و (Cyanidin) و (Petunidin-3-o-glucoside), وايضاً أشير ان حبوب لقاح نحل العسل تتألف من الكربوهيدرات بنسبة 55% والبروتين 35% والفيتامينات والمعادن 3% والاحماض الدهنية 2% وبقية المكونات 5% وتحتوي حبوب اللقاح على ما لايقل عن 15 مركب مضاد للاكسدة والتي من اهمها الفلافونات (Deuster *et al.*,2004) .

وقد ذكر الباحث Roman وجماعته (2007) ان مستخلص حبوب اللقاح يحتوي على عدة مركبات فينولية تم الكشف عنها بوساطة تقنية الترحيل الكهربائي الشعري المقترن مع تقنية الرش الكهربائي الايوني للطيف الكتلي وهذه الفينولات هي :

Galloyl Galloylv glucose و 2′,4′,6′-trihydroxy-3′- formyldihydrochalcone و Acetin glucoside و 7 - O - methylherbacetin - 3 - sophoroside و Apigenin -6-8-di-c-glucoside و Genistein - 7 - O - β - D - glucoside و Quercetin - 3 – rutinoside و Apigenin - 7 - O – glucoside و Luteolin -7-O-glucoside .

وكذلك بين Hegazi و Abd El-Hady (2007) ان حبوب لقاح نحل العسل وباستحدام HPLC-MS وبعد استخلاصها تحتوي على : Apigenin و Myricetin و Liquiriteginin و Eriodictyol و Luteolin و Quercetin و Naringenin و Hesperetin و 8-Methoxykaempferol و Luteolin-3-methylether .

2.5 اختبار الفعالية المضادة للأكسدة بوساطة طريقة الرش بالبيتاكاروتين

لقد بينت نتائج فحص الفعالية المضادة للأكسدة للمستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح بطريقة الرش بالبيتاكاروتين وجود اكثر من حزمة احتفظت باللون الاصفر فقد بين جدول (4–4) وشكل (4–4) وجود حزمتين عند استخدام الطور السائل (بترواليوم ايثر :ميثانول:بنزين:كلوروفورم) , وبين جدول (4–5) وشكل (4–5) وجود اربع حزم عند استخدام الطور السائل (ايثر :ايثانول:كلوروفورم:بنزين) , وبين جدول (4–6) وشكل (4–6) وجود ثلاث حزم عند استخدام الطور السائل (هكسان:ايثانول:كلوروفورم) . وقد تعزى هذه الفعالية المضادة للأكسدة الى ماأشار اليه Abarca وجماعته (2004) من ان حبوب لقاح نحل العسل تمتلك فعالية حجز الجذور الحرة عند اختبار ذلك بطريقة DPPH بسبب احتوائها على الفينولات المتعددة , كذلك أشار Almedia-Muradian وجماعته (2005) الى ان حبوب اللقاح تحتوي على الفلافونيدات التي تمتلك فعالية مضادة للأكسدة تتمثل في حجز انواع الجذور الحرة الاوكسجينية .

وايضاً ذكر LeBalance وجماعته (2009) ان حبوب لقاح نحل العسل لست نماذج نباتية تمتلك فعالية مضادة للأكسدة تم الكشف عنها بطريقة DPPH وبأستخدام عدة مذيبات وان سبب هذه الفعالية هو وجود الفينولات المتعددة التي تم تحليلها بوساطة كروموتوغرافيا الغاز المقترن

بالطيف الكتلي وان هذه النماذج هي : Yucca و Mesquite و Palm و Mimosa و Chenopod و Terpentine bush وقد اعطى المذيب الكلوروفورمي اعلى فعالية مضادة للأكسدة لحبوب اللقاح .

ان المستخلص الهكسانولي لحبوب لقاح نحل العسل المتجمعة من عدة اصول نباتية يحتوي على العديد من المركبات التي تتميز بامتلاكها فعالية مضادة للأكسدة وهذه المركبات هي : Isorhamnetin و Luteolin و Quercetin و *P*-hydroxycinnamic acid و Isorhamnetin-3-O-(6"-O-E-*P*-coumaroyl)*B*-D-glucopyranoside وقد وجد ان المركب الاخير يعطي اعلى فعالية مضادة للأكسدة من المركبات الاخرى والتي تم الكشف عنها بطريقة DPPH (Silva *et al.,* 2009) .

3.5. الاختبارات البيولوجية الجزيئية والوراثية الخلوية .

1.3.5. تحلل الـ DNA لخلايا الدم البيضاء للفئران

بين الجدول (4–7) خصائص الـ DNA المستخلص من خلايا الدم البيضاء للفئران المعاملة بجرع 30,15,5 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد , إذ لوحظ ان مجموعة السيطرة السالبة اعطت حزمة بحجم جزيئي 9.8 كيلو زوج قاعدي اما عند معاملة الفئران بالسايكلوفوسفامايد فقد ادى الى ظهور مسحة تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي وكان مستوى التحلل 8.5 كيلو زوج قاعدي .

وقد يرجع سبب تحلل الـ DNA إلى ما ذكره Deneve وجماعته (1989) إذ ان السايكلوفوسفامايد يؤدي الى كسر وربط أشرطة الـ DNA (Cross-Linking) في الخلايا اللمفاوية لأشخاص مصابين باللوكيميا المزمنة وفي خلايا الفئران المصابة باللوكيميا المزمنة فضلاً عن خلايا نقي العظم للفئران الطبيعية . ولكن هذا لا يستبعد آليات أخرى لعمل هذا العقار كتلك التي أشار إليها Pieper وجماعته (1989) من حيث أن العقار له القدرة على الارتباط التساهمي مع مجموعة N_7 الخاصة بقاعدة الجوانين ومن ثم إيقاف الاستنساخ في هذه المواقع بتأثير الاتصالات المتكونة بين العقار وشريط الـ DNA فيشفر عن ذلك جزيئات RNA كبيرة منفصلة ومتميزة . إذ وجد ان السايكلوفوسفامايد يعمل على تحفيز الموت الخلوي المبرمج في الفئران المصابة بالسرطان إذ يعمل على اضافة مجموعة مثيل الى الـ DNA ويعمل كسور فيه ممايؤدي الى تجزؤ الـ DNA وتحفيز عوامل وانزيمات الـ Apoptosis , ان انزيم Caspase -3 هو انزيم ذو تخصص عالي لشطر

ثمالات حامض الاسبارتك والذي يمتلك فعالية محللة للبروتين (Protease) فهو يعمل على شطر البروتينات التي تشفر بوساطة الجين bcl-2 المضاد لعملية الموت الخلوي المبرمج (Chen *et al* ., 2007) .

يعمل انزيم Caspase – 3 على شطر مثبط الانزيم المحطم للـ (Inhibitor of DNA Caspase activated DNase) محرراً بذلك الانزيم المحطم للـ DNA (Caspase activated DNase) والذي يعمل على تجزئة شريط الـ DNA الى قطع نيوكليوسومية بحدود 180–200 زوج قاعدي مما يؤدي الى تكوين اجسام الموت الخلوي المبرمج Apoptotic bodies (Fan *et al* ., 2005) . كذلك وجد ان السايكلوفوسفامايد يعمل على تنشيط عمل الجين Caspase-3 في الخط الخلوي *in vitro* لسرطان الثدي MCF-7 ويعمل ايضاً على زيادة تشفير الـ mRNA الخاص بالجين Caspase-3 و يعمل هذا الجين على التشفير لانزيم Caspase-3 الذي يعمل على شطر (DNA Fragmentation Factor 45) وتحرير الانزيم القاطع الداخلي (DNA Fragmentation Factor 40) الذي يعمل على تجزؤ الـ DNA (Vegran *et al.,*2006) .

كذلك وجد ان السايكلوفوسفامايد يعمل على تحفيز انتاج Caspase-9 المايتوكوندري والذي يسبب تجزؤ الـ DNA ويعمل على فصل Caspase-3 و Caspase-7 من المادة الاساس الخاصة بكل منهما (Schwartz *et al.,*2001) .

وفيما يتعلق بتأثير تداخل المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح مع السايكلوفوسفامايد في تحلل الـ DNA فقد تم اختبار القدرة التثبيطية لمستخلص هذا النبات بما فيه من عناصر ومركبات بصورة مجتمعة ، إذ أن أحد الأهداف الرئيسة للبحث الحالي هو دراسة القدرة التثبيطية لمادة طبيعية تجاه المواد المطفرة والمسرطنة والذي يفضل أن يتم من خلال فحصها بصورة مجتمعة ، إذ تمتلك المثبطات تأثيرات تعاونية تعمل على مستويات مختلفة لضمان الوقاية في نطاق واسع ، ويحصل ذلك عندما تنشط المثبطات ميكانيكيات متشابه أو مختلفة في موقع خلوي واحد أو في مواقع خلوية مختلفة ومثال على ذلك مضادات الأكسدة في الغذاء (Wattenberg, 1980; Namiki *et al*., 1986; Hayutsu *et al*., 1988) .

وقد بين الجدول (4–7) ان المعاملة بالجرعة 5 ملغم /كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح في التداخل الاول له ظهور حزمة بحجم جزيئي 9.8 كيلو زوج قاعدي إذ لوحظ انخفاض مستوى التحلل مقارنة مع السيطرة الموجبة وهي حزمة مساوية لحزمة السيطرة السالبة بينما

ادى التداخل الثاني الى ارتفاع مستوى التحلل إذ لوحظ ظهور مسحة تراوحت بين 9.4 –7.2 كيلو زوج قاعدي في حين اعطى التداخل الثالث مسحة تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي وهي مساوية لمسحة السيطرة الموجبة . اما عند المعاملة بالجرعة 15 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح فقد ادى التداخل الاول الى ارتفاع مستوى التحلل الى مسحة تراوحت بين 9.4–6.3 كيلو زوج قاعدي اما التداخل الثاني فقد ارتفع مستوى التحلل الى مسحة تراوحت بين 9.4–5.6 كيلو زوج قاعدي, اما التداخل الثالث فقد ادى الى ظهور مسحة مساوية لمسحة السيطرة الموجبة وقد تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي . وعند المعاملة بالجرعة 30 ملغم/كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح فقد لوحظ ان التداخل الاول يؤدي الى ارتفاع مستوى التحلل الى مسحة تراوحت بين 9.4–4.6 كيلو زوج قاعدي اما التداخل الثاني فقد ارتفع مستوى التحلل الى مسحة تراوحت بين 9.4–4.9 كيلو زوج قاعدي اما التداخل الثالث فقد ادى الى ظهور مسحة وقد تراوحت بين 9.4–0.9 كيلو زوج قاعدي وهي مساوية لمسحة السيطرة الموجبة .

وبالحصول على مثل هذه النتيجة يمكننا تصنيف حبوب اللقاح كعامل مضاد للطفرة داخل الخلية (Antimutagenic) بالمرتبة الأولى ، فعند استخدام المستخلص قبل المطفر قد يعمل على غلق المواقع الحساسة في الـ DNA عن طريق الالتصاق بها ومنع المطفر من الارتباط معها .ثم كعامل مضاد للطفرة خارج الخلية (Desmutagenic) بالمرتبة الثانية إذ أن استخدام المستخلص مع المطفر مباشرة قد يعمل على منع الخلية من أخذ المطفر ومشتقاته من المتأيضات عن طريق تكوين معقدات معها وبالتالي طردها من الجسم ، أو قد يعمل على قطع التفاعل الذي يتم من خلاله التنشيط التأيضي وبالتالي منع تكوين متأيضات المطفر من أصولها (Kada *et al*., 1982; Kada *et al*., 1985; Deflora and Ramel, 1988) .

وقد يؤدي استخدام مستخلص حبوب اللقاح الى التقليل من ضرر الأكسدة الذاتية بواسطة بعض المكونات الكيماوية النباتية (Phytochemicals) الموجودة في الغذاء . إذ أشار Yu وجماعته (1994) أن المغذيات الدقيقة والتي تشمل فيتامين A ومشتقاته من الدهون الصناعية المحبة للماء و الـ Ascorbyl Palmatite وكذلك فيتامين E والبيتاكاروتين القدرة على تثبيط ارتباط مطفر الأفلاتوكسين مع DNA الخلايا الكبدية (Hepatocytes) في الوسط الزرعي كما أن فيتامين A والبيتاكاروتين قادران على حث أنزيم الكلوتاثيون الذي يكون مع المغذيات الدقيقة عوامل مضادة للأكسدة مهمة في التقليل من الأوكسجين الفعال .

أن الهدف من إجراء التراكيز الثلاثة بتداخلات ثلاثة في الدراسة الحالية هو عملية ضرورية لفهم الآلية التي يعمل بها المستخلص وتوضيح النقطة الحرجة التي يكون لها تأثيراً كبيراً في التقليل من أثر المطفر ، فمثلاً بعض المركبات الصناعية تلعب دور كعوامل مضادة للأكسدة والسرطان عند إعطائها قبل المطفر ولكنها تستحث السرطان عند إعطائها بعد المطفر خلال المرحلة التي تتم فيها عملية التطفير والتسرطن ، كما أن وقت إعطاء المثبط بالنسبة للمطفر مهم جداً من ناحية الاعتماد على المرحلة التي خلالها تمارس هذه المثبطات عملها وفعلها (Alekperov, 1982; Alekperov, 1984) .

هذا ومن الجدير بالذكر بأن Polsa وجماعته (2004) قد أشاروا في دراسة أجريت على نبات الكركم الى الدور الوقائي لمستخلص النبات ضد تلف الـ DNA لخلايا الدم اللمفاوية للإنسان المستحث بالمطفر Benzo [a] pyrene والذي يسبب كسور في شريط الـ DNA (DNA Strand breaks) ، فقد أجريت تلك الدراسة على عينة بشرية بعمر تراوح ما بين 25 – 45 سنة وبتطبيق اختبار Comet ، ولوحظ اعتماد التأثير المثبط للنبات على الجرعة والجنس وأن هناك علاقة بين تحلل الـ DNA ومستوى المغذيات الدقيقة كالبيتاكاروتين وفيتاميني A ، E في بلازما هؤلاء الأشخاص , كذلك يعمل المستخلص الايثانولي لاوراق نبات Neem على تعجيل عملية الموت المبرمج في الخط الخلوي السرطاني *in vitro* للبروستات PC-3 إذ يؤدي الى زيادة تجزؤ الـ DNA وان دراسة وصمة ويسترن بينت انخفاض مستويات بروتين bcl-2 المضاد لعملية الموت المبرمج وزيادة مستويات بروتين BAX الذي يحفز عملية الموت المبرمج (Kumar *et al.,*2006) . لقد بين Katiyar وجماعته (1992) قدرة الشاي الأخضر والذي يستخدم كشراب في قبائل الـ Himalayan في مدينة Sikkim الهندية على تثبيط ارتباط مطفرات (PAH_S) المعلمة باستخدام ^3He مع DNA الخلايا البشرية.

وقد تعمل المركبات الفينولية والبيتاكاروتينات الموجودة في حبوب اللقاح على تثبيط عمل إنزيم أكسدة الدهون (Lipoxygenase) بوصفها مركبات مضادة للأكسدة عن طريق تثبيط عمل الجين 5-lipoxygenase mRNA المعبر عنه بشكل عال (Over expressed) في الخلايا السرطانية , والذي يؤدي بدوره إلى تثبيط إنزيم Topoisomerase يتوقف نمو الخلية السرطانية وتدخل الى مرحلة Apoptosis (Hoernlein *et al.* , 1999).

ولكون حبوب اللقاح تحتوي على العديد من المركبات الفينولية فأن هذه المركبات تؤثر على الآلية السرطانية من خلال تثبيط فعالية الجين Bcl-2 ونتيجة للخلل الحاصل في هذا الجين تدخل الخلية

السرطانية مرحلة الموت الخلوي المبرمج ومثلما هو في العديد من الخطوط الخلوية *in vitro* لسرطان الدم البشري (Human Leukemic cell lines) (Pellechia and Reed, 2004) , ووجد أن لهذه المركبات أيضاً القدرة على التأثير السمي على سرطان البروستات (Prostate cancer) من خلال تثبيط العامل Vascular Endothelial Growth Factor VEGF المسئول عن عملية أساسية وضرورية لنمو وانتشار الخلية السرطانية وهي عملية تكوين الأوعية الدموية الجديدة (Angiogenesis) (Adhami *et al.* , 2003) .

وبسبب احتواء حبوب اللقاح على العديد من المركبات الفعالة كالفلافونيدات والفيتامينات فان لها القابلية على تحفيز عملية الموت المبرمج للخلايا السرطانية كما أشار Stauth (2007) الى ان الفلافونويدات تعمل على تحفيز الجسم على التخلص من المواد الضارة كما تعمل على تحفيز انزيمات الـ caspases لغرض التخلص من الخلايا السرطانية والمُطَفرة. وهذا التأثير يشابه تأثير بذور فول الصويا الحاوية على الفلافونات (التي هي من مشتقات الفلافونويدات) في تحفيز الموت الخلوي المبرمج في الخلايا السعترية (الحلفي ,2007).

كذلك بين ان الفلافونيدات والكلايكوسيدات بتراكيز 10 µM المعزولة من الدبس وقشور وبذور الحمضيات تمتلك فعالية مضادة للتسرطن في الخلايا السرطانية البشرية المستزرعة *in vitro* وتكون تأثيراتها على ايض السايتوكروم 450 وتثبيط تكوينه في الخلايا السرطانية (Poulse *et al.*,2004) .وايضاً أشار Cantero وجماعته (2006) ان للفلافونيدات الـ Quercetin والـ Luteolin القدرة على تثبيط عمل انزيمات Topoisomerase II , III الضرورين في عملية فل الشريط المزدوج للـ DNA في عملية تضاعف الـ DNA في الخط الخلوي السرطاني AA8 *in vitro* في الهامستر الصيني وبالتالي ايقاف عملية تضاعف الـ DNA وتحفيز عملية الموت الخلوي المبرمج .

وقد يكون لبعض الهرمونات تأثير مضاد للأكسدة ويؤدي دوراً مهماً في منع تجزؤ الـ DNA فقد أشار Karbownik و Reiter (2000) ان الميلاتونين (Melatonin) له دور مهم في منع التجزؤ الحاصل في الـ DNA المستحث بوساطة الاشعة المؤينة .

يعتقد ان حبوب اللقاح قد تعمل بفعل المكونات الفعالة على حجز الجذور الحرة وتفعيل الانزيمات المسؤولة عن حجز الجذور الحرة والتي من اهمها Superoxide dismutase و Catalase و Glutathione Peroxidase ومن ثم منع حدوث الارتباطات العرضية بين نفس الشريط او بين الشريطين وكذلك منع حدوث الثنائيات وبالتالي منع حدوث الطفرة .

2.3.5. دراسة معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران .

بين الجدول (4 – 8) متوسط معامل الانقسام لخلايا نقي العظم للفئران المعاملة بجرع 5 و15 و30 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح وجرعة 20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات , ،إذ أدت المعاملة بالسايكلوفوسفامايد الى خفض قيمة معامل الانقسام الى 8.28 مقارنة بالسيطرة السالبة التي بلغت 20.4 وقد بلغت قيم MI للتداخلات (قبل , مع , بعد) للجرعة 5 ملغم/كغم 20.2 , 18.86 , 8.6 على التوالي اما للجرعة 15 ملغم/كغم 14.1 , 13.5 , 8.14 على التوالي اما للجرعة 30 ملغم/كغم 10.34 , 10.08 , 8.5 على التوالي , ونلحظ ان الجرعة 5 ملغم /كغم قد ادت في التداخل الاول لها الى رفع قيمة معامل الانقسام باتجاه السيطرة السالبة بينما انخفضت قيمة معامل الانقسام في التداخل الثاني لها ونلاحظ ان التداخل الثالث من كل الجرع ادى الى انخفاض قيمة معامل الانقسام بدرجة تقترب من السيطرة الموجبة . ويلحظ ان الجرعة 5 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح في التداخل الاول (المستخلص قبل المطفر) من الجرعة 5 ملغم /كغم اعطت اعلى قيمة من الـ MI بالمقارنة مع بقية الجرع وهذه الجرعة ايضاً اعطت اقل نسبة تحلل في الـ DNA .

وبالحصول على مثل هذه النتيجة يمكننا تصنيف حبوب اللقاح كعامل مضاد للطفرة داخل الخلية فعند استخدم المستخلص قبل المطفر يعمل على غلق المواقع الحساسة في الـ DNA عن طريق الالتصاق بها ومنع المطفر من الارتباط معها ، بينما لم يؤثر إعطاء المستخلص مع أو بعد المطفر في رفع معامل الانقسام .

إن هذه النتائج تتفق مع نتائج الدراسات التي أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للمطفر سايكلوفوسفامايد في خلايا اللبائن من خلال تثبيطه معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم للفئران (Ataya *et al*., 1989) وتتفق ايضاً مع نتائج دراسات سابقة أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للمطفر مايتومايسين C على خلايا اللبائن من خلال تثبيطه لمعامل الانقسام خلايا نقي العظم للفئران عند استخدامه بجرعة 4 ملغم / كغم (Podder , *et.al.,* 2008) .

وفي دراسة أجريت لمعرفة مدى قدرة الدوبامين على علاج قلة خلايا الدم البيضاء (Leukopenia) المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد وجد أن حقن الاخير في الفئران الطبيعية ينتج عنه نقص في عدد خلايا الدم البيضاء إذ ينخفض من 11.8×10^3 / مل إلى 5.5×10^3 / مل و 4.0×10^3 / مل في اليوم الثاني والرابع على التوالي ، ووجد أيضاً أن هناك نقص شديد

في عدد خلايا الدم الحمراء إذ تصل نسبة النقص في اليوم العاشر إلى 43 % أما تأثيره على نخاع العظم فأنه يؤدي إلى انخفاض حاد في عدد الخلايا ذات الأنوية ، وهذا الانخفاض كان ملحوظاً خلال 48 ساعة إذ ينخفض عدد الخلايا من $19.1 \times 10^6 10$ إلى $3.8 \times 10^6 10$ (Ray *et al.*, 2000) .

وقد يرجع سبب رفع معامل الانقسام عند المعاملة بمستخلص حبوب اللقاح إلى قدرة الفلافونيدات الموجودة في حبوب اللقاح على تحفيز تكاثر خلايا B المناعية وتثبيط سايتوكروم الكبد P450 الذي من خلاله يتم تنشيط السايكلوفوسفامايد عن طريق تحويله إلى 4-hydroxy Cyclophosphamide وهو احد الاشكال الفعالة للمطفر داخل الجسم (Yang *et al.*, 2000) . وكذلك بين ان للمركب الفلافونيدي Quercetin القدرة على رفع معامل الانقسام في الخلايا السرطانية البشرية المستزرعة والتي ثبط معامل انقسامها بوساطة اوكسيد النتريك إذ يثبط الـ Quercetin مرحلة الـ Angiogenesis . (Jackson *et al.*,2006)

واشار Pathak وجماعته (2003) ان للريوتين Ruta6 (Rutin) المعزول من نبات *Ruta graveslens* تأثير محفز لـ MI في الخط الخلوي السرطاني HL-60 المستزرع إذ يعمل الريوتين على رفع قيمة معامل الانقسام .

3.3.5. دراسة التشوهات الكروموسومية في خلايا نقى العظم للفئران

وضح الجدول (4–9) التغيرات في معدلات تشوهات الكروموسومية (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة , إذ تبين بان الجرعة 5 ملغم / كغم في التداخل الاول والثاني أدتا الى حدوث اختلاف معنوي ($P < 0.01$) مقارنة مع السيطرة الموجبة, , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي. اما عند اجراء الجرعة 15 ملغم/كغم فقد تبين بان التداخل الاول والثاني ادى الى اختلاف معنوي , في حين اظهر التداخل الثالث عدم معنوية بإستثناء التشوه من نوع الكسر الكروماتيدي. اما الجرعة 30 ملغم/كغم فقد ادى التداخل الاول الى حدوث اختلاف معنوي بإستثناء التشوه من نوع الكسر الكروماتيدي , اما التداخل الثاني فقد كانت الفروقات معنوية

بإستثناء التشوه من نوع (الكسر الكروماتيدي و الكروموسوم الحلقي) , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى اختلاف معنوي .

وتتفق هذه النتائج مع نتائج الدراسات التي أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للمطفر سايكلوفوسفومايد في خلايا اللبائن من خلال حثه التغيرات الكروموسومية في خلايا النسيج الرأسي لأجنة الفئران (Pillans *et al*., 1989) وحثه التبادل الكروماتيدي الشقيقي لخلايا كبد الجرذان (Eckl *et al*., 1987) وتتفق أيضاً مع نتائج دراسات سابقة والتي أشارت إلى التأثيرات السمية والتطفيرية للمطفر مايتومايسين C في خلايا الفئران من خلال حثه التغيرات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفئران (Abou-Tarboush *et al*.,1999) . وأشار Ganguly و Bhattacharya (2006) من ان المبيد Profenofs يستحث التشوهات الكروموسومية (قلة المجموعة , زيادة المجموعة) في خلايا نقي عظم الفئران. كذلك وجد ان مادة الكافور (Camphor) تستحث التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للجرذان الحوامل عند استخدامها بالجرع 5 و 10 و20 ملغم / كغم وكلما زادت الجرعة زاد التشوه واشتملت التشوهات على كسور كروموسومية وكروماتيدية وزيادة المجموعة وقلة المجموعة واقتضاب (Alakilli ,2009) . ويماثل لما توصل إليه Unnikrishnan وجماعته (1990) إلى أن مستخلص الثوم له القدرة على تثبيط المطفر سايكلوفوسفومايد الذي يمتلك تأثير سمي على خلايا نقي العظم في الفأر الأبيض، ولما توصل إليه Umnova وجماعته (1991) إلى أن مستخلص نبات *Ginseng Callus* له القدرة على تثبيط المطفر مايتومايسين C الذي يمتلك تأثير تطفيري في رفع معدل التغيرات الكروموسومية والتبادل الكروماتيدي الشقيقي لخلايا نقي العظم للفأر الأبيض والهامستر .

كذلك أشار Nayak و Dixit (2008) من ان المستخلص الايثانولي والمستخلص الكلوروفورمي لنبات *Mucuna pruriens* له تأثيرات مخفضة للتشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الجرذان المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد . وايضاً أشار Raja وجماعته (2008) ان لمستخلص اوراق نبات الحناء (Henna) تأثيرات مخفضة للتشوهات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفئران المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد .

وايضاً يماثل مع ماذكره Khowi وجماعته (2007) من ان ان المستخلص المائي لنبات *Caryocar brasiliense* يعمل على تقليل التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفئران المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد بنسبة عالية (Khowi *et al.,*2007) . كذلك وجد ان مركب Cisplatin يعمل على استحثاث التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للجرذان التي

اشتملت على الكسور الكروموسومية والكروماتيدية وبالمقابل وجد ان زيت الزيتون (Olive oil) الغني بحامض الاوليك (Oleic acid) يعمل على تقليل تلك التشوهات (Evangelista *et al.,*2006) . وايضاً اشار Celikler وجماعته (2008) ان مستخلص النبات *Ulva rigida* يقلل التشوهات الكروموسومية في الخلايا اللمفية البشرية المستزرعة والمستحثة بوساطة المايتومايسين C.

ولكون حبوب اللقاح تحتوي على العديد من الفيتامينات فأنه من الممكن تقليل التشوهات الكروموسومية فقد بين Siddque وجماعته (2007) ان فيتامين C يقلل من التشوهات الكروموسومية من نوع كسر كروموسومي وكروماتيدي وسنترومير مزدوج في الخلايا اللمفاوية البشرية المستزرعة عند استخدامه بجرعة 20 مولاري والتي تستحث بوساطة المركب Norethynodrel بجرعة 60 ملغم / مل . كذلك وجد ان البيتاكاروتين له أثر تثبيطي للتشوهات الكروموسومية في خلايا نقي العظم للفئران المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد كذلك وجد نفس الاثر التثبيطي للتشوهات باستخدام فيتامين A والمستحثة بوساطة Benzo[a]pyrene (Flora *et al.,*1999) .

4.3.5. دراسة التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية للفئران

وضح الجدول (4–10) التغيرات في معدلات التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الفئران المعاملة بجرع (30,15,5) ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح و20 ملغم / كغم من السايكلوفوسفامايد في ثلاثة تداخلات مقارنة مع السيطرة الموجبة, إذ تبين بان الجرعة 5 ملغم / كغم في التداخل الاول والثاني أدتا الى حدوث اختلاف معنوي ($P < 0.01$) مقارنة مع السيطرة الموجبة , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى اختلاف معنوي, اما عند اجراء الجرعة 15 ملغم/كغم فقد تبين بان التداخل الاول والثاني ادى الى اختلاف معنوي , في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فروق معنوية .اما الجرعة 30 ملغم/كغم فقد ادى التداخل الاول الى حدوث اختلاف معنوي , اما التداخل الثاني فلم يؤدَّ الى فروق معنوية بأستثناء التشوه من نوع نطف فاقدة للرأس في حين لم يؤدَّ التداخل الثالث الى فرق معنوي باستثناء التشوه من نوع نطف فاقدة للذنب .

ويلاحظ ان الجرعة 5 ملغم / كغم من المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح في التداخل الاول (المستخلص قبل المطفر) اعطت اقل نسبة من التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية وهذه الجرعة ايضاً اعطت اقل نسبة تحلل في الـ DNA واقل نسبة من التشوهات الكروموسومية مقارنة بالجرع الاخرى . وهذه النتائج تتفق مع ما أشار اليه Rosangkima و Prasad (2008) الى ان المستخلص الميثانولي لساق نبات *Dillenia pentagyna* بالجرع (20 , 50 , 100) ملغم / كغم يقلل من تشوهات رؤوس الحيوانات المنوية المستحثة بوساطة Benzo [a] pyrene او Cisplatin واشتملت التشوهات على رأس صغير و ذيل مزدوج و فاقدة كلاب الرأس وفاقدة للرأس وقد اعطيت الجرع من المستخلص قبل المعاملة بالـ Benzo [a] pyrene او Cisplatin بـ 24 ساعة .

كذلك بين Bahmanpour وجماعته (2006) ان مستخلص حبوب لقاح النبات *Phoenix dactylifera* يعمل على تقليل التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الجرذان , وايضاً ذكر Asita وجماعته (2008)انه لزيت بذور الكتان وزيت بذور العنب تأثيرات مخفضة للتشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية المستحثة بوساطة السايكلوفوسفامايد في الفئران . كذلك أشير في دراسة حول تأثير الإعطاء طويل الأمد للـ Triptolide في عملية تكوين النطف والخصوبة لذكور الجرذان ، تبين ظهور تشوهات واضحة على النطف مثل انفصال الرأس عن الذيل وحدوث عدم تكثف كروماتيني قبل النضج لأنوية النطف وغياب كامل في الأغشية البلازمية للقطعة الوسطية للنطف مع اختلالات تنظيمية في أغشية المايتوكوندريا وتجمع لذيول النطف (Hua *et al*., 2000) . وفي دراسة للباحث Aguilar وجماعته (2002) لمعرفة مدى تأثير العلاج المزمن بالسايكلوفوسفامايد على النطف في ذكور الفئران وجد أن السايكلوفوسفامايد يسبب قلة في عدد الحيوانات المنوية وبطئ في حركتها وعدم التخصيب وكذلك وجد أن العلاج بالسايكلوفوسفامايد يختزل عدد الجينات في الخلايا الجنسية وهذا يظهر بوضوح عند التعرض المزمن للسايكلوفوسفامايد إذ ينقص مستوى الجينات المسؤولة عن الصفات المظهرية للحيوانات المنوية . كذلك وجد ان المـادة Phenytoin sodium بجرع 50 و 100 ملغم / كغم تعمل على استحداث التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية لذكور الجرذان وقد اشتملت التشوهات على نطف ذات رأس مزدوج ونطف ذات ذيل مزدوج ونطف فاقدة كلاب الرأس ونطف فاقدة للرأس (Rao *et al.*,2009) .

وايضاً وجد ان الجرعة 700 ملغم / كغم من مستخلص النبات *Punica granatum* تسبب العديد من التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية في ذكور الفئران والتي منها (فاقدة للرأس وفاقدة كلاب الرأس) وكانت نسبة التشوه عالية وتكافئ التشوه الذي يسببه السايكلوفوسفامايد بجرعة 40 ملغم / كغم (Sanchez-Lamar *et al.,* 2008). كذلك أشير الى ان السم الفطري افلاتوكسين (Aflatoxin) بجرعة 20 ملغم / كغم يسبب مختلف التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية والتي اشتملت (نطف صغيرة ونطف كبيرة ونطف فاقدة كلاب الرأس) وان المركب Toxy-nil يعمل على تقليل تلك التشوهات التي يسببها الفلاتوكسين بنسبة عالية (Hassanane *et al.,* 2009) .

ان المعاملة بالسايكلوفوسفامايد تؤدي الى تكوين انواع مختلفة من الجذور الحرة ومنها اصناف الاوكسجين الفعالة (Reactive Oxygene Species) التي تعمل على العديد من التشوهات في الحيوانات المنوية فقد اشار Griveau وجماعته (1995) الى ان لاصناف الاوكسجين الفعالة تأثير في تثبيط وظيفة المايتوكوندريا وخلل في صنع الـ DNA، وحدوث تغييرات في هيكل الخلية . وان لاصناف الاوكسجين الفعالة تأثير مباشر على خلايا سرتولي التي تلعب دوراً مهماً في عملية تكوين النطف Spermatogenesis ، وبالتالي التأثير في التركيب الخلوي لأرومات النطف Spermatids وحدوث التشوهات (Hipler *et al*., 2000). كذلك تؤثر اصناف الاوكسجين الفعالة على النطف من خلال التأثير في استجابة الجسيم الطرفي ، وتقليل حركة النطف ، وزيادة تركيز هيدروبيروكسيدات الدهون ، وفقدان الاحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة في غشاء النطف (Griveau *et al*., 1995). وتعزى معظم التفاعلات الناتجة عن الجذور الحرة الى تكسر البروتين وتجمعه وتثبيط الانزيمات ، وبيروكسدة الدهون وبالتالي تحطم غشاء النطف (Aziz, 2000) .

ولكون حبوب اللقاح تحتوي على العديد من مضادات الاكسدة كالفينولات والكاروتينات والاحماض الدهنية غير المشبعة وبعض الفيتامينات فأنه من الطبيعي ان تعمل على التقليل من تلك التشوهات في رؤوس الحيوانات المنوية . فقد أشار Sikka (1996) ان فيتامين C يحمي النطف من تحطم الـ DNA والبروتينات والدهون ويقلل من التشوهات التي يسببها الكرب التأكسدي للنطف ويحمي غشاء النطفة من التحطم ، ويقلل من تكوين بيروكسدة الدهون . كذلك وجد ان لفيتامين C القدرة على تقليل تشوهات رؤوس الحيوانات المنوية في ذكور الفئران المستحثة بوساطة المطفر *P*-dimethylaminoazobenzene (Surjyo and Anisura , 2004) . ايضاً أشار Yakubu وجماعته (2007) ان المستخلص المائي لنبات

Fodogia agrestis له تأثير على شكل النطف في الجرذان لاسيما عند استخدامه بتراكيز عالية اكثر من 50 ملغم / كغم .

اما بخصوص التداخل الثالث من كل جرعة فقد أشار السعدي (1996) إلى فشل الكفاءة التثبيطية لمستخلص التمر اتجاه التأثيرات السمية والتطفيرية للمطفر سايكلوفوسفامايد عند استخدام المستخلص بعد المطفر . ولما كانت الكفاءة التثبيطية لمستخلص حبوب اللقاح عند استخدامه بعد المطفر منخفضة ولأن استخدام المستخلص بعد المطفر يعمل على حث أنظمة الإصلاح في الخلية لإصلاح التلف بعد حدوثه ويعمل على حث الإنزيمات في بعض العضيات الخلوية والتي تزيل السمية وتساعد الخلية على الأمان والتضاعف والتقليل من الخطأ الوراثي والطفرة لذلك لا يمكن استخدام حبوب اللقاح كعلاج بعد أخذ المطفر بل يمكن استخدامه للوقاية من المواد المطفرة والمسرطنة وذلك عند أخذه قبل أو مع المطفر مباشرةً للتقليل من أضرار هذه المواد المطفرة والمسرطنة .

الاستنتاجات والتوصيات

الاستنتاجات Conclusions

1- وجود أكثر من مكون في المستخلص الميثانولي المائي لحبوب اللقاح .
2- امتلاك هذا المستخلص فعالية مضادة للأكسدة .
3- يمكن تصنيف حبوب اللقاح ضمن مثبطات المواد المطفرة التي تعمل داخل الخلية وخارج الخلية ، إذ نعتقد أنه يعمل داخل الخلية (antimutagenic) من خلال غلق المواقع الحساسة في الـDNA عن طريق الالتصاق بها ومنع المطفر من الارتباط معها، وخارج الخلية (desmutagenic) من خلال منع الخلية من أخذ المطفر و مشتقاته من المتأيضات عن طريق تكوين معقدات معها وبالتالي طردها من الجسم أو العمل على قطع التفاعل الذي يتم من خلاله التنشيط التأيضي للمطفر وبالتالي منع تكوين متأيضات المطفر من أصولها.
4- لمستخلص حبوب اللقاح قدرة عالية في تثبيط التأثيرات التطفيرية عند تناوله قبل ومع المطفر في التراكيز الواطئة ويمتلك المستخلص قدرة تثبيطية منخفضة اتجاه التأثيرات التطفيرية في التراكيز العالية وعند تناوله بعد المطفر .

التوصيات Recommendations

1- هنالك أهمية لاستخدام مستخلصات حبوب اللقاح المنقاة كمواد طبيعية وقائية مضادة للتطفير والتسرطن مما يؤهل إمكانية استخدامه للوقاية من فعل عوامل مطفرة ومسرطنة أخرى لذلك نوصي بتناول حبوب لقاح نحل العسل لكي يتسنى له اعتراض تلك التأثيرات الضارة في أي موقع ومرحلة ووقت .

2- فصل وتنقية ودراسة المواد الفعالة المهمة في حبوب اللقاح ذات الأثر الطبي والاستفادة منها كمواد منقاة .

3- إجراء دراسات لاحقة حول التأثيرات الممكنة لحبوب اللقاح في الجوانب الفسيولوجية والمناعية وغيرها .

4- إجراء دراسات أخرى موازية وشاملة لفحص التأثيرات المضادة للأكسدة والتسرطن لحبوب اللقاح ونباتات طبية اخرى تنبت في اماكن اخرى من القطر .

المصـادر العربيـة والأجنبيـة

المصادر العربية

الجنابي , أزهار محمود حليم (2004). دراسة تأثير بعض المستخلصات النباتية في الخلايا اللمفاوية لمرضى ابيضاض الدم النخاعيني المزمن . أطروحة دكتوراه , كلية العلوم , الجامعة المستنصرية.

الجريصي ، ياسر حسين زيدان (2007)، دراسة تأثير المستخلصات الخام لثمار ونوى تمر الزهدي *Phoenix dactylifera cultivar Zahdi* في تثبيط نمو بعض خطوط الخلايا السرطانية في الزجاج وفي علاج الغدة اللبنية المغروس في الفئران البيض. أطروحة دكتوراه ، كلية العلوم , جامعة بغداد.

السعدي ، محمد حمود . (1996) . تثبيط التطفير الوراثي لبعض المسرطنات الكيميائية باستخدام مستخلص تمر الزهدي . رسالة ماجستير , كلية العلوم ، جامعة بغداد .

الحلفي , جبار حميد. (2007). تاثير بذور فول الصويا في وظائف الكبد و ذوي خلايا الكبد والطحال والغدة السعترية في ذكور الجرذان المعاملة بنترات اليورانيل. اطروحة دكتوراه , كلية العلوم , جامعة بغداد .

الراوي , خاشع محمود . (2000) . مدخل الى الاحصاء . الطبعة الثانية . كلية الزراعة والغابات , جامعة الموصل .

المصادر الاجنبية

Abarca , N. A. , Campos , M.G. , Reyes , A.A. (2004) . Variability of antioxidant activity among honey bee – collected pollen of different botanical origin . J. Interciencia , *29* (10) : 574-578 .

Abou-Tarboush , F.M. , El-Ashmaoui , H.M. , Dafter Dar , M.Y . (1999) . Cytogenetic effects of mitomyci – C on fetal and adult mouse cells *in vivo* . J. Egyptian of Medical Sciences , *20* (2) : 463-474 .

Adhami,V.M. , Ahmed,N. and Mukhtar,H.(2003).Molecular target for green tea inprostate cancer prevention .J.Nutr.,*133*:2417-2424.

Aguilar – Mahecha, A. , Hales, B. F. and Robaire, B. (2002). Chronic cyclophosphamide treatment alters the expression of stress response genes in rat male germ cells. Biology of Reproduction, *66* : 1024 – 1032 .

Alakilli ,S.Y. (2009) . Evaluation of camphor mutagenicity in somatic cells of pregnant rats . J. Asian Biotechnol. ,*1*(3) :111-117 .

Albritton ,T.(2004) . The benefits of bee products revealed ,Vitamin Cottage Natural Grocers ,Inc., pp1-3 .

Alekperov, V. (1982). Antimutagens . In : Environmental Mutagens and carcinogens. Sugimura, T., Kondo, S. and Takebe, H. Eds. Liss, New York : 361 – 368 .

Alekperov, V. (1984). Antimutagensis : Theorotical and Practical aspects. Nauka, Mosscow.

Al. Hakkak, Z. S., Hamamy, H. A. and Hussain, A. F. (1986). Chromosome aberration in workers at astorage battery plant in Lrag. Mut. Res., *171* : 53 – 60 .

Aliyazicioglu ,Y. , Deger ,O. , Ovali , E. , Barlak , Y. , Hosver , I. , Tekelioglu , Y. and Karahan ,S.C. (2005) . Effect of Terkish pollen and propolis extracts on respiratory burst for K-562 cell lines . J. Int. Immunopharmacol. , *5*(11) : 1652-1657 .

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

Almas ,K.. , Mahmoud ,A. and Dahlan ,A .(2001) .A comparative studlorofory of propolis and saline application on human dentin . Indian J. Dentist Resourch , *12* : 21-30 .

Almeida-Muradian,L. B. , Pamplona, L. C. , Coimbra, S. and Barth, O. M. (2005) .Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. J Food Composition and Analysis, Madison, *18* (1) :105-111.

Al-Mustafa , A.H. and Al-Thunibat ,O.Y.(2008). Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes . J. Pakistan of Biology Science , *11*(3) : 351-358 .

Al-Shagrawi , R.A.(1998) . Enzyme activities , lipid fractios and fatty acid composition in male rats fed palm pollen grains (*Phoenix dactylifera*) .J. Res . Bult ., *79*:5-18 .

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

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

Atsuya, H., Asamoto, M., Hokaiwado, N., Hojo, K., Kazuga, K., Kenjiro, K., and Tomoyuki, S. (2004). Inhibitory effects of soy isoflavones in rat prostate carcinogenesis induced by 2 – amino – 1 – methyl – 6 – phenylimi dazo [4 , 5–6]. .J. Carcinogenesis ., *25* (3) : 381 – 387 .

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

Azuine, M. A., Goswami, U. C., Kayal, J. J. and Bhide, S. V. (1992). Antimutagenic and anticarcinogenic effects of carotenids and dietary palm oil .J. Nutr . Cancer , *17* (3) : 287 – 295 .

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

Bauchinger, M., Schmid, T. and Dresp, J. (1983). Quantitative analysis of the chromosome damage at first division of human lymphocytes after radiation. Rat. Environ. Biophys., *22* : 225 – 229 .

Ben-Yehuda, D. , Krichersky, S. and Caspi, O.(1996). Microsatellite instability and P53 mutations in therapy related leukemia suggest mutator phenotype. Blood , *88*:.4296 - 4303.

Bhunya, S. P. and Behera, B. (1988). Mutagenicity assay of opp, monocrotophos in mammalian *in vivo* test systm. cytologia, *53* : 801 – 807 .

Boukraa ,L. , Amara ,K. and Aggad ,H. (2006) . Syneristic effect of starch on the honey antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* . J. Pharma ., *12* : 22-31 .

British herbal pharmacopeia. (1983) . British herbal medicine association .pp244-245.

Brown ,R.(1994) Bee pollen : the perfect food . AKA the arthritis trust of America ., p 878 .

Budavari, S.(1989).The Merck index –Encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals .Rahway,NewJersey , Merck and co , Inc., p429.

Buck ,A.C. ; Cox ,R. and Rees ,R.W.(1990). Treatment of outflow tract obstruction due to benign prostatic hyperplasia with the pollen extract . J. cernilton.Br., *66*:398-404 .

Cai, Y. J., Dai, J. Q., Fang, J. G., Ma, L. P., Hau, L. F., Yang, L. and Liu, Z. (2002). Antioxidant and free radical scaveng- ing effects of ecdyesteroids from. serratule strangulate .J. Rev. can . Physiol pharmacol ., *80* (12) : 1187 – 1194 .

Cantero ,G. , Campanella ,C. , Mateos ,S. and Cortes ,F. (2006) .Topoisomerase II inhibitions and yield of endoreduplication induced by the flavanoids luteolin and quercetin . J. Mutagenesis ,*21*(5):321-325 .

Carpes , S.T. , Begnint ,R. , Alencar S.M. , Masson , M.L. (2007) . Study of preparations of bee pollen extracts antioxidant and antibacterial activity . J. Cienc ., *31*(6):1818-1825.

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

Chase , C. , Hoppe , J. Garner , M. (2001) . Antioxidant activity of bee pollen due to its polyphenol content . J. Herb Clip ., *22* (2) : 171-174 .

Chen, M.; Guerrero, A.; Huang, L.; Shabier, Z.; Pan, M.; Tan, T. and Wang, J. (2007). Caspase-9- induced mitochondrial disruption through cleavage of anti-apoptotic Bcl-2 family members. Biol. Chem. 282(46): 33888-33895.

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

Crane ,E.(1990). Bees and beekeeping : science ,practice and world resource . Comstock Publ . Ithaca ,New York .U.S.A. p593 .

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

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

Dauksas, E., Venskutonis, P. R., Povilaitytem, V. and Sivik, B. (2001). Rapied screening of antioxidant activity of sage (Salivia of ficinalis

L.). Extracts obtained by supercritical carbon dioxide at different extraction conditions .J. Nahrung ., *5* : 338 – 341 .

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

Deneve, W., Valeriote, F., Edelstein, M., Everett, C. and Bischoff, M.(1989). *In vivo* DNA cross – linking by cyclophosph- amide : Comparision of human chronic lymphatic leuke- mia cells with mouse L1210 leukemia and normal bone marrow cell. Cancer Res., *49* (7) : 1660 – 1664 .

Deuster ,P. , Maier ,S. , Moore ,V. , Paton ,J. , Simmons ,R. and Vawter ,S. (2004) .Dietary supplements and military divers a synopsis for undersea medical officer . Uniformed Services University of the Heart Sciences . pp: 16-18.

Drew , J.E. , Arther , J.R. , Farquharson , A.J. , Russell , W.R. , Morrice , P.C. and Duthie , G.G. (2005) . Salicylic acid modulates oxidative stress and glutathione peroxidase activity in the rat colon . J. Pharma ., *70* (6) :888-893 .

Eckl, P., Strom, S., Michalopoulos, G. and Jirtte, R. (1987). Induction of sister chromatid exchange in cultured adult rat hepatocytes by acting mutagens. Carcinogenes, *8* (8) : 1077 – 1083 .

El-Desoky, G.E. , Ragab, A.A. , Ismail, S.A. and Kamal, A.E. (1995). Effect of palm-pollen grains *phoenix dactylifera* on sex hormones, proteins, lipids and liver functions . J. Agric. Sci. Mansoura Univ., *20*:4249-4268.

El-Nahas, S., Hondt, H. and Ramadan, H. (1988). *In vitro* evaluation of the genotoxic potential of curacron in somatic cells of mice .J. Environ. Mol. Mutat ., *11* : 515 – 522 .

El-Siddig,K. , Gunasena ,H.P , Prasad ,B.A. , Pushpakumara ,D.K. , Ramana ,K.V. , Vijayanand ,P. and Williams J.T.(2006). Tamarind, *Tamarindus indica*. Southampton Centre for Underutilised Crops, Southampton, UK.

Eraslan , G. , Kanbur , M. and Silici , S. (2009). Evalution of protective effect of bee pollen against propoxur toxicity in rat . J. Food Chem. Toxical., *47*(1) : 86-91 .

Evangelista ,C.M.W. , Antunes ,L.M.G. and Bianchi ,M.L.P. (2006) . *In Vivo* effects of multiple doses of dietary vegetable oils . J. Genetics and Molecular Biology ,*29* (4) :730-734 .

Evans, H. J. and Oriordan, M. L. (1975). Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberration in mutagen test.J. Mut. Res. *31* : 135 – 148 .

Fan, T.; Han, L.; Cong, R. and Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. Acta Biochemica *et* Biophysica Sinica, 37(11): 719 -727.

Ferrer, M., Sanchez Lamar, A., Fentes, J. L., Barbe, J. and Llagost- era, M. (2001). Studies on the ant mutagenesis of ohyilanthus orbicularis : Mecharisms involved against aromatic amines .J. Mut . Res ., *498* (2) : 99 – 105 .

Flora ,S. , Bagnasco ,M. and Vainio ,H. (1999) . Modulation of genetic and related effects by caratenoids and vitamin A in experimental models :machinistic issues . J. Mutagenesis , *14*(2) :153-172.

Flodin, N.W.(1988). Vitamin E. curr. Top .J.Nutr . Dis ., *20* : 59 – 91.

Gandhi ,G. and Singh ,R. (2007) . The single cell gel electrophoresis assay in peripheral blood lymphocytes of uterine cervix cancer patients .J. ICBBE., *2*(11) : 112-117 .

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

Ganger ,S.C. , Sandhir ,R. , Rai ,D.V. and Koul ,A. (2006) .Modulatory effects of *Azadirachta indica* on benzo(a)pyrene-induced forestomach tumorigenesis in mice . J. Word Gastroenterol , *12* (17): 2749-2755 .

Ganguly ,S. and Bhattacharya ,S. (2006) . Cytogenetic effects of pesticides in mice (*Mus musculus*) . J.Cytologia , *71*(4) : 419-423 .

Gilliam , M. , McCaughey ,W.F. and Winter , B . (1980) . Amino acid in pollen and nectars of citrus cultivars from honey bee colonies in citrus groves.J.Api.Res., *19* :64-72 .

Gray, J. L. AND Dugan, L. R. (1975). Inhibition of N-nitroso- amine formation in model food system. J. Food Sci., *40* : 981 – 984.

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

Habib ,F.K. (1995) . Identification of a prostate inhibitory substance in a pollen extract . Prostate , *26* : 133 – 139 .

Harris, C. (1979). Adelayed complication of cancer therapy.J. Cancer Nat. cacer Inst., *63* : 275 – 227 .

Hasgafvel, P. K. (1987). SEC and cell proliferation in cultured Lymphocytes of passively and actively smoking persons .J. Mut . Res. *190* : 215-222 .

Haskell, C. (1990). Cancer Treatment, 3rd ed. Philadelphia:W.B. Saunders CO.

Hassannane ,M.S. , Abdel-Aziz ,K.B. , Shebl ,M. , Amer ,M. and Abdel-Maksood ,A. (2009) . Genotoxic study on two mold inhibitors widely

used in Egypt ,effect on germ cells . J. Res. Cell and Mol. Biol. ,*3*(1) :1-11 .

Hayatsu, H., Arimotom, S.and Negishi, T.(1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Mut. Res., *202* : 429 – 444 .

Hegazi ,A.G. and Abd El-Hady .(2007) . Influence of honey on the suppression of human low density lipoprotein (LDL) peroxidation (*In vitor)* .J. eCAM .*6*(1) :113-121 .

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

Hoernlein,R.F. , Orlikowsky,T. , Niethammers,O. , Sailer,E.R. , Simmer,T. , Danneeker,G.E. and Ammon,H.P.T.(1999).Acetyl-H-Keto-β-Boswellie Acid induces apoptosis in HL-60 and CCRF-CEM cells and inhibits topisomerase 1.J.Pharmacology, *288*:613-619.

Horn, R. C. and Vargar, V. M. F. (2003). Antimutagenic activity of extracts of natural substances in the *salbonella*/microsome assay mutagenesis .J.Pharm., *18* (2) : 113 – 118 .

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

Iarc (1975). Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Geneva, Switzerland: World Health Org .J. Inter Agency for Research on Cancer, *5*(121): 135- 156.

Iarc ,A.(1987).Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man. Geneva : World Health Organizatien. International Agency for Research on Cancer . J. Multivolume Work , *9* (137):196 – 205.

Ibrahim, A.I.S.(2005) . Effect of Crude Extracts of *Slavia triloba* L.F. on Neoplastic , Transformnig and Normal cell Lines. Ph.D. thesis, College of Science , Baghdad University.

Intigot, Y., Kinouchi, T., Kataoka, K., Arimoc, H., Kuwahara, T., Vinitke, V. and Ohnis, Y. (2002). Anti mutagen city of murdannia ioriformis in the *salmonella* azoxy methane induced DNA methyl lation and aberrant crypt focus formation in male F344 rats .J. Med . Invest ., *49* : 25 – 34 .

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

Janssen ,A .M.(1986) Screening for antimicrobial activity of some essential oils by the agar overlay technique. Pharmaceutisch Weekblad, , *8*:289–292.

Jellin ,J.M. , Gregory ,P. , Batz ,F. and Hitchens ,K. (2000) . Prescriber 's letter natural medicines comprehensive database. Therapeutic Researches Faculty . 3th ed.New York. pp 100-101.

Junshi , C. (1992).The antimutagenic and anticarcinogenic effect of tea , garlic and other natural foods in China : a review .J.Biomed .Enviro.Sci ., *5* : 1-17.

Jensen ,B.(2005) Bee pollen and antioxidant activity . J. Uncle Harry s Bee Pollen . 1-5 .

Kada, T., Inoue, T.and Namiki, M.(1982). Environmental desmuta- gens and antimutagens. In : Environmental mutagenesis and plant biology. Klekowski, E. J. (Ed.). Praeger, New York :137 – 151 .

Kada, T., Inoue, T., Ohta, T. and Shirasu, Y. (1985). Anti-mutagens and their modes of action. In : Anti-mutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms. Shankel, D. M., Hartman, P. E., Kada, T. and Hollaende, A. (Eds). Basic Life sciences, plenum, New York, *39* : 181 – 196 .

Karbownik ,M. and Reiter ,R.J. (2000) .Antioxidant effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation.J.P.S.R.M.,*225*:9-22.

Katiyar, S. K., Agrawal, R., Wang, Z. Y., Bhatia, A, K. and Mukhtar, H. (1992). Epigallocation-3-gallate in *camellia sinensis* leaves from himalayn region of sikkim : Inhibit- ory effects agains biochemical events and tumer inhibition in sencar mouse. J. Nutr. Cancer, *18* (1) : 74 – 83 .

Kawabata, T. and White, K. (1988). Enhancement of *in vivo* and *in vitro* murine immune response by the cyclophosphamide metabolite acrolien. Cancer Res., *48*(1) : 41- 45.

Kerel ,R. (1996) . Value – added products from bee keeping .FAO Agricultural Services Bulletine .Roma.pp 87-115 .

Khouri , J. , Resck , I .S . , Pocas- Fonseca , M . , Sousa , T . M .M . , Pereira , L . o . , Oliverira , A . B .B . and Grisolia , C . K . (2007) .Anticiclastoyenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*caryocar brasiliense* camb) .J. Genetics and Molecular Biology , *30* (2) :442-448 .

Koehler , K.J. , Birt , D.F. (2000) . Cell cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell line .J. Carcinogenesis , *28* : 102-110 .

Kram, D., Schneider, E. L., Senula, G. G. and Naknishi, Y. (1979). Spontaneous and mitomy-C induced sister chromatid exchanges. Comparison of *in vivo* and *in vitro* systems. Mut. Res., *60* : 339 - 347.

Krichah ,R. , Rhouma ,K.B. , Hallegue ,D. ,Tebourbi ,O. , Joulin ,V. , Couton ,D. and Sakly ,M. (2003) . Acute cadmium administration induced apoptosis in rat thymus and testicle ,but not liver . J. Polish of Environmental Studies . *12* (5) : 589-594 .

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

Kumar ,S. , Suresh ,P.K. , Vijayababa ,M.R. , Arunkumar ,A. and Arunakaran ,J. (2006) . Anticancer effects of ethanolic neem leaf extract on prostate cancer cell line (PC-3) .J.Ethnopharmacol.,*105*(2) : 246-250.

Kwon, C., Maddison, K., Lacastro, L. and Broch, R. (1987). Accelerated decomposition of 4-hydroxy cyclophospha- mid by human serum albumin. Cancer Res.,*47*(6):503-608.

Lant, B. H., Tadi, P. P. and Task, J. M. (1990). *Alium sativum* (garlic) and cancer prevention .J. Nutr . cancer , *10* (4) : 937-948 .

Lapre, J. A.(1992). Dietary calcium as possible and promoter of colon carcinogenesis ,J.Ede., *45* : 18 - 24.

LeBalance ,B.W. , Davis ,O.K. Boue ,S. Delucca ,A. and Deeby ,T. (2009). Antioxidant activity of sonoran desert bee pollen .J. Food Chemistry , *115*:1299-1305 .

Lee, B. M., Lee, S. K. and Kim, H. S. (1998). Inhibition of oxidative DNA damage, 8-ohdg.and carbonyl cotent in smokers treated with antioxidants (Vitamin E, C, beta-Carotene and red ginseng). J . Cancer Lett., *132*(1-2) : 219-227.

Lewis, R. (1993). Hawley's condensed chemical dictionary 13th ed. New York, NY; John Wiley and Sons, Inc.p327.

Lewis, R. (1997). Hawley's condesed chemical dictionary 12th ed. New York; John Wiley and Sons, Inc.p327.

Littlefield, L., Colyer, S. and Dufrain, R. (1980). Comparison of SCE in human lymphocyte after exposure to MMC *in vitro*, and *in vivo* .J. Mut . Res ., *67* : 191-195 .

Litte, S. and Mirkes, P.(1987). DNA cross-linking and single strand break induced by teratogenic concentraion of 4-hydroxycyclophosphamide and phosphoramide mustard in postimp;antation rat embryos. Cancer Res., *47* (20) : 5421-5426.

Liu , J. , Shen , H.M. , Namong , C. (2000) . *Saliva miltiorrhza* inhibits cell growth and induced apoptosis in human hepatoma Hep-G2 cell .J. Cancer Letters , *153* : 58-93 .

Loget ,M. , Demo ,M. , Wallet ,J.C. , Gaydou , E.M. , Girand ,H. and Dumnil ,G. (2008) .Antimutagentic activity of 24 synthesis flavones with the *Salmonella typhimerium* microsomal assay .J. Archives of Pharmacol. Res., *18*(6) :415-422 .

Lopez-Lazaro,M.(2002).Flavonoids as anticancer agents : Structure – activity relationship study .J. Curr. Med.Chem.,*2*:691-714.

Lugo, M. H., Rouchfuss, H. S., Zakour, H. R., Allen, J. W. and Hozier, J. C.(1989). Evidence for chromosmal replicos on units of sister chromatid. Exchange.J. Article, *98* : 69-76.

Malencic, D., Gasic, O., Popvoic, M. and Baza, P. (2000). Screening for antioxidant properties of *salvia reflexa* hornem phyto-ther .J.Res ., *14* (7) : 546-548.

Malh, P. K. and Grover, I. S.(1987). Effect of OPP. Mut. Res. *188* : 45-51.

Mandal , M. and Jaganathan ,S.K. (2009) . Antiproliferative effects of honey and of its polyphenol . J. Biomed Biotechnol ., *237*(3):207-214.

Marjori, L. C., Teixeria, R. O., Mantovani, M. S. and Vicentini, V.E.P.(2001). Efects of mayternus ilicifolia mart. And bauhinia candi cans benth infusions on onion tip and rat bone-marrow cells .J. Genetics and molecular Biology , *25*(1) : 85 – 89 .

Martin ,P. , Lorente ,G. , Hortiguela ,V. and Carretero ,L. (2006) . Influence of different pollen conservation conditions ,preliminary studies . Bee Research Institute Dol. , p:112-113 .

Medeiros ,K.C. , Figueiredo ,C.A. , Figueiredo ,T.B. , Freire ,K.R. , Santos ,F.A. , Silva ,T.M. and Piuvezam ,M.R. (2008). Antiallergy effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin – sensitized mice .J. pubmed ., *119*(1):41-60 .

Merck ,K.(1983). Merck index, Rahway, New Jersey; Merck co., Inc . p 439.

Michael ,C.(2004) Chemotherapy of cancer . American College of Rhematology . 2th ed.NewYourk ., p.127.

Moura ,A. C. G. , Perazzo , F.F. and Maistro ,E.L. (2008) . The mutagenic potential of *clusia alata* (clusiaceae) . extract based on two short – term *in vivo* assay . Genetics and Molecular Research , *7*(4) : 1360 – 1368 .

Muneera. A; Lulu.A ;Zainab .A and Osama.K. Cytogenetic study in cases with recurrent abortion in Saudi Arabia .J. Ann Saudi. Med 2000 ., *20*(3):233-236 .

Miura, K., Morimoto, K. and Koizumi, A. (1983). Proliferation kinetices and MMC-induced chromosome damage in fanconis anemia lymphocytes. Hum. Genet., *63* : 19-23.

Muniategui ,S. , Simal ,J. , Huidobro ,J.F. and Garcia ,M. (1989) . Study of the fatty acids in bee – collected pollen .J. Grasas Y. Aceites . *40* (2) : 81-86 .

Najai ,T. , Inoue ,R. , Suzuki ,N. , Tanoue ,Y. , Kai ,N. and Najashima ,T.(2007). Antihypertensive activities of enzymatic hydrolysates from honey bee collected of *Cistus lodaniferus* . J. of Food Agricultural & Environment , *5*(4):86-89 .

Namiki, M. and Osawa, T. (1986). Antioxidants and antimutagens in food. In : Antimutagenesis and anticrcino- genesis mechanisms. Shankel, D. M., Hertman, P. E., Kada, T. and Hollaender, A. (Eds.). Basic Life science, plenum, New York.

Naranjo ,R. , Sanchez ,J. , Paramas ,G. and Gonzalo ,J. (2004). Analysis of bee pollen pigments by HPLC and mass spectrum . J. of Chroma , *1054*(1):205-210.

Nayak ,S. and Dixit ,V.K. (2008) . effect of *Mucuna pruriens* seed extracts on drug induced myelosuppression test using albino rats . J. Research of Pharmacy and Technology , *1*(3) : 204 – 210 .

Nishimura, K., Matsumiya, K., Tsujimura, A., Koga, M., Kitamura, M. and Okugama, A. (2001). Association of selenoprotein P with testosterone production in cultured leydig cells.J. Arch. Androl., *47*: 67-76.

Osakabe, N., Akiko, Y., Midori, N. a, d. toshikaza, Y. (2004). Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses : Anticarcinogenic effect of perilla frutescens extract in the murine tow-stage skin model .J. Carcinognesis , *25* (4) : 549-557.

Osol, A.(1980). Reminington's pharmaceutical sciences . Easton,Pennsy – lvania:Mack Publishing Co. 16th .p1087.

Owayss ,A.A. , Rady, M.M. , Gadallah , F.M. (2004) . Pigmentation of some honey bee *Apis mellifera* L. products . J. Fayoum , *18*(2)121-130 .

Pathak ,S. , Multani ,A.S. , Banerji ,P. and Banerji ,P. (2003) .Ruta 6 selectively induces cell death in brain cancer cells but proliferation in normal peripheral blood lymphocytes : a novel treatment for human brain cancer . J. International of Oncology ,*23*:975-982..

Pellechia,M. and Reed,J.C.(2004).Inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family Proteins by cancer chemoprevention and chemotherapyCurr.J.Pharm. Des.,*10*:1387-1398.

Pieper, R., Fustcher, B. and Erickson, L. (1989). Transcription terminating lesions induced by bifunctional alkylation agents *in vitro*. Carcinogenesis, *19*(7) : 1307-1314.

Pillans, P., Ponz, S. and Parker, M. (1989). Cyclophosamide induced DNA strand breaks in mous embryo cephalic tissue *in vivo*. J.Carcinogenesis, *10* (1) : 83 - 85.

Pincott ,I.(2005). Prostate cancer Prevention and treatment .J. Naturopathic , *4*(3):1-3 .

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

Pooder , S. , Chattopadhyay ,A. , Bhattacharya , S. (2008). *In vivo* suppression fluoride of chromosomes aberration induced by mitomycin – C in mouse bone marrow cells . J. Fluoride . Res ., *41* (1) : 40-43 .

Poulse ,S.M. , Meyer ,R.T. , Nair ,S. , Pike ,L.M. and Patil ,B.S. (2004) .Inhibitory effect of citrus limonoids and flavanoids on human CPY 450 isoforms . J. Rio.Grand Val. Hor.Soci., *12*:52-61 .

Prabhu , B.K. , Gowri , B. , Muthurelu , K. , Venkatachalam , P. , Paul , S.F. , Jayanth , V.R. (2004) . Effect of 2-deoxy –D- glucose on the induction of chromosomal aberrations in lymphocytes to exposed in vitro to gamma radiation at a dose rate of 1.0 Gy / minute . J. International of Human Genetics ., *4* (1) : 45-49 .

Prateungsri, S. (1989). Effect of solvent fraction of some anti-carcinogenic plants on the alkaline activity of ethyl methan sulfonate .J. Thai . Agric. Res ., *7* (1-3) : 27-33 .

Pratt , D . E . and Miller , E . E . (1984). A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts . JAOCS., *61*(6) : 1064 – 1071 .

Prifer, V.(1984). Characterization of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. In : Advanced molecular genetics. Spring- erverlage, Berline ,P 26-37.

Promega Com. USA . Wizard Genomic DNA Purification Kit . (2005) .

Radziszewska ,E. , Katarzyna ,P. , Bielak-Zijewska,A. Skierski ,J. and Sikara ,E. (2000). Effect of aging on UVC – induced apoptosis of rat splenocytes . J. Acta. Biochimica. Polonica, *47* (2) :339-347 .

Raja ,F.V. , Agrawal ,R.C. and Ovais ,M . (2008) . Evaluation of antimutagenocity effect of *Lawsonia inermis* (henna) leaf extract in swiss albino mice . J. Research of Pharmacy and Technology ,*1*(3) : 278-284 .

Rao ,Y. , Kuradi ,L.B. and Paul ,V. (2009). Effect of phenytion sodium on reproductive parameters in adult male wister rats . J.Kuw.Med. , *41*(1) :43-51 .

Ray, M. R., Lakshmi, C., Deb, C. and Pal, B. (2000). Dopamine accelerates recovery from cyclophosphamide-induced leukopenia. Experimental On cology, *22* : 153-156 .

Reynolds, J. and Prassad; A. (1982). Martindale .The Extra Phrmacopeia .28th .ed. London: The Pharmaceutical Press , p199.

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

Roman ,D. , Zurek ,G. , Babmann ,C. , Abarca , N. , Quirantes ,R. , Carretero , A. and Guterrez ,A. (2007). Identification of phenolic compounds from pollen extracts using capillary electrophoresis – electrospray time of flight mass spectrum . J. Arial Bioanal Chem ., *389*:1909-1917.

Rosangkima ,G. and Prasad ,S.B. (2008) . Inhibitory effect of *Dillenia pentagyna* stem bark extract of cisplatin and benzo[a]pyrene – induced mutagenicity . J. Canadian of Pure and Applied Sciences , *2* (2) : 381-387 .

Saly, H.(2002). Small Animal Oncology;The chemical perspective . J. Nova Scotia. Agricultural College ., *25*(3) : 2-16 .

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis. T. (1989). Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Labora- tory, Cold Spring Harbor, N.Y. p:65.

Sanchez-Lamar ,A. , Fonseca ,G. Fuentes ,J.L. , Cozzi ,R. and Cundari ,E. (2008) . Assessment of the genotoxic risk of *Punica granatum* L. (punicaceae) whole fruit extracts . J. Ethanopharmacology , *115* :416-422 .

Sartippour, M.R, Heber, D. , Ma, J., Lu, Q., Go, V.L. and Nguyen, M. (2001). Green tea and its catechins inhibit breast cancer xenografts. J.Nutriton and Cancer, *40*(2): 149-156.

Sato, T., Onse, Y., Nagase, H. and Kito, H. (1990). Mechanism of antimutagenicity of aquatic plant extracts against (benzo (a) yrene) in the *Samonella* assay .J. Mut. Res ., *241*:283-290 .

Schwartz ,P.S. and Waxman ,D.J. (2001) . Cyclophosphamide induces caspase – 9 dependent apoptosis in 9L tumor cell . J.Mol . Pharmacol. , *60*:1268-1279.

Shawer ,M.B. , Ali ,S.M. , Abedllatif ,M.A. and El-Retai ,A.A. (1987) . Biochemical studies of bee – collected pollen in Egypt ,2 fatty acids and non-saponifiable . J. Api. Res. , *26* (2): 133-136 .

Shubber, E. K. (1981). The genetic hazard of ten antiparasitic drugs compared to radiation. Ph. D. Thesis, Harvard Univ., cambridge, U. S. A :p 28.

Shubber, E. K. and Al-Allak, B. M. (1986). Spontaneous chromosomal aberration and SCE in human Lymphocytes.effect of culture conditions. J . Nucleus, *22*:92-98 .

Siddique ,Y.H. , Beg ,T. and Afzal ,M. (2007) . Anticlastogenic effects of of ascorbic acid against the genotoxic damage induced by norethynodrel . J. Adv. Environ. Biol. ,*1*(1) :27-32 .

Sikka, S.C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. J.Forntiers in Bioscience, *1*: 78-86.

Silva ,T.M. , Camara ,C.A. , Lins ,A.C. , Agra ,M.D. , Silva ,E.M. , Peis ,I.T. and Freitas ,B.M. (2009). Composition , botanical evaluation and screening of radical scavenging activity collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uracu-amarela). J. An. Acad. Bras. Cienc. , *81*(2):173-178 .

Slovinska ,L. Kropacova ,K. Kolesarova ,M. and Misurova ,E. (2001) . Effects of combined treatment of rat with cadmium and ionizing radiation on nucleic acids in the kidneys ,liver and haemopoietic organs . J. Folia . Biologica ., *47* :92-100 .

Sobti, R. C., Krishan, A. and Pfaffenberger, C. D (1982). Cytok- inetic and cytogenetic effects of some agricultural chemi- cals on human lymphoid cells *in vitro* : Organophates .J. Mut. Res ., *102* : 89-102.

Sram ,R.J. , Farmer ,P. , Garte ,S. , Kalina ,I. , Popov ,T.A. , Binkova ,B. , Ragin ,C. and Taioli ,E. (2009) . Effect of vitamin levels on biomarkers of exposure and oxidative damage –the expah study.J. Egy. Med.,*32*:77-82

Stauth, D. (2007). Studies force new view on biology of flavonoids. J.Eureka. Alert.,*3*:3-5

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

Stickl , H. (1980). Pollen – Kapsein neuer wegder behandlung von kindlichen pollinose erkrankungen . J. Sozial ., *2* : 65-67 .

Surjyo ,B. and Anisur ,K.B. (2004) . Protective action an antioxidant (L-ascorbic acid) against genotoxicity and cytotoxicity in mice during P-DAB induced hepatocarcinogenesis . J. India Cancer , *21* (2):72-80 .

Tang ,M. ,Xie ,Y. and Wang ,W. (2003). Effect of formaldehyde on germ cells of male mice .J.Sheng , *32*(6) : 544-548 .

Tang,W., Hemm, I. And Bertram, B.(2003).Recent development of antitumor agents from chinese herbal medicines, Part 1.Low Molecular compounds.J.Plant Med.,*69*:97-108.

Tang ,W. , Zhao ,L. and Zhong ,R. (2008) . Agarose gel electrophoresis and flurometric assay for the determination of DNA cross – linking induced by semustine . J. ICBBE., *2*(16-18) :322-325 .

Taper, H., De-Gerlache, J., Lans, M. and Foberfroid, M. (1987). Non-toxic potentiation of cancer chemotherapy by combined C. and k3 vitamin pre-treatment. Int. J. cancer, *40* (4) : 575-579.

Tjendraputra , E. , Tran ,V.H. and Liu –Brennan ,D. (2001).Effect of ginger constituent and synthetic analogues on cyclooxygenase -2 enzyme in intra cells.J. Bioorg.chem . , *29*(3):163-169.

Trevino ,C.L. , Felix,R. and Castellano ,L.E. (2004). Expression and differential cell distribution of low threshold Ca^{2+} channel in mammalian male germ cells and sperm .J.Febs.Lett.,*563*(1):87-92.

Umnova, N., Michrina, T., Smirnova, N., Aleksandrova, T. and Proshenko, G. (1991). Study of antimutagenic properties of bio-ginseng in mammalian cells *in vitro* and *in vivo* Bull.J. Eksp. Biol. Med., *111* (5) : 507-509.

Unnikrishnan, M., Soudam, K. and Kuttan, R. (1990). Chemopote- ction of garlic extract toward cyclophosphamide toxicity in mice. Nutr & Cancer. *13*(3) : 202-207.

Vegran ,F. , Boidot ,R. , Oudin ,C. , Riedinger ,T. , Bonnetain ,F. and Lizard-Nacol ,S. (2006) . Overexpression of caspase-3 splice variant in locally advanced breast carcinoma is associated with poor response to neoadjavant chemotherapy . J. Clin. Cancer Res., *12*(19) : 5794-5800.

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

Wang , W. , Heideman , L. , Chung , C.S. , Pelling . J.C. , Koehler , K.J, Birt , D.F. (2000) . Cell cycle arrest at G2/M and growth inhibition by apigenin in human colon carcinoma cell line .J. Carcinogenesis , *28* : 102-110 .

Wattenberg, L. W. (1980). Inhibitors of chemical carcinogens. J. Environ. Pathol. Toxical., *3* : 35-52.

Wilmer, J., Erexson, G. and Kligerman, A. (1986). Attenation of cytogenetic by2-mercaptothanesulfonate in culture human lymphocytes exposed to cyclophosphamide and its reactive metabolites. Cancer Res. *46*(1) : 203-210.

Wizard Genomic DNA Purification Kit ,Promega com. ,USA .

Wojcicki, J. , Hinek, A. and Samochowiec, L. (1985). The protective effect of pollen extracts against allyl alcohol damage of the liver . J. Arch-Immunol-Ther-EXP-Warsz., *33*:418-41

Wojcicki, J., Samochowiec, L., Bartlomowicz, B., Hinek, A., Jaworska, M. and Gawronska, S. (1986). Effect of pollen extract on the development of experimental atherosclerosis in rabbits. J.Atherosclerosis. *62*:39-45.

Wu ,Y.D. and Lou ,Y.J. (2007) . A steroid fraction of chloroform extract from bee pollen of Brassica campestris induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells . J. Phytother. Res. , *21*(11) : 1087-1091.

Zhao, J. , Zhang, C.Y. , Xu, D.M. , Huang, G.Q. , Xu, Y.L., Wang, Z.Y., Fang, S.D., Chen, Y. and Gu, Y.L. (1990). The antiatherogenic effects of components isolated from pollen typhae .J. Thromb. Res. Mar., *57*:966-975.

Yang, C.and landau, J. (2000). Effects of tea consumption on nutrition and health. J. Nutr., *130* : 2409-2412.

Yakubu ,M.T. , Oladiji ,A.T. and Akanji ,M.A. (2007) .Evaluation of biochemical induces of male rat reproductive function and testicular histology in wister rats following chronic administration of aqueous extract of *Fodogio agrestic* (schweinf .EX Heirn) stem .J. African of Biochemistry Research ,*7*: 156-163 .

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

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

Yu, M. W. , Zhang, Y. L., Blanner, W. S.and Stalla, R. M. (1994). Influence of vitamin A,C and B-Carotenes on aflatoxin B1 binding to DNA in wood chuek hepatocytes. Cancer Res., *73*(3) : 596-604.

Summary

The current study was included the test of the activity of methanol water extract of pollen grains as an antioxidant and antimutagenicity. As it has been detected the harmful effects of drug and try to cyclophosphamide and try to reduce them by using this extract.

This extract has been described by using thin layer chromatography TLC . The results which showed the presence of more than one component of this extract when using multiple different liquid phases.When examining the activity of antioxidant betacarotene spray process .It was observed appearance of the antioxidant activity in several bands . The antioxidant activity was determinated for these bands through the retention of the color yellow, which indicates the existence of effective antioxidant in some components of pollen extract .

It has shown the type of electrophoresis for the DNA that extracted from white blood cells of mice. The treatment dose of 20 mg \ kg of the cyclophosphamide , a led to the appearance of a large smear and clear .The size of molecular ranging from 9.4-0.9 kilobase pair, which was where the level of fragmentation 8.5 kilobase pair compared with the negative control. The interaction at a dose of 5 mg \ kg for extract of pollen grains, it was noted that the levels of fragmentation of the DNA in the first , second and third interactions are (0 , 1.4, 8.5) kilobase pair respectively . The interaction at a dose of 15 mg \ kg, it was noted that the levels of fragmentation of the DNA in the first , second and third interactions are (3.1,3.8,8.5) kilobase pair respectively . The interaction at a dose of 30 mg \ kg, it was noted that the levels of fragmentation of the DNA in the first , second and third interactions are (4.8,5.3 8.5) kilobase pair respectively .This indicates that the interaction first, at a dose of 5 mg \ kg is the best in reducing the level of the crash in the DNA, followed by the second interaction, while the third interference did not cause at all doses of any touched positive changes to prevent crash DNA.

This has shown the results of a mitotic index (MI) that the average of MI cells of the bone marrow of mice that have been treated by doses (5, 15 and 30) mg \ kg of the extract of pollen grains and the dose of 20 mg \ kg of the cyclophosphamide in the three interactions . It reached the values of any of the interactions or (before, with, after) the dose 5 mg \ kg 20.2, 18.86, 8.6 respectively, The dose of 15 mg \ kg are 14.1, 10.08, 8.5 respectively. It was also noticed a significant difference ($P<0.01$) in the value of MI when comparison with first and second interactions of the first dose of the extract of pollen grains, and the first and second of the interactions from second dose of the extracted of the extract of pollen grains with the positive control, which led to the raising of the mitotic index.

With regard to the results of chromosomal abnormalities, it was shown that the dose of 5 mg \ kg in the first and second interactions led to a significant difference ($P<0.01$) compared with positive control. While the third interaction does not lead to significant difference . But when a dose of 15 mg \ kg has been shown that the first and second interactions led to the significant difference ($P<0.01$) .While the results of the third interaction is not significant .The dose of 30 mg \ kg, it led to the first and second interactions significant difference ($P<0.01$) , while the third interaction did not lead to significant difference .

when testing for abnormalities in sperm. It turns out that the dose of 5 mg \ kg in the first and second interactions led to a significant difference($P<0.01$) compared with positive control , while the third interaction did not lead to significant difference . At a dose of 15 mg \ kg showed the first and second interactions resulted in a significant difference . While the third interaction did not lead to differences. And at a dose of 30 mg \ kg the first and second interaction led to occurrence of significant differences ($P<0.01$) . While the third interaction does not lead to significant difference .

As a result of the present study, we can conclude that a methanol water extract of pollen grains has activity antioxidant and antimutagenecity when given before and with of mutagen and low doses in both somatic and germ cells.

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

The Study of Some Genetics effects For Pollen Grains Extract of Honey Bee in Male of White Mice

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

By
Bassim Kadhim Bresam Al Keisi

B. Sc. Biology / 2004

Supervised By
Pro..Dr. Ali Hmood Alsaadi Pro.Ass.Dr. Sattar Jassim Hatrosh

2010 A .D. **1431 A . H.**