جمهورية العراق

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة كربلاء/ كلية التربية للعلوم الصرفة

قسم علوم الحياة

دراسة خلويه وراثية لتأثير عقار الازثرومايسين على المعايير الفسلجية والنسجية والدور الوقائي لفيتامين C في ذكور الجرذان (*Rattus Norvegicus*)

رسالة مقدَّمة إلى
مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء
وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير
في علوم الحياة – علم الحيوان.

من قبل

حاتم كريم جساب

بكالوريوس علوم الحياة 2013 / جامعة كربلاء

إشراف

أ.د. ياسمين خضير خلف الغانمي **م.د.علاء حسين مهدي الصافي**

1442 هـ **2021م**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

" إِنَّ رَبَّكُمُ اللَّهُ الَّذِي خَلَقَ السَّمَاوَاتِ وَالأَرْضَ فِي سِتَّةِ أَيَّامٍ ثُمَّ اسْتَوَى عَلَى الْعَرْشِ يُغْشِي اللَّيْلَ النَّهَارَ يَطْلُبُهُ حَثِيثًا وَالشَّمْسَ وَالْقَمَرَ وَالنُّجُومَ مُسَخَّرَاتٍ بِأَمْرِهِ أَلا لَهُ الْخَلْقُ وَالأَمْرُ تَبَارَكَ اللَّهُ رَبُّ الْعَالَمِينَ

"

صدق الله العلي العظيم

سورة الأعراف (54)

الإهداء

إلى بطل العقيدة والجهاد وحامل لواء الحسين(ع) في ارض الطفوف . . ابي الفضل العباس(ع)

إلى الغائب الذي طال غيابه تاركاً لعيوننا ظمأ الاشتياق . . صاحب العصر والزمان(عج)

إلى من شجعني ومنحني الكثير إلى من تسهر عيناه لأجلنا . . أبي الحبيب

إلى العين التي فاضت الحب والأمل . . أمي الحنونة

إلى من غمرتني بالحب وبدعائها وفقني الله . . زوجتي الغالية

إلى أزهاري اليافعة الفواحة . . . علاء ، رئام وباقر

إلى من أسقوني من عذب علمهم . . أساتذتي الكرام

كذلك أولئك الذين دعوا لي بصدق ومحبة وإيثار أهديهم ثمرة جهدي المتواضع هذا

حاتم

شكر وعرفان

الحمد لله الواحد الأحد الفرد الصمد الذي لهُ العزة والجبروت الذي أفاض العلم من معدن الكرم وفتح أبواب رحمته الواسعة بالقلم وعلّم الانسان مالم يعلم ، والصلاة والسلام على أشرف الخلق أبي القاسم محمد وعلى آل بيته وصحبه الطاهرين .

لا يسعني وأنا انهي جهدي المتواضع هذا الا وأن أتقدم بوافر الشكر والاحترام إلى أستاذتي الفاضلة الاستاذة الدكتورة ياسمين خضير خلف الغانمي واستاذي الدكتور علاء حسين الصافي لاقتراحهما موضوع الرسالة وأشرافهما ومتابعتهما العلمية الحثيثة والدؤوبة ورعايتهما لي طيلة مدة الدراسة . ويسرني ان اتقدم ببالغ شكري وتقديري إلى رئاسة جامعة كربلاء وإلى عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة لأتاحتها الفرصة لإكمال دراستي وشكري الخاص لرئيس قسم علوم الحياة الاستاذ المساعد الدكتور نصير ميرزا حمزه والدكتور قيصر السلمان وإلى جميع اساتذة القسم لجهودهم المبذولة في دعم طلبة الدراسات العليا والمساعدة التي أبدوها إذ ذللت الكثير من المصاعب في أنجاز البحث راجياً من المولى عزه وجل ان يوفقهم ويحفظهم لما فيه خير .

كما أتقدم بخالص شكري و أمتناني إلى الدكتور عدنان السواك والدكتور حازم عبد الباري وكل من مد يد العون والمساعدة لإنجاز هذا البحث .

حاتم

إقرار المشرف على الرسالة

نشهد أن إعداد هذه الرسالة الموسومة (**دراسة خلويه وراثية لتأثير عقار الازثرومايسين على المعايير الفسلجية والنسجية والدور الوقائي لفيتامين C في ذكور الجرذان (*Rattus Norvegicus*)** قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء وهي جزءٌ من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة / الحيوان .

التوقيع:

الاسم : أ.د. ياسمين خضير خلف

المرتبة العلمية: استاذ

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة/ جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

التوقيع:

الاسم : م.د. علاء حسين مهدي

المرتبة العلمية : مدرس

العنوان: كلية التربية للعلوم الصرفة /جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

توصية رئيس قسم علوم الحياة

إشارة إلى التوصية أعلاه من قبل الإستاذين المشرفين ، أُحُيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة لدراستها وبيان الرأي فيها .

التوقيع:

الاسم : ا.م.د. نصير مرزا حمزة

المرتبة العلمية : أستاذ مساعد

العنوان : كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

التاريخ : / / 2021

إقرار المقوم اللغوي

أشهد أن هذه الرسالة الموسومة بـ (**دراسة خلويه وراثية لتأثير عقار الازثرومايسين على المعايير الفسلجية والنسجية والدور الوقائي لفيتامين C في ذكور الجرذان (*Rattus Norvegicus*)** تمت مراجعتها من الناحية اللغوية وتصحيح ما ورد فيها من أخطاء لغوية وتعبيرية؛ وبذلك أصبحت مؤهلة للمناقشة بقدر تعلق الأمر بسلامة الأسلوب وصحة التعبير.

التوقيع:

الاسم :

المرتبة العلمية:

الجامعة والكلية:

التأريخ : / / 2021

إقرار لجنة المناقشة

نشهد بأننا رئيس وأعضاء لجنة المناقشة قد اطلعنا على الرسالة الموسومة " **دراسة خلويه وراثية لتأثير عقار الازثرومايسين على المعايير الفسلجية والنسجية والدور الوقائي لفيتامين C في ذكور الجرذان (*Rattus Norvegicus*)**" المقدمة من قبل طالب الماجستير ((حاتم كريم جساب)) وقد ناقشنا الطالب في محتوياتها وكل ما يتعلق بها . ووجدنا انها جديرة بالقبول بتقدير(امتياز) لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة / علم الحيوان.

رئيس اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د علي حسين محمد

اللقب العلمي :أستاذ

العنوان : جامعة بابل/ كلية العلوم للبنات

التاريخ: / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم : أ.د الاء شاكر حنتوش

اللقب العلمي :أستاذ

العنوان : جامعة الكوفة/ كلية العلوم

التاريخ: / / 2021

عضو اللجنة

التوقيع :

الاسم :م.د بتول عباس حسين

اللقب العلمي :مدرس

العنوان :جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2021

عضواً ومشرفاً

التوقيع :

الاسم : أ.د ياسمين خضير خلف

اللقب العلمي : أستاذ

العنوان :جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2021

عضواً ومشرفاً

التوقيع :

الاسم : م.د علاء حسين مهدي

اللقب العلمي : مدرس

العنوان :جامعة كربلاء/كلية التربية للعلوم الصرفة

التاريخ: / / 2021

مصادقة عمادة كلية التربية للعلوم الصرفة

أصادق على ما جاء في قرار اللجنة اعلاه

التوقيع:

الاسم :أ.د حميدة عيدان سلمان

المرتبة العلمية: أستاذ

التاريخ: / / 2021

الخلاصة

اجريت هذه الدراسة في مختبر الدراسات العليا – قسم علوم الحياة – كلية التربية للعلوم الصرفة – جامعة كربلاء من 13 تشرين الاول 2020 ولغاية 15 أيار 2021، هدفت الدراسة الحالية إلى معرفة الفعالية التطفيرية لعقار Azithromycin والدور الوقائي لفيتامين C في ذكور الجرذ الابيض عن طريق دراسة بعض المتغيرات في المعاير الوراثية والكيموحيوية والنسجية ،استخدمت 25 من ذكور الجرذان البيض وقسمت عشوائياً إلى خمس مجاميع ،عُدت المجموعة الأولى مجموعة السيطرة حيث اعطيت الملح الفسيولوجي (Normal Saline)، وجرعت فموياً ، أمَّا المجموعة الثانية والثالثة فجرُعت بجرعة (15-30mg/kg) علي التوالي من عقار Azithromycin في اليوم الأول من التجربة ولمدة 14 يوماً حيث عدت من المجاميع العلاجية - أمَّا المجموعة الرابعة ، جرعت فموياً بفيتامين C بتركيز (100mg/kg) وعقار Azithromycin بجرعة (15mg/kg) ، والمجموعة الخامسة جرعت فموياً بفيتامين C بتركيز (100mg/kg) وعقار Azithromycin بجرعة (30mg/kg)من وزن الجسم على التوالي لمدة 14 يوماً وعدت كمجاميع وقاية. جُمعت عينات الدم من المجاميع الخمس بعد 14 يوماً من التجربة لقياس المعايير الآتية: تحطم DNA و التشوهات الكروموسومية و مستوى الكاتاليز Catalase و الكلوتاثيون Glutathione وايونات الصوديوم (+Na) والبوتاسيوم(+K) وقياس مستوى انزيمات الكبد (ALP- AST- ALT) ومستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتينين Creatinine وكذلك تقييم التغيرات النسجية للكبد والكلية وقد حصلنا على النتائج التالية :

سبَّب عقار Azithromycin ارتفاعاً معنوياً ($P <0.05$) في نسبة تحطم DNA في المجموعة الثالثة G3 مقارنة مع مجموعة السيطرة، أمَّا المجاميع الثانية G2 والرابعة G4 والخامسة G5 فتبين عدم وجود فروق معنوية ($P<.0.05$) في نسبة تحطم عالي في DNA مقارنة مع مجموعة السيطرة . كما سبب عقار Azithromycin ارتفاعاً معنويا ($P<0.05$) في نسبة التشوهات الكروموسومات الكلية Total في مجاميع العلاجية الثانية G2 والثالثة G3 مقارنة مع مجموعة السيطرة .أمَّا مجاميع الوقاية الرابعة G4 والخامسة G5 فلم تظهر اي فروق معنوية ($P> 0.05$) في نسبة التشوهات الكروموسومات الكلية مقارنة مع مجموعة السيطرة .

سَّبب عقار Azithromycin انخفاضاً معنوياً ($P< 0.05$) في مستوى الكاتاليز CAT و الكلوتاثيون GSH في المجاميع العلاجية الثانية G2 والثالثة G3 مقارنة مع مجموعة السيطرة ، أمَّا المجاميع الوقائية اظهرت نتائج الدراسة لمستوى GSH و CAT عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) في المجاميع الرابعة والخامسة مقارنة مع مجموعة السيطرة . كما سبب عقار Azithromycin انخفاضاً معنوياً ($P<.0.05$) في معدل مستوى الصوديوم في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا المجاميع الوقاية الرابعة والخامسة فتبين عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$)

في معدل الصوديوم مقارنة مع مجموعة السيطرة. في حين اظهرت النتائج ارتفاعاً معنوياً (P<.0.05) في معدل البوتاسيوم للمجاميع العلاجية والوقائية مقارنة مع مجموعة السيطرة.

كما ادى إلى ارتفاع معنوي(P<.0.05) في مستوى AST في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت العقار مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة فأظهرت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في معدل مستوى (AST) Aspartate transaminase التي اعطيت مقارنة مع مجموعة السيطرة. في حين اظهرت النتائج عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في مستوى(ALT) Alanine transaminase و(ALP) Alkaline phosphatase في المجموعة العلاجية الثانية مقارنة مع مجموعة السيطرة ، بينما سبب ارتفاعاً معنوياً(P<.0.05) في المجموعة العلاجية الثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة أيضا بينت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في مستوى ALT وALP مقارنة مع مجموعة السيطرة .وسبب ايضاً ارتفاعاً معنوياً(P<.0.05) في مستوى اليوريا Urea والكرياتينين Creatinine في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة أمَّا المجاميع الوقاية اشارت النتائج إلى عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في مستوى اليوريا والكرياتينين للمجموعة الرابعة مقارنة مع مجموعة السيطرة ، بينما سبب ارتفاعاً معنوياً (P<0.05) في مستوى اليوريا والكرياتينين في المجموعة الخامسة مقارنة مع مجموعة السيطرة .

سبب عقار Azithromycin تغيرات نسجية للكبد في المجموعة الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة كاحتقان الوريد المركزي وتنخر الخلايا الكبدية وتغلظ الانوية وتوسع الجيبانيات وجود خلايا التهابية ،بينما اظهرت المجاميع الوقائية الرابعة والخامسة احتقان الوريد المركزي مع انتظام جزء من الحبال الكبدية ووجود الجيبانيات مع وجود خلايا التهابية مزمنة مقارنة مع مجموعة السيطرة. كما سبب عقار Azithromycin تغيرات في نسيج الكلى في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة من ضمور في حجم الكبيبة ومحفظة بومان وتحطم جدران النبيب البولي الداني والنبيب البولي القاصي وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان واحتقان الاوعية الدموية مقارنة مع مجموعة السيطرة .أمَّا مجاميع الوقائية الثالثة والرابعة يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات ومحفظة بومان وتحطم جدران النبيب البولي الداني والنبيب البولي القاصي وزيادة في حجم فسحة بومان وحصول ضرر في نسيج الكلية مقارنة مع مجموعة السيطرة .

مما تقدم نستنتج أنَّ عقار Azithromycin تسبب في حدوث تحطم للـDNA وتشوهات للكروموسوم وكذلك تغيرات في المعايير الكيموحيوية والنسجية للكبد والكلى .وان اعطاء فيتامين C عمل على عكس الآثار الجانبية للعقار .ثبتت الدراسة هذه النتيجة لأول مرة في العراق كونها درست التغيرات الحاصلة للـDNA والتشوهات الكروموسومية وكذلك المعايير الكيموحيوية نتيجة لإعطاء العقار.

قائمة المحتويات

الموضوع	رقم الصفحة
الخلاصة	**I**
قائمة المحتويات	**III**
قائمة الجداول	**VII**
قائمة الأشكال والصور	**VIII**
قائمة المختصرات	**XI**
1-الفصل الأول: المقدمة Introduction	**2-1**
1.1. المقدمة	**1**
2.1. الهدف من الدراسة	**2**
2 -الفصل الثاني: استعراض المراجع Literature Review	**13-3**
1.2.الفعالية والتأثير للأزثرومايسين Azithromycin	**3**
2.2. الاستعمال السريري للعقار	**6**
3.2. الشكل والاسم التجاري والتركيب الكيميائي لعقار Azithromycin	**7**
1.3.2.الشكل والاسم التجاري Format and Trade Name	**7**
2.3.2. التركيب الكيميائي Chemical Stracture	**7**
4.2. دور فيتامين C واستعمالاته The Role And Uses Of Vitamin C	**8**
5.2. علاقة فيتامين C مع الازيثرومايسين Relationship of vitamin C with azithromycin	**12**
1.5.2. قابلية امتصاص أزيثرومايسين وفيتامين C	**12**
2.5.2. تأثيرات عقار ازثرومايسين ودور الوقائي لفيتامين C	**12**
3-الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and Methods	**31-14**

1.3.المواد والأجهزة المستعملة Materials and Device	**14**
1.1.3. الأجهزة المستعملة	**14**
2.1.3. المواد الكيميائية Chemical materials	**15**
2.3. طرائق العمل Methods	**16**
1.2.3. حيوانات التجربة Experimental Animals	**16**
2.2.3. تصميم التجربة Experimental Design	**16**
3.2.3 جمع عينات الدم Collection of blood sample	**18**
3.3. الفحوصات المختبرية	**18**
1.3.3. اختبار المذنب Comet assay	**18**
2.3.3. اختبار التشوهات الكروموسومية Chromosomal aberration studies	**20**
3.3.3. قياس بعض المعايير الكيموحيوية	**22**
1.3.3.3. تقدير مستوى إنزيم الكاتاليز Determination of Catalase Level	**22**
2.3.3.3. تقدير الكلوتاثيون Determination of Glutathione	**23**
3.3.3.3. قياس تركيز ايون الصوديوم Sodium ion (Na^{+1})	**25**
4.3.3.3. قياس تركيز ايون البوتاسيوم Potassium ion (K^{+1})	**25**
5.3.3.3. تقدير انزيم ناقلة امين الاسباراتات Aspartate aminotransferase	**26**
6.3.3.3. قياس أنزيم ناقلة امين ألانين Alanine aminotransferase	**27**
7.3.3.3. قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase	**28**
8.3.3.3. تقدير تركيز اليوريا Urea	**28**
9.3.3.3. تقدير تركيز الكرياتينين Creatinine	**29**

4.3.3. التحضيرات النسيجية Histological preparations	**30**
1.4.3.3. الانكاز والترويق Dehydration and Clearing	**30**
2.4.3.3. التشريب Infiltration	**30**
3.4.3.3. الطمر Embedding	**30**
4.4.3.3. التقطيع Sectioning	**31**
5.4.3.3. التصبيغ والتحميل Staining and Mounting	**31**
6.4.3.3. التصوير المجهري Microphotography	**31**
5.3.3. التحليل الإحصائي Statistical analysis	**31**
4- النتائج Results	**44-32**
1.4. تأثير عقار الأزيثرومايسين وفيتامين C على نسبة تحطم DNA.	**32**
2.4. تأثير عقار الأزيثروميسين وفيتامين (C) على معدل التشوهات الكروموسومية.	**33**
3.4. تأثير عقار الأزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى الكلوتاثيون GSH و الكتاليز CAT.	**39**
4.4. تأثير عقار أزيثروميسين وفيتامين (C) على الشوارد	**40**
5.4. تأثير عقار ألازيثرومايسين وفيتامين (C) على انزيمات الكبد	**41**
6.4. تأثير عقار أزيثروميسين وفيتامين (C) على مستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتينين Creatinine	**42**
7.4.تاثير أزثرومايسين وفيتامين C على نسيج الكبد والكلى.	**44**
5- المناقشة Discussion	**59-51**
1. 5 . تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على نسبة تحطم DNA	**51**

2.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على حدوث التشوهات الكروموسومية	**52**
3.5. تاثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى الكلوتاثيون GSH والكاتاليز CAT .	**53**
4.4. تأثير عقار الأزيثروميسين وفيتامين (C) على الشوارد.	**54**
5.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى انزيمات الكبد AST and ALT and .ALP	**55**
6.5.تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتينين Creatinine	**56**
7.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على نسيج الكبد والكلية .	**57**
الاستنتاجات والتوصيات	**60-59**
الاستنتاجات	**59**
التوصيات	**60**
المصادر	**80-61**
الخلاصة باللغة الانكليزية	**I-III**

قائـــــمة الجـــــــداول

الموضوع	رقم الصفحة
جدول (3-1) الأجهزة المستعملة مع اسم الشركة المصنعة والمنشأ	14
جدول (3-2) المواد الكيميائية مع الشركات المصنعة لها	15
جدول (4-1) تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على نسبة تحطم لـ(DNA)	33
جدول (4-2) تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على نسب (ظهور الكروموسومات المحذوفة- ظهور الكروموسومات الثنائية المركز - ظهور الكروموسومات اللامركزية - ظهور الكروموسوم الحلقي- ظهور الكروموسومات المتكسرة- ظهور التشوهات الكروموسومات الكلية)	35
جدول (4-3): تاثير عقار أزيثرومايسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى الكاتاليز CAT و الكلوتاثيون GSH في ذكور الجرذان البيض	39
جدول رقم (4-4): تأثير تاثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى الصوديوم (mmol/L) و البوتاسيوم (mmol/L) في ذكور الجرذان البيض	40
جدول (4-5) :تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى انزيمات الكبد التغيرات في الانزيمين الناقلين لمجموعة الامين AST and ALT و في انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في ذكور الجرذان البيض	42
جدول (4-6): تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتينين Creatinine في مصل الدم لذكور الجرذان البيض	43

قائمة الأشكال والصور

الموضوع	رقم الصفحة
الشكل (2-1): التركيب الكيميائي الأزيثرومايسين	8
الشكل (2-2) : التركيب الكيميائي لفيتامين C	9
شكل(2-3) يوضح الانشطة الانزيمية لفيتامين C، ↑ تشير إلى زيادة و ↓ تشير إلى انخفاض	10
شكل (2-4) يوضح دور فيتامين C في وظيفة البلعمة	11
شكل (3-1): يوضح تصميم التجربة و المعاير المدروسة	17
شكل (4-1) تبين DNA في مجموعة السيطرة	36
شكل (4-2) تبين تحطم قليل والمتوسط في DNA في المجموعة العلاجية الثانية	36
شكل (4-3) تبين تحطم عالي في DNA في المجموعة العلاجية الثالثة	36
شكل (4- 4) تبين DNA طبيعي غير متحطم او قليل في مجموعة الوقاية الرابعة	37
شكل (4- 5) تبين DNA طبيعي غير متحطم او قليل في مجموعة الوقاية الرابعة	37
شكل (4- 6) كروموسوم حلقي و المحذوفة في الطور الاستوائي لخلايا نقي العظم للجرذان لمجموعة السيطرة (قوة التكبير1000، صبغة كمزا)	37
شكل (4- 7) كروموسوم لا مركزي في الطور الاستوائي لخلايا نقي العظم للجرذان لمجموعة العلاجية الثانية (قوة التكبير1000، صبغة كمزا)	38
شكل (4-8) كروموسومات محذوفة والكروموسوم لا مركزي و حلقي في الطور الاستوائي لنقي العظم في الجرذان لمجموعة العلاج الثالثة (قوة التكبير 1000، صبغة كمزا)	38
صورة رقم (4-9) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة يلاحظ فيها تراكيب الكبد الطبيعية الوريد المركزي CV الخلايا الكبدية H والجيبانيات (H and E 200X) S .	45

صورة رقم (4-10) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطائها (mg/kg15) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها احتقان الوريد الكبدي C تنخر الخلايا الكبدية وتغلض الانوية وتوسع الجيبانيات L وجود خلايا التهابية مزمنة حول الوريد M وعدم انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .	**45**
صورة رقم (4-11) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطائها (mg/kg 30) من عقار Azithromycin ، يلاحظ فيها احتقان الوريد الكبدي C تنخر الخلايا الكبدية وتغلض الانوية وتوسع الجيبانيات وجود خلايا التهابية مزمنة حول الوريد M مع انحلال بعض الخلايا الكبدية G وعدم انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .	**46**
صورة رقم (4-12) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم اعطائها فيتامين (C) بمقدار (mg/kg100) و (mg/kg15) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها احتقان الوريد الكبدي C وتغلض الانوية وتوسع الجيبانياتL وبداية انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .	**46**
صورة رقم (4-13) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطائها اعطائها فيتامين (C) بمقدار (mg/kg100) و (mg/kg 30) من عقار Azithromycin ، يلاحظ فيها احتقان وتوسع الوريد الكبدي C وتوسع الجيبانيات وجود خلايا التهابية مزمنة قليلة في أمَّاكن متفرقة M و انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .	**47**
صورة رقم (4-14) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة يلاحظ فيها تراكيب الكلية الطبيعية الكبيبة G ومحفظة بومان BC والنبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT وفسحة بومان SB (H and E 200X) .	**48**
صورة رقم (4-15) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطائها (mg/kg15) من عقار Azithromycin يلاحظ فيها ضمور في حجم الكبيبة G ومحفظة بومان BC و تحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان H)) SB and E 200X .	**49**
صورة رقم (4-16) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطائها (mg/kg 30) من عقار Azithromycin يلاحظ فيها ضمور في حجم الكبيبة G ومحفظة بومان BC و تحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان SB واحتقان الاوعية الدموية H and E 200X).) C .	**49**

صورة رقم (4-17) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم اعطائها فيتامين (C) بمقدار (mg/kg100) و (mg/kg15) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات G ومحفظة بومان BC و تحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT ووزيادة في حجم فسحة بومان SB واحتقان الاوعية الدموية H)) C and E 200X .	**50**
صورة رقم (4-18) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم اعطائها فيتامين (C) بمقدار (mg/kg100) و (mg/kg30) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات G ومحفظة بومان BC و تحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT ووزيادة في حجم فسحة بومان SBوحصول ضرر في نسيج الكلية (H and E 200X) .	**50**

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine Transaminase
AST	Aspartate Transaminase
CAT	Catalase
CD4	Cluster of Differentiation 4
CD8	Cluster of Differentiation 8
CRP	C-Reactive protein
DDW	Double Distilled Water
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ECG	Electrocardiogram
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
GSH	Glutathione
IFN γ	Interferon Gamma
IgG	Immunoglobulin-Gamma
IL-1	Interleukin-1
IL-1β	Interleukin-1 Beta
IL-8	Interleukin-8
LDH	Lactic Dehydrogenase
LSD	Least Significant Difference
mRNA	Messenger RNA

NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NDST-1	N-Deacetylase And N-Sulfotransferase 1
NO	Nitric Oxide
QT	Torsade De Dointes
ROS	Reactive Oxygen Species
TCA	Trichloroacetic Acid
TNF-α	Tumor Necrosis Factor- alpha
WBCs	White Blood cells

الفصل الأول

المقـــــدمة

Introduction

1.1. المقدمة Introduction

أزيثرومايسين هو مضاد حيوي واسع الطيف مشتق من الاريثرومايسين ، والذي يعتبر من فئة أدوية الماكروليد، التي تتكون منها العديد من المضادات الحيوية مثل الإريثروميسين ، والكلاريثروميسين ، والفيداكسوميسين (Parnham *et al.*,2014;Matzneller *et al.*,2013). حيث عُزل في الأصل من مزارع (*Streptomyces erythraea*) في عام 1952، وتم تصنيع أزيثروميسين لأول مرة في عام 1980 وتم تطويره في البداية لعلاج الالتهابات البكتيرية في الجهاز التنفسي والتهابات الجلد وغيرها ، وهو الآن يستعمل على نطاق واسع ؛وذلك نظرا لنشاطه ضد مجموعة كبيرة ومتنوعة من البكتيريا (Hopkins,1991) .

تشمل الاستعمالات السريرية لأزيثروميسين علاج التهابات الجهاز التنفسي العلوي والسفلي والامراض المنقولة جنسياً بما في ذلك السيلان والتهابات المسالك البولية، أدى التعرف على تأثيرات المناعة للأزيثروميسين إلى تطبيقه في علاج الأمراض المسببة للالتهابات ، مثل الربو والتهاب القصيبات المنتشر ومرض الانسداد الرئوي المزمن (Li *et al.*,2011).

الآثار الجانبية الشائعة للعقار تشمل اضطراب المعدة ، الإسهال ، الغثيان ، القيء أو آلام البطن. كما تشمل آثار خطيرة منها فقدان السمع ، وقد تترافق الآثار الجانبية القلبية مع سمية الميتوكوندريا للعقار. ويتسبب العقار أيضًا في انتفاخ الميتوكوندريا في خلايا الكبد وله تأثيرات اخرى على الكلى (Salimi *et al.*,2016 ;Romanowska-Sarlej *et al.*,2004).

يعدّ فيتامين C أو (حمض الأسكوربيك) هو فيتامين قابل للذوبان في الماء وموجود في جميع الفواكه والخضروات وهو ضروري لعمل التمثيل الغذائي المنتظم ، تم التعرف على جزيء الكربوهيدرات الصغير هذا لأول مرة في عشرينيات القرن الماضي من قبل ألبرت زينت جيورجي وهو مفيد في الوقاية من العديد من الامراض (Drouin *et al.*,2011). يعمل كركيزة مشتركة للعديد من الإنزيمات في تخليق الكولاجين والكارنيتين والناقلات العصبية ولديه القدرة على الحد من السيتوكرومات في السلسلة التنفسية ، توفير إمكاناته المضادة للأكسدة للحماية من أمراض القلب والسرطان وأمراض أخرى ويقلل فيتامين C أيضًا من الحديد الغذائي ويحسن امتصاصه في الجهاز الهضمي (Sorice *et al.*,2014).

فيتامين C ضروري لالتئام الجروح ويساهم في نمو العضلات والغضاريف والأوعية الدموية والكولاجين في العظام فهو يعالج ارتفاع ضغط الدم ، ويقلل من مخاطر الإصابة بأمراض القلب والأوعية الدموية والسكري ، ويمنع السكتة الدماغية والسرطان والنقرس(Simonson,2020).

وتم استعمال اختبار المذنب (Comet assay) للكشف عن تلف الحمض النووي لتقييم المخاطر الوراثية المرتبطة بالتعرض للأحياء الغريبة، كما يعتبر من أكثر الأساليب تنوعًا وأفضلها لدراسة التأثيرات السمية الجينية، ويعد اختبار المذنب موثوقًا وسريعًا وقادراً على اكتشاف مستوى منخفض من تلف الحمض النووي ، ويتطلب وقتًا قصيرًا وهو تقنية سريعة الاستجابة للكسر الفردي أو المزدوج في الحمض النووي ، وموت الخلايا ، والروابط المتقاطعة بين الخيوط ، والمواقع ذات العلامات القلوية التي تحدثها العوامل الكيميائية أو الفيزيائية في الخلايا حقيقية النواة الفردية (Ullah *et al.*,2016).

2.1.الهدف من الدراسة The Aim Of The Stady

هدفت الدراسة الحالية الى :-

1- معرفة تأثيرات اعطاء عقار Azithromycin على مستوى الكروموسومات والـ DNA ودراسة التغيرات النسجية المحتملة لكل من نسيج الكبد والكلية بتأثير العقار .
2- معرفة الدور الوقائي لفيتامين C من خلال التقليل من الآثار الجانبية للعقار على المستوى الفسيولوجي(الكلوتاثيون ،والكاتليز ،وايونات الصوديوم والبوتاسيوم ،وانزيمات الكبد(-ALT AST-ALP) ،واليوريا والكرياتين) والنسجي .
3- معرفة تأثيرات فيتامين C على المستوى الوراثي كدور وقائي مقارنة مع السيطرة .

الفصل الثاني

استعـــراض المراجـــع

Literature Review

2 . استعـراض المراجـع Literatures Review

2. 1 . الفعالية والتأثير للأزثرومايسين Azithromycin

يستعمل أزيثرومايسين على نطاق واسع في الحلات الطبية، إلى جانب نشاطه المضاد للبكتيريا فقد تم التعرف على أدواره المضادة للالتهابات بشكل متزايد تم ربط استعمال المضادات الحيوية الماكرولايد ببعض الأحداث الضائرة ، على الرغم من أنها تعتبر من أكثر المضادات الحيوية المتوفرة أمانًا (Araujo and Demoly,2008). ومن أكثر الآثار الجانبية الشائعة في المرضى الذين يتلقون العلاج بماكرولايد الصداع والدوار بمعدلات 1.5٪ من المرضى، حيث أوضحت الدراسة (Li *et al*.,2014) الآثار الجانبية للأزيثرومايسين منها للمرضى المصابين بأمراض الرئة المزمنة قد يؤدي إلى زيادة المقاومة البكتيرية و تقلل من استعمال المضادات الحيوية إلى حد ما و لوحظ فقدان السمع في نسبة ضئيلة من الأفراد ، ولكن هناك حالة تؤكد هذا التأثير الجانبي الشديد بعد تناول العقار عن طريق الفم لفترة قصيرة. وأيضا بينت أحدى الدراسات (Butt *et al*.,2019) وبشكل نادر نقص الصفيحات الدموية الناتجة عن استعمال أزيثروميسين، ويمكن أن يتسبب العقار بشكل قليل أو شبه نادر بالسمية الكلوية المصحوبة بأعراض ويرقان وإصابة خلايا الكبد الحادة في مختلف الفئات العمرية إذ اشارت عدد من الحالات المرضية كان سببها العقار (Hasan and Ahmad.,2019;Martinez *et al*.,2015) .كما سبب العقار عدم انتظام ضربات القلب وفق ما اشار اليه (Salimi *et al*.,2016).

بشكل عام أن تأثير الماكروليدات على السيتوكينات تعمل على تقليل من تكوين السيتوكينات المنشطة للالتهابات مع تعزيز إطلاق السيتوكينات المضادة للالتهابات (Zimmermann *et al*.,2018). كما هو الحال في الازثرومايسين حيث يثبط بشكل فعال إفراز العوامل المؤيدة للالتهابات وكذلك استعادة التوازن المسبّب للالتهاب (المضاد للالتهابات)(Yang and De, 2017).

إنَّ التأثيرات الدوائية للأزيثرومايسين على السيتوكينات المختلفة معقدة للغاية حيث أن التعديل يعتمد على الجرعة. بعض الدراسات(Hodge and Michalowicz.,2000 ; Kurdowska *et al*.,2001) تشير إلى وجود اختلافات زمنية فيما يتعلق بوظيفة تعديل المضيف. لقد وجد أن التأثير الأولي لإعطاء أزيثروميسين يؤدي إلى زيادة في إنتاج IL-8 ، إذا تم إعطاؤه لفترات تزيد عن خمسة أيام ، وأظهرت النتائج في حالة وجود البكتيريا يتضاعف تأثير العقار بشكل اكبر (Shinkai *et al*.,2008;Shinkai *et al*.,2006).

أمَّا فيما يتعلق بالمناعة الذاتية هنالك دراسات تثبت أن الماكروليدات يمكنها أيضًا تعديل جوانب خلوية ، مما يؤدي إلى تقليل الالتهابات ، أظهر المرضى الذين يعانون من التهاب القصيبات والذين عولجوا بالماكروليدات طويلة المدى انخفاض مستويات تسلل الخلايا اللمفاوية السامة للخلايا

(Kawakami.,1997). هذا التأثير على الأقل ناتج جزئيًا عن زيادة موت الخلايا المبرمج في الخلايا اللمفاوية (Kadota *et al.*,2005)، من خلال التنظيم السفلي للخلايا اللمفاوية التائية السامة للخلايا (CD8) ، وجد أن أزيثروميسين يعمل على زيادة عدد(CD4) الخلايا المساعدة (T-helper) وتلعب هذه الخلايا اللمفاوية دورًا محوريًا في توجيه الاستجابة المناعية وزيادة الارتباط بالتنظيم السفلي للخلايا العدلات(neutrophils) في نفس التجربة (Feola *et al.*,2010).

ومن بين الآثار الوراثية كونه مضادات حيوية فقد ثبت أن للأزيثرومايسين مجموعة متنوعة من التأثيرات المضادة للالتهابات لا سيما في الالتهابات الجرثومية. إذ يثبط تعبير mRNA المرسال الناجم عن zymosan وإنتاج البروتين من السيتوكينات المنشطة للالتهابات (necrosis factor α و IL-1β) ، والكيموكينات (IL-6 و RANTES) ، و MMPs (*MMP-1*، *MMP-3* ، *MMP-9*) بواسطة الخلايا الظهارية للقرنية البشرية (Li DQ *et al.*,2010).

كما إنَّ أزيثروميسين له تأثيرات على فايروس كورونا إذ أفاد Renteria (2020)أن أزيثروميسين يقلل من تنظيم المسارات الرئيسة التي تتضمن الجينات *TMPRSS2* و *TMPRSS11D* والتي ترمز إلى نوعين من الانزيمات serine proteases الذي يتطلبه SARS-CoV-2 لتنشيطه والانتقال من خلية إلى خلية ، كما إن تقليل تنظيم IL-1b وNDST-1 جنبًا إلى جنب مع الالتهاب المرتبط ومسارات تجنيد كريات الدم البيض قد يساعد في تقليل الالتهاب الظهاري التنفسي وهو سمة رئيسة لعدوى SARS-CoV-2(Hoffmann *et al.*,2020; Bertram *et al.*,2011).

تعد المضادات الحيوية (الماكروليدات) من بين أكثر المضادات الحيوية شيوعًا في جميع أنحاء العالم وتستخدم لمجموعة واسعة من العدوى. ومع ذلك فإن الماكروليدات تعرض الناس أيضًا لخطر المرتبط بالآثار السلبية. تتسبب المضادات الحيوية لماكرولايد في تلف الحمض النووي من خلال تحريض الإجهاد التأكسدي في الأسماك (Yang *et al.*,2020).إذ اشارت دراسة Rodrigues (2016)الى أن الاريثرومايسين لديه القدرة على تحفيز فواصل شرائط الحمض النووي في الخلايا المولدة لكريات الدم و بأنه عمل على تحريض كسر الكروموسومات أو تشوهاتها و أن كلا من التأثيرات الضارة للحمض النووي التي يسببها الإريثروميسين مرتبطة بالضرر التأكسدي الذي يظهر عند تركيزات الإريثرومايسين المختلفة.

كما أفاد (Ila & Topaktas,2001) أنَّ spiramycin تسبب حدوث انحرافات وتشوهات الكروموسومي في خلايا نخاع العظم الفئران . في دراسة اخرى (Jiang *et al.*, 2019) تناول تأثير ازثرومايسين على المايتوكوندريا إذ تسبب العقار في تسمم الميتوكوندريا في الثدييات وإنتاج الجذور الاوكسجنية وتلف الحمض النووي وتحلل السكر الهوائي وتنظيم جين *HIF1a* الذي قد يساهم في تكوين الأورام والتنكس العصبي. بالمقابل اشارت دراسة اخرى (Amacher *et al.*,1993) أنَّ الفئران التي

تناولت جرعات تصل إلى 200 ملغم / كغم من أزيثروميسين لا يسبب طفرات جينية في الخلايا الميكروبية أو الثديية ، أو انحرافات صبغية في الخلايا اللمفاوية البشرية المستزرعة أو في نخاع عظم الفأر في الجسم الحي.

وتشير كل من التشوهات الكروموسومية وتحطم DNA كمؤشرات حيوية وراثية مهمة في دراسة الخطر الجيني الناجم عن عوامل سمية جينية وكذلك الادوية الكيميائية المختلفة. وأنَّ الأدوية الكيميائية لديها القدرة على تقليل معدل انقسام الخلايا وكذلك تشوهات كروموسومات، ويعد تسلسل الترجمة والنسخ المقترن الذي يتم التحكم فيه بدرجة عالية ضروريًا لإكمال دورة الطور البيني والانقسام. تعد النطاقات Quinacrine fluorescent و G-banding مهمة لرسم خرائط الكروموسومات وتقييم تأثيرات العوامل الكيميائية. وان نقص في الكروموسوم أو تغيرًا هيكليًا بما في ذلك كسر الكروموسوم أو الحذف أو إعادة الترتيب أو تغيير في عدد الكروموسوم. قد يؤدي الضرر الواسع للمادة الوراثية إلى موت الخلايا أو حدوث تغييرات كيميائية حيوية (Finley,1975).

الإزيثرومايسين المتميز بخصائصه وحركتة الدوائية الفريدة إلى جانب كونه عضوًا في عائلة المايكروليدات إلى أنه يتسبب في تأثيرات على نسيج الكبد والكلى. إذ اشارت الدراسات (Ebenezer& Koffas *et al*.,2017; Singh *et al* 2016; Ayokanmi, 2014).

إلى ان العلاج طويل الأمد من أزيثروميسين تسبب في تلف و تغيير بنية الخلايا الكبدية وتسمم الكبد الناتج عن رد الفعل العكسي للمضادات الحيوية . كما ان هناك العديد من التقارير السريرية التي بينت تغيرات في الإنزيمات والعلامات الحيوية أثناء العلاج والتي تم زالت في عدة أيام بعد التوقف عن العلاج. وأن آليه السمية الكبدية التي يسببها أزيثرومايسين ناتجة عن طريق بيروكسيد الدهون الغشائي أو تكوين الجذور الحرة أو ضعف الميتوكوندريا والذي يسبب الاجهاد التأكسدي وهذا يؤدي الى حصول احتقان ونزف حاد في الجيبانيات وتمزق في الحبال الكبدية و نخر الخلايا (Di Sario *et al*., 2007; Cheung & Sanyal, 2010; Jaeschke & Ramachandran, 2011; Lockwood et al., 2010)

من جانب اخر فقد أشارت عدد من الدراسات (D.Hasan& D.Ahmad,2019 ; Sakurai *et al*.,2018;Soni et al.,2004) الى تأثير ازثرومايسين على نسيج الكلى حيث لاحظوا التوزيع المكاني لـ AZM ومستقلباته يرتبط ارتباطًا وثيقًا بالمناطق التالفة في كلية الفئران .حيث يتسبب بالتهاب الكلية ضمور في حجم الكبيبة و تحطم جدران النبيب البولي. وتم الإبلاغ عن الفشل الكلوي المزمن بعد الإصابة الثانية لالتهاب الكلية الخلالي الحاد في الدراسات السريرية لأزيثروميسين (Persico et al., 2011) وان الالية المحتملة هو ان ازثرومايسين عمل على زيادة الجزور الحرة التي عملت على زيادة تنخر الانسجة والفشل الكلوي بالتالي تسبب في زيادة مستوى اليوريا و الكرياتينين في المصل .

2.2. الاستعمال السريري للعقار

تشمل الاستعمالات السريرية لعقار Azithromycin في علاج الامراض ما يأتي:

1- يستعمل لعلاج الالتهابات البكتيرية المتعددة ، التي تسبب في أغلب الأحيان التهابات الأذن الوسطى و الجهاز التنفسي العلوي مثل التهاب الجيوب الأنفية ، والتهاب الشعب الهوائية ، وكذلك الالتهاب الرئوي المكتسب و التهابات الجهاز التنفسي السفلي وكذلك التهابات الجهاز التنفسي المحددة ، بما في ذلك السعال الديكي وlegionellosis .

2- استخدم ضد مجموعة كبيرة ومتنوعة من البكتيريا موجبة وسالبة لصبغة كرام منها (*Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis*) واستخدم ضد داء القطط (*Toxoplasma gondii*) علاج العدوى الشديدة أو اعتلال العقد اللمفية المستمر بسبب *Bartonella henselae* (catscratch disease) (Jelić *et al.*,2013)

3- التهاب الأمعاء الجرثومي الناجم عن أنواع الطفيليات (*Escherichia* و *Salmonella* و*Shigella* و*Yersinia*) ، وكذلك الحمى المعوية التي تسببها الانواع البكتيرية التالية *Salmonella enterica serovar Typhi* و *S. enterica* (*serovar* ParatyphiMostaghim.,2015) .

4- الأمراض المنقولة عن طريق الاتصال الجنسي بما في ذلك والسيلان وعدوى المسالك البولية و التهاب الخصية ومرض التهاب الحوض و (granuloma inguinale) McMullanand (Mostaghim.,2015)

5- استخدم لعلاج العديد من الأمراض المعدية للأطفال مثل الجيوب الأنفية البكتيرية الحادة، والتهاب الأذن الوسطى ، والتهاب البلعوم ، والتهاب اللوزتين ، والالتهاب الرئوي ، والتهاب الشعب الهوائية ، والتهابات الجلد (Amin *et al.* ,2018).

6- استخدامه في علاج الامراض الجلدية منها حب الشباب وRosacea (Kardeh *et al.*,2019; Dhaher and Luaibi.,2016 ;Al-harchan,2009).

7- بالإضافة إلى ذلك ، أدى التعرف على التأثيرات المعدلة للمناعة لأزيثرومايسين إلى تطبيقه في علاج الأمراض ذات النشاط الالتهابي ، مثل الربو والتهاب القصيبات ومرض الانسداد الرئوي المزمن وتوسع القصبات والتليف الكيسي(Akhyani *et al.*, 2008 ;Parnham, 2014).

3.2. الشكل والاسم التجاري والتركيب الكيميائي لعقار Azithromycin

1.3.2.الشكل والاسم التجاري Format and Trade Name

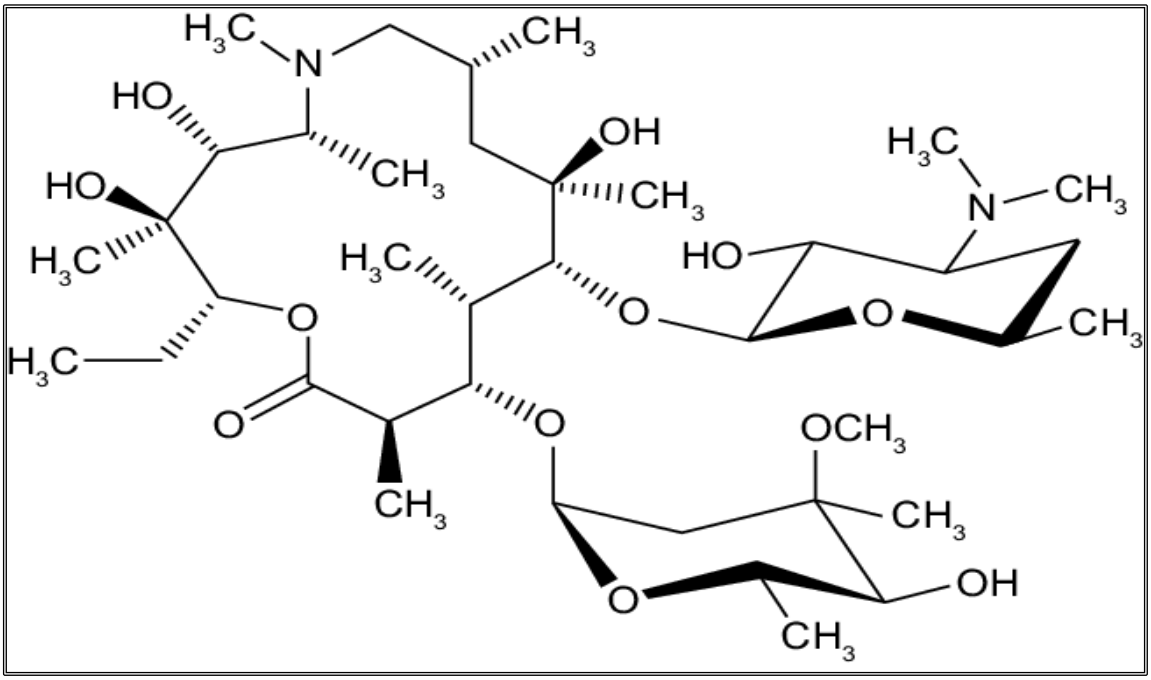
الاسم العام : أزيثرومايسين (azithromycin)

الاسماء التجاريـة : *Azasite, Azithromycin 3 Day Dose Pack, Azithromycin 5 Day Dose Pack, Zithromax, Zithromax TRI-PAK, Zithromax Z-Pak, Zmax.*

أول من صاغ مصطلح "ماكروليد" في عام 1957 على يد Woodward ، المايكروليدات هي عبارة عن مضادات حيوية تتكون من 14 أو 15 أو 16 ذرة من حلقات الماكرولاكتام (Macrolactam) وتتميز بروابط مزدوجة ومجموعات وظيفية مختلفة من Saccharide و Aminosaccharide ، تعد اللاكتونات المكونة من 14 نوعًا من الإريثروميسين والكلاريثروميسين ، والماكروليدات المكونة من 15 حلقة سبيرامايسين و أزيثرومايسين (Arsic *et al*.,2018;Woodward.,1957) ، وتم اكتشاف عقار ازثرومايسين على يد فريق من الباحثين بقيادة الدكتور سلوبودان كوكيتش في عام 1980 وقد تم تسجيل براءة اختراعه في عام 1981 وبعد ذلك تم انتاجه من قبل شركة فايزر (Bright and Hauske, 1984).

2.3.2. التركيب الكيميائي Chemical Stracture

الأزيثرومايسين هو أحد مشتقات الاريثرومايسين وأن صيغته الكيميائية هي $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$ ، يختلف الأزيثرومايسين كيميائيًا عن الإريثرومايسين من حيث أنه يتكون من 15 ذرة ثنائي القاعدة بشكل أكثر ملاءمة باسم azalide (الشكل 2-1) ،منح هذا التعديل الهيكلي أزيثروميسين العديد من المزايا المميزة على الإريثروميسين منها يجعل المركب أكثر استقرارًا في البيئات الحمضية و تحسين خصائصه الحركية الدوائية غير العادية، يتراكم بسرعة في الخلايا والأنسجة ، وخاصة في كريات الدم البيضاء ويتم إطلاقه ببطء من المواقع ، وتحمل الجهاز الهضمي ،والتوافر الحيوي عن طريق الفم ، ويحسن الطيف المضاد للبكتيريا عند مقارنتها بالإريثرومايسين ، وهو يختلف هيكليًا عن المضادات الحيوية الماكروليد الأخرى بواسطة النيتروجين المستبدل بالميثيل في حلقة الماكروليد ، مما يؤدي إلى مجموعتين أساسيتين من الأمين بدلاً من مجموعة الإريثرومايسين (Bakheit *et al*.,2014; Yazdani and Sayadi.,2018).

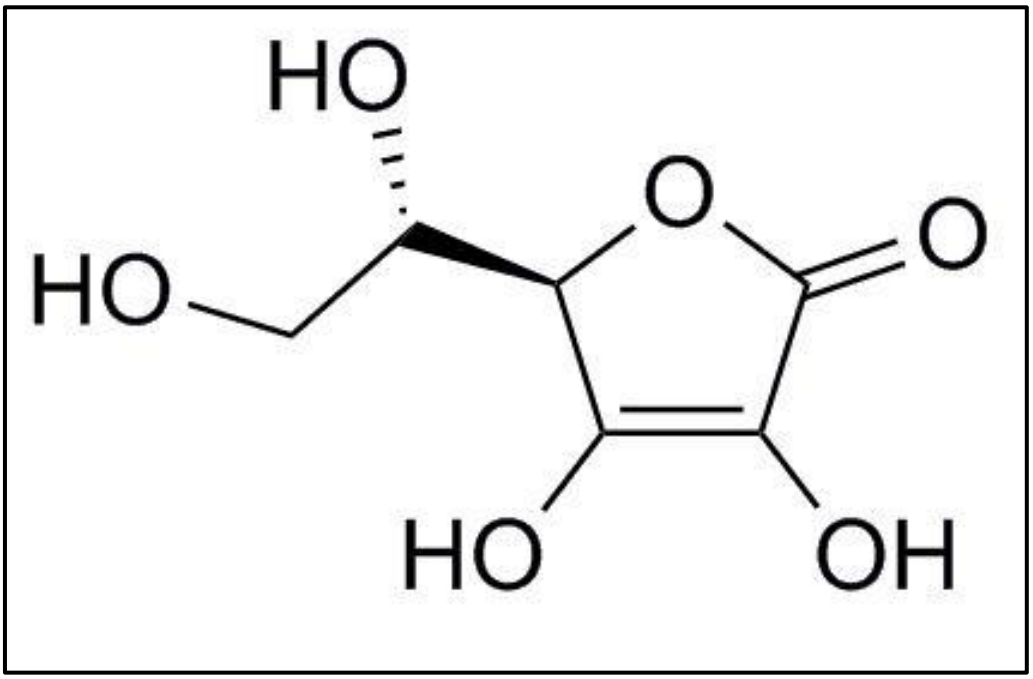


الشكل (2-1): التركيب الكيميائي الأزيثرومايسين (Amin *et al* ,2018).

4.2. دور فيتامين C واستعمالاته The Role And Uses Of Vitamin C

فيتامين C أو (حمض الأسكوربيك) هو عنصر غذائي أساسي يتم الحصول عليه من النظام الغذائي ، وهو عامل فعال للغاية مختزل قادر على التبرع بالإلكترونات في مختلف التفاعلات الأنزيمية وغير الأنزيمية ،تم اكتشاف فيتامين C لأول مرة في الفواكه (الحمضيات) والخضروات والغدد الكظرية في عشرينيات القرن الماضي بواسطة Szent - Gyorgyi عالم الكيمياء (Pehlivan ,2018; Grzybowski and Pietrzak.,2013).

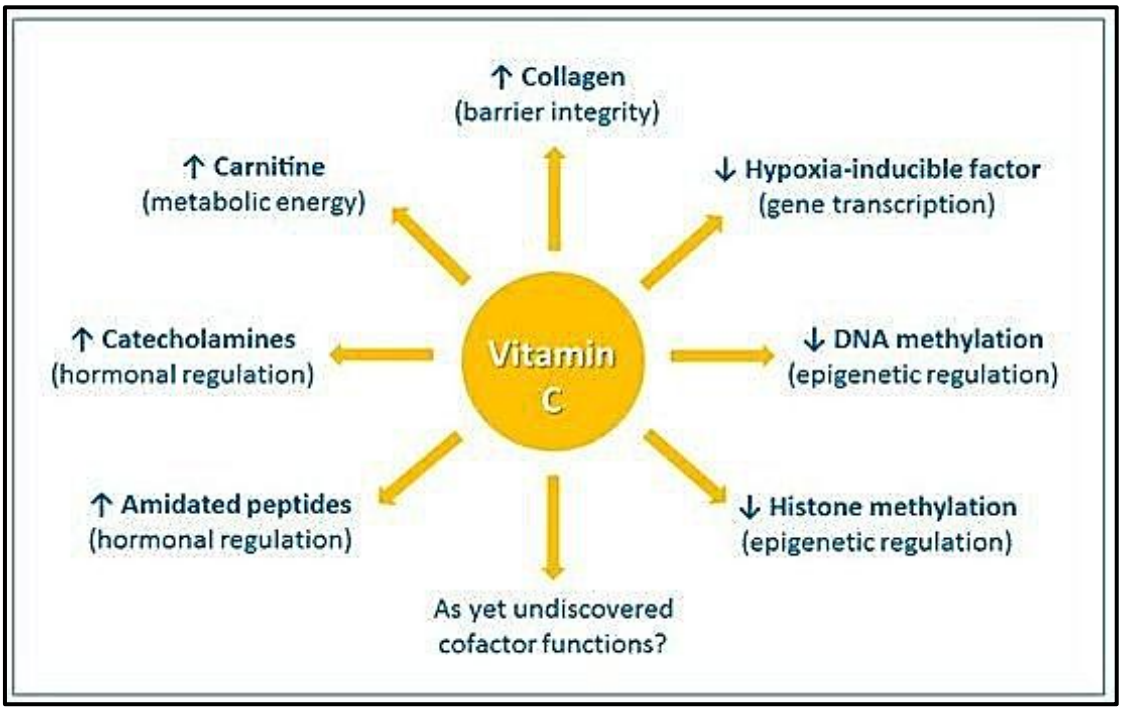
إنَّ حامض الاسكوربك هو الاسم الشائع لفيتامين C اما الاسم الكيميائي لهو (2-oxo-L-threo-hexono-1,4-lactone-2,3-enediol) يتكون جزيء حمض الأسكوربيك من ست ذرات غير متناظرة من الكربون (صيغة الكيميائية$C_6H_8O_6$) والتي ترتبط هيكليًا بالكلوكوز ، والشكل الرئيسي له Dehydro ascorbic acid , L- ascorbic acid (الشكل2-3) (Velisek and Cejpek ,2007;Elmore,2005).



الشكل (2-2) : التركيب الكيميائي لفيتامين C (Amal,2017)

فيتامين C عنصر مهم في الكائن الحي لما له من قابلية الذوبان في الماء (مما يؤدي إلى امكانية التخلص السريع منهُ ومنع التخزين) ولا يمكن تصنيعه من قبل جسم الانسان وخنازير غنيا لذلك يجب تناول الاغذية الحاوية على فيتامين C في نظامنا الغذائي (Gallie,2013).

وهو أحد مضادات الأكسدة عالية الفعالية ، نظرًا لقدرته على التبرع بالإلكترونات بسهولة ، وبالتالي حماية الجزيئات الحيوية المهمة (البروتينات ، والدهون ، والكربوهيدرات ، والأحماض النووية) من التلف الناتج عن المؤكسدات المتولدة أثناء التمثيل الغذائي الطبيعي للخلايا ومن خلال التعرض للسموم والملوثات ، مما جعل فيتامين C يعمل وظائف مهمة منها عنصر أساسي لتخليق بروتين الكولاجين والكارنيتين (Carnitine) وهرمون النورابينفرين (Norepinephrine) ، وكونه مكونًا أساسيًا للنسيج الضام ، ويلعب ادواراً مهمةً في عملية التئام الجروح ،وكذلك يعمل كمضاد للأكسدة بسبب قابليته على تثبيت وتقليل أنواع الأكسجين التفاعلي Reactive oxygen species (ROS) ،عن طريق تحويل الجذور الحرة إلى جذور غير حرة وتجديد الجزيئات الصغيرة المضادة للأكسدة ، مثل GSH (Mumtaz *et al*.,2020;Doll and Ricou,2013). وهو جزيء مطلوب لنقل الأحماض الدهنية إلى الميتوكوندريا للتوليد الطاقة الأيضية (شكل 2-4).



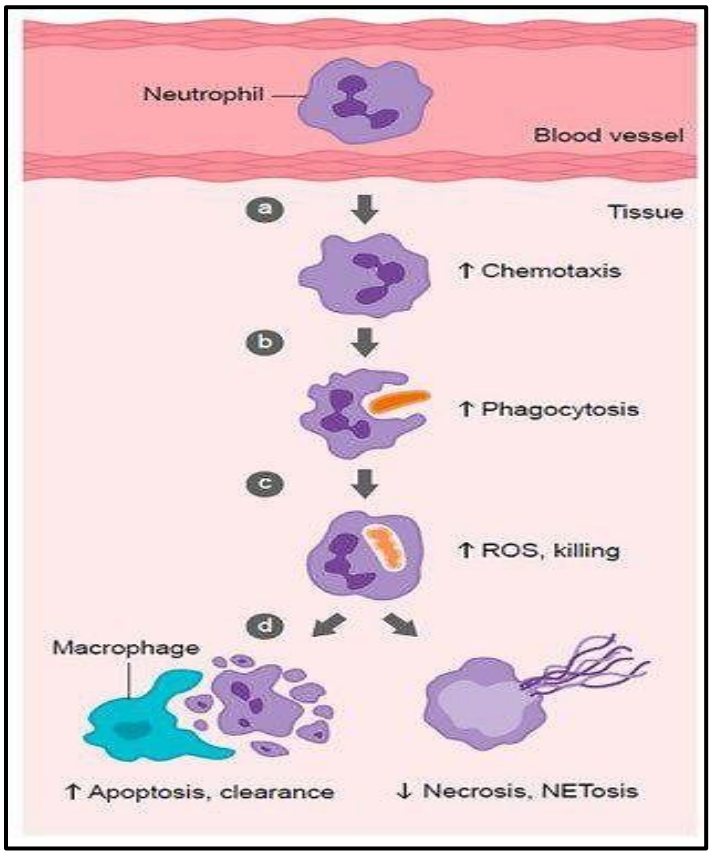
شكل(2-3) الانشطة الانزيمية لفيتامين C، ↑ تشير إلى زيادة و ↓ تشير إلى انخفاض (Carr and Maggini , 2017).

يعمل فيتامين C كمرافق انزيمي (Co-enzyme) وعامل مختزل في أي ضرر، ويمكن تفسير جميع وظائفه الكيميائية الحيوية والجزيئية من خلال هذه الوظيفة. وتشمل الخصائص المضادة للأكسدة وخصائص عامل المساعد لمجموعة واسعة من الإنزيمات في الهياكل الخلوية والعضيات . مما يؤدي إلى تأثيرات متنوعة على الأنسجة والجهاز العضوي ، يحتوي فيتامين سي على عدد من الأنشطة التي يمكن أن تساهم بشكل محتمل في آثاره المعدلة للمناعة وخلايا الدم البيض فهو يحفز الفعالية الالتهابية لخلايا الدم البيض وتكوين الأجسام المضادة (Padayatty and Levine ,2016).

ويتمثل دور فيتامين C في المناعة من خلال تأثيره على وظائف الخلايا البلعمية حيث يعزز هجرة Neutrophil استجابة للجاذبات الكيميائية ، يعزز الابتلاع (البلعمة) للميكروبات ، ويحفز توليد أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) وقتل الميكروبات. يدعم فيتامين C موت الخلايا المبرمج المعتمد على أنزيم caspase ، ويعزز الامتصاص ، ويمنع النخر وبالتالي يدعم حل الاستجابة الالتهابية ويخفف من تلف الأنسجة (شكل5-2). له دور في إنتاج Interferon ، وتكاثر الفيروسات ، ونضج الخلايا اللمفاوية التائية (Hemilä , 2017).

ويشمل أيضًا إعادة تشكيل الأوعية الدموية وكذلك الحفاظ على سلامة خلايا الأوعية الدموية من خلال التأثير على تمايز الأوعية الملساء و خلايا العضلات والتعبير عن بروتينات النسيج الضام (Catani *et al*.,2005; Villacorta *et al*.,2007).

كما له أدوار مهمة كعامل مساعد لعدد كبير من الإنزيمات الرئيسة ، مما يؤثر على الانقسام ونمو الخلايا عن طريق تعديل التعبير الجيني عن لجينات معينة تشارك في الدفاع والمسارات الهرمونية يشارك في إصلاح الأنسجة والإنتاج الأنزيمي لبعض النواقل العصبية ، و ينظم إنتاج السيتوكين ويمكن أن يقلل من مستويات الهيستامين المنتشرة لمنطقة الالتهاب ، وله أدوار مهمة في عملية امتصاص الحديد إذ يساعد حامض الأسكوربك على اختزال الحديد الثلاثي التكافؤ Ferric Iron الى الحديد ثنائي التكافؤ Ferrous Iron حيث يكون الأخير أكثر امتصاصاً من سابقة(Pehlivan ,2018 ; Ebisch *et al*.,2006).



شكل (2-4) يوضح دور فيتامين C في وظيفة البلعمة (Carr and Maggini.,2017).

5.2. علاقة فيتامين C مع الازيثرومايسين Relationship of vitamin C with azithromycin

1.5.2. قابلية امتصاص أزيثرومايسين وفيتامين C

امتصاص الأزيثرومايسين عن طريق الفم منخفضًا بنسبة (37٪) ، بالمقابل يمتص بتركيزه العالي بعد 2-3 ساعات من الجرعة . بعد الامتصاص يتم نقله إلى موقع الإصابة عن طريق الخلايا البلعمية التي يتم إطلاقها أثناء الاستجابة المناعية للعدوى. يخترق العقار معظم الأنسجة البشرية ، وله عمر نصفي طويل في الدم يبلغ 68 ساعة ويتم إفرازه في الغالب في البراز نتيجة للتخلص منه في الصفراء. (Kong *et al* .,2017).

اما فيتامين C يتم امتصاص ما يقرب من 70٪ الى 90٪ منه عند تناول كميات معتدلة من 30-180 ملغم / يوم، وعند الجرعات التي تزيد عن 1 غم / يوم ينخفض الامتصاص إلى أقل من 50٪ ويتم افراز حامض الأسكوربيك في البول (Jacob *et al*.,2002) . تشير نتائج دراسات الدوائية إلى أن الجرعات الفموية من حمض الأسكوربيك تبلغ 1.25 غرام / يوم ينتج عنها أعلى تركيز لفيتامين C في البلازما يبلغ 135 ميكرومول / لتر ، وهي أعلى تقريبًا من تلك الناتجة عن استهلاك 200-300 ملغم / يوم من حمض الأسكوربيك (فيتامين C). (Padayatty *et al*.,2004).

2.5.2. تأثيرات عقار الازثرومايسين والدور الوقائي لفيتامين C

المضادات الحيوية الماكرولايد مثل الأزيثرومايسين (Azithromycin) ،كلاريثرومايسين (Clarithromycin) ، وروكسيثرومايسين (Roxithromycin) هي عقارات فعالة في علاج التهابات الجهاز التنفسي والأنسجة الرخوة ، حيث يتم الاحتفاظ بها في الأنسجة لعدة أيام بعد إعطاء جرعة واحدة من الدواء(Abu-Gharbieh *et al*.,2004). استعمالها بجرعات عالية يمكن أن يسبب الإجهاد التأكسدي ، ويزيد من نفاذية غشاء الميتوكوندريا ، ويعجل أحداث عدم انتظام ضربات القلب وغيرها من الاثار الجانبية . أزيثروميسين هو مضاد حيوي ماكرولايد واسع الاستعمال وفعال. يتم استعماله في علاج أنواع مختلفة من الالتهابات البكتيرية الخطيرة. تسبب الازيثروميسين في حدوث تغييرات في معاملات تخطيط القلب (ECG) ، وخاصة إطالة فترة QT، و أصيب بعض المرضى باضطراب ضربات القلب الخبيث المعروف باسم torsade de pointes (Cocco and Jerie.,2015; Lu *et al*.,2015).

تم تأكيد ان بعض المضادات الحيوية من الماكروليد على أنها سامة للكبد في الحيوانات والبشر في الدراسات السريرية (Er, A *et al*.,2011;Lockwood *et al*.,2010). من المعروف أيضًا أن المضادات الحيوية لماكرولايد تعمل على تغيير التوازن الفسيولوجي للأكسدة مما يؤدي إلى الإجهاد

التأكسدي وبيروكسيد الدهون (Kumar *et al*.,2008). تتطلب الخلايا الأكسجين لعمليات التمثيل الغذائي المحددة بما في ذلك استقلاب الكائنات الحية الحيوية وفي عملية بعض الأنواع المدمرة التي يشار إليها باسم أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS)، تحمي الخلية نفسها من أنواع ROS ، من خلال إجراءات بعض المواد منخفضة الوزن الجزيئي مثل الجلوتاثيون وفيتامين A و E و C (مضادات الأكسدة غير الإنزيمية) ومضادات الأكسدة الإنزيمية مثل ديسموتاز الفائق (SOD) ، الكاتلاز (CAT)،حيث ان فيتامين C يعمل على ازالة لأنواع الأكسجين التفاعلية، ويمكنه أيضًا تجديد الجزيئات الصغيرة المضادة للأكسدة ، يقلل فيتامين C بشكل ملحوظ من تشتت فترة QT interval الناتجة عن ممارسة الرياضة بعد احتشاء عضلة القلب(Gupta *et al*.,2007;Bednarz *et al*.,2003).

وتتمثل الأدوار الوقائية لفيتامين C كمضاد للأكسدة ، من خلال ازالة الجذور الحرة ويحمي من التلف عن طريق التبرع بالإلكترونات. يمنع الارتباط Glycosylation غير الأنزيمي للبروتينات ، ويعزز تمدد الشرايين من خلال تأثيره على إطلاق أنزيم أكسيد النيتريك، كما أنه يقلل من خطر التدخين عن طريق تحسين وظائف الرئة ، ويقلل بيروكسيد الدهون ، ويخفف الالتهاب. أفادت الدراسات الوبائية أن مضادات الأكسدة التي تحتوي على فيتامين Cيمكن أن تحسن ضغط الدم ، وتقلل من مخاطر الإصابة بفشل القلب. بين مرضى السكري ، أدت المستويات المناسبة من فيتامين C أو المكملات الكافية إلى تقليل حدوث متلازمة التمثيل الغذائي ، والخلل البطاني ، وتحسن نسبة السكر في الدم والشحوم ، وتقليل علامات الالتهاب. يمكن لفيتامين C أن يحسن الالتهاب عن طريق تقليل العلامات الالتهابية والمسببة للالتهابات مثل CRP و IL-6 و TNF-a. تُعزى الخاصية المضادة للالتهابات لفيتامين C إلى قدرتها على تعديل نشاط ربط الحمض النووي NF-kB والتنظيم السفلي في تعبير الرنا المرسال الكبدي للإنترلوكينات وعوامل الورم (Righi *et al*.,2020; DePhillipo *et al*.,2018; Ellulu,2017).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

3 . المواد وطرائق العمل Materials and Methods

1.3.المواد والأجهزة المستعملة Materials and Device

1.1.3. الأجهزة المستعملة:

جدول (3-1) الأجهزة المستعملة مع اسم الشركة المصنعة والمنشأ

ت	الاجهزةDevices	المنشأ ORIGIN	الشركة المصنعة COMPANY
1	تصويرphoto documentation	Canada	Biobasic
2	ثلاجة Refrigerator	Lebanon	Concord
3	جهاز الطرد المركزي Centrifuge	UK	Griffianal George
4	جهاز تقطير Distiller	Japan	Fisons
5	حاضنة Incubator	England	Gallen Kaamp
6	حمام مائيWater bath	Germany	Memmert
7	فرن كهربائي Electric oven	Italy	Eriotti
8	كاميرا رقمية	Germany	Mettle
9	مازج Vortex	China	CYAN
10	المجهر المتألق Fluorescence microscope	zess	Rusia
11	المجهر الومضي Fluorescence	Japan	Olympus
12	مجهر ضوئي مركب Compound light microscope	Japan	Olympus
13	ميزان الكتروني حساس Sensitive electronic balance	England	Gallen Kaamp
14	وحدة تصوير الهلام Gel ducomentation	Germany	Cleaver scientific
15	Softwear	USA	---

2.1.3.المواد الكيميائية Chemical materials:

جدول (3-2) المواد الكيميائية مع الشركات المصنعة لها

ت	المواد الكيميائية Chemicals	المنشأ Origin	الشركة المصنعة Company
1	عقار Azithromycin 500mg	Spain	Normon
2	Vitamin C 1000mg	Turkey	Vitasea
3	oxiselect comet assay kit	Canada	BioBasic
4	ايثانول Ethanol %96	England	BDH
5	إيزوبروبانول Isopropanol	England	BDH
6	حامض الخليك الثلجي Glacial acetic acid	Iraq	Iraq
7	صبغة SYBR Green	England	BDH
8	صبغة كمزا Gimza stain	Canada	BioBasic
9	عدة قياس انزيم Catalase	Korea	Bioneer
10	عدة فحص الكرياتنين (Creatnine Kit)	Agappe	Switzerland
11	عدة فحص الكلوتاثيون (GSH)	U.S.A	Mononbind Inc
12	عدة فحص اليوريا (Urea Kit)	Agappe	Switzerland
13	عدة فحص انزيم ALP (ALP Kit)	Agappe	Switzerland
14	عدة فحص انزيم ALT (ALT Kit)	Agappe	Switzerland
15	عدة فحص انزيم AST (AST Kit)	Agappe	Switzerland
16	عدة فحص عنصر البوتاسيوم (K Kit)	Biomerieux	France
17	عدة فحص عنصر الصوديوم (Na Kit)	Biomerieux	France
18	كحول مطلق *absolute alcohol*	Spain	Scharlau
19	كلوروفورم Chloroform	England	BDH
20	ماء مقطر Distilled Water	-	-

2.3. طرائق العمل Methods

1.2.3. حيوانات التجربة Experimental Animals:

استعمل في هذه التجربة (25) من ذكور الجرذان البيضاء التي تم الحصول عليها من البيت الحيواني في كلية الصيدلة – جامعة كربلاء بمعدل اعمار تتراوح بين (11-12) اسبوع وأوزان تتراوح (210-260) غرام ، وضعت في اقفاص التربية تحت ظروف حرارية بمعدل 25مº ومدة اضاءة 12 ساعة باليوم وتهوية جيدة وتغذيتها على العليقة الحيوانية (adlibitum) المتكون من (حليب مجفف،وجريش الحنطة ،ودقيق الحنطة ،وجريش الشعير ،وجريش الذرة ،وملح الطعام) وتوفير الماء وتركت الحيوانات للتأقلم لمدة أسبوع.

2.2.3. تصميم التجربة Experimental Design:

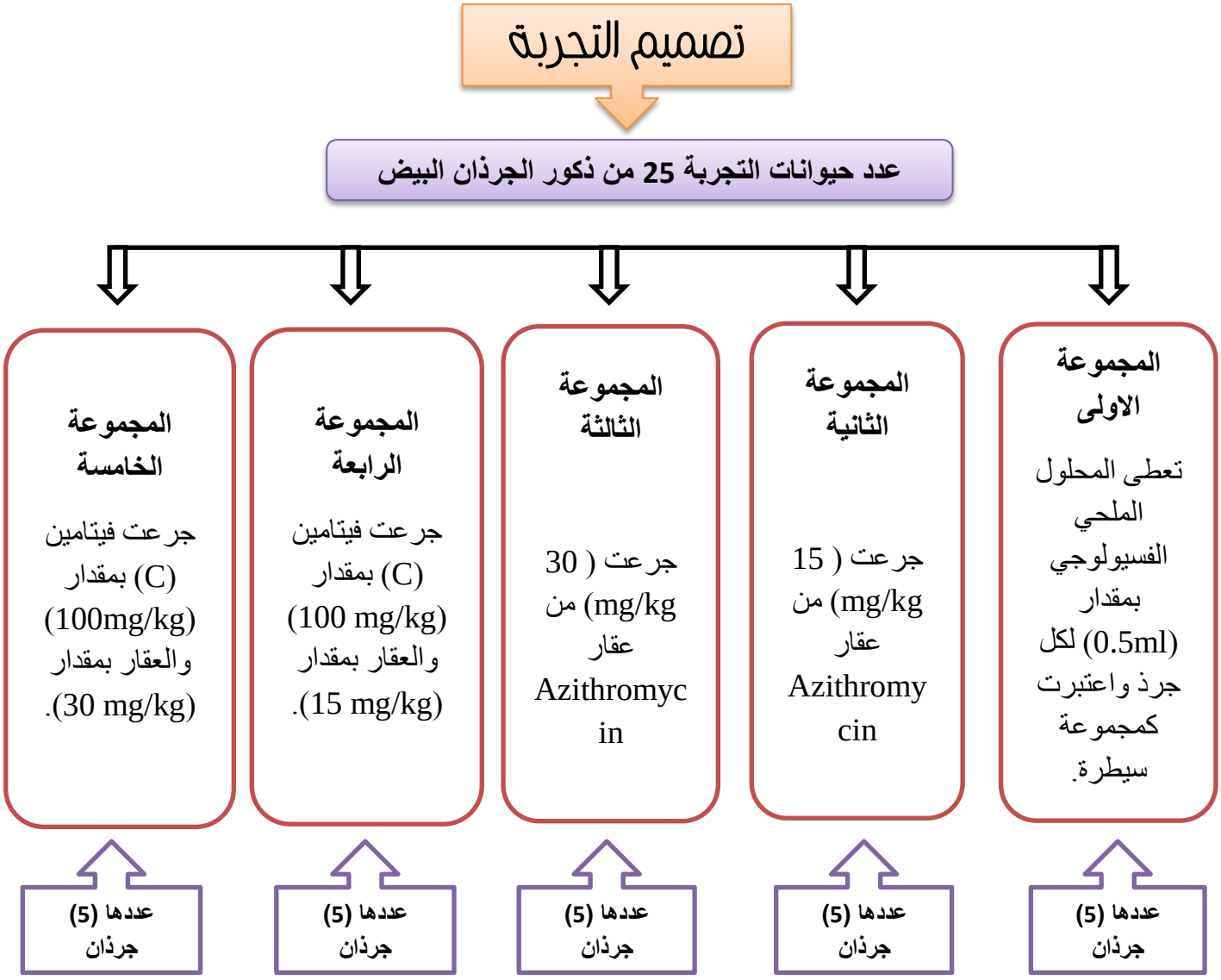
وزعت الحيوانات بصورة عشوائية إلى خمس مجاميع وبصورة متساوية حيث ضمت كل مجموعة (5) جرذان ذكور ومدة التجربة (14) يوم وهذه المجاميع كالاتي :

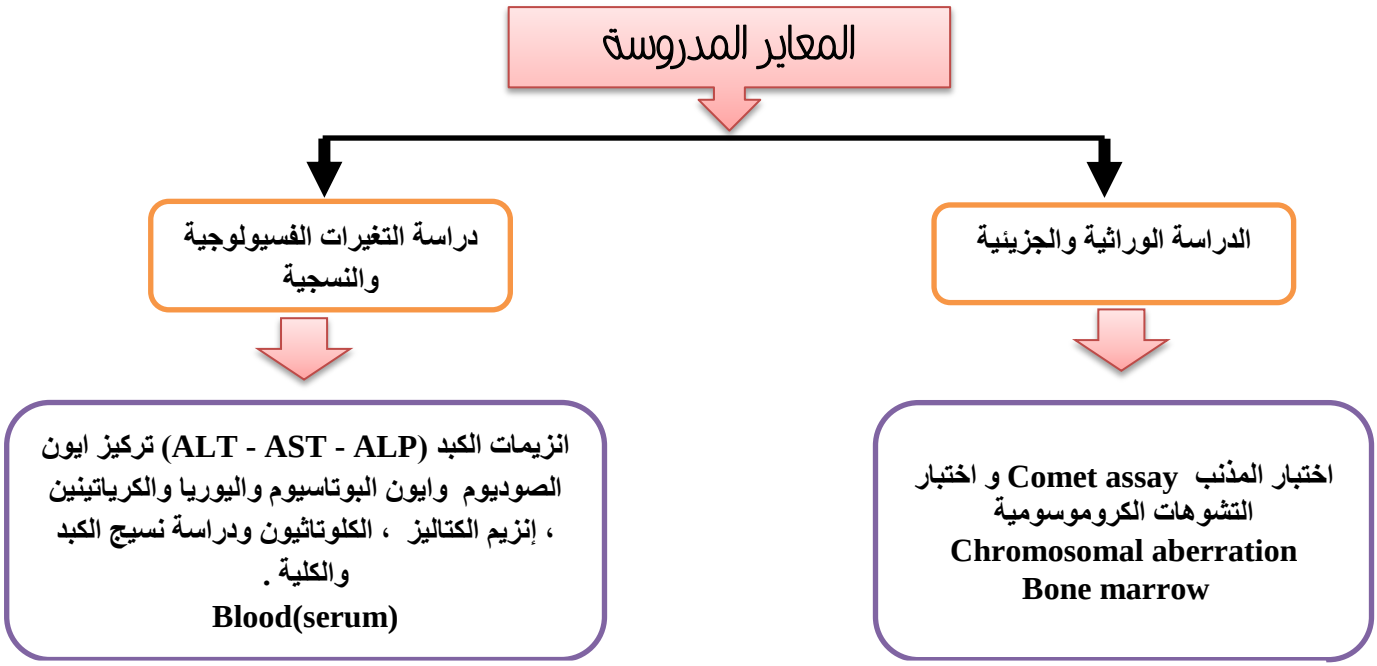
1- المجموعة الاولى والبالغ عددها (5) جرذان والتي تعطى المحلول الملحي الفسيولوجي بمقدار (0.5 ml) لكل جرذ واعتبرت كمجموعة سيطرة.
2- المجموعة الثانية والبالغ عددها (5) جرذان والتي تم تجريعها (15mg/kg) من عقار Azithromycin.
3- المجموعة الثالثة والبالغ عددها (5) جرذان والتي تم تجريعها (30mg/kg) من عقار Azithromycin.
4- المجموعة الرابعة والبالغ عددها (5) جرذان والتي جرعت فيتامين (C) بمقدار (100 mg/kg) والعقار بمقدار (15 mg/kg) من عقار Azithromycin.
5- المجموعة الخامسة والبالغ عددها (5) جرذان والتي جرعت فيتامين (C) بمقدار (100 mg/kg) والعقار بمقدار (30 mg/kg) من عقار Azithromycin.

العقار والفيتامين المستخدم

استخدم في هذه الدراسة :

1- العقار Azithromycin: وتم اعتماد الجرع المعطاة حسب دراسة (Atli *et al*.,2015).
2- الفيتامين C: تم تقدير الجرع المعطاة حسب دراسة (Ahmad *et al*.,2019).





شكل (3-1): يوضح تصميم التجربة و المعايير المدروسة

3.2.3 جمع عينات الدم Collection of blood sample

تم تخدير الحيوانات باستعمال مادة التخدير(الكلوروفورم) ليتم تخديره عن طريق التنفس ،بعدها سحب الدم (5 مل) من القلب مباشرة عن طريق طعنة القلب للحصول على اكبر كمية من الدم لأجراء الفحوصات الكيموحيوية ومن ثم وضع عينات الدم في انابيب اختبار خالي من أي مادة مانعة تخثر وتوضع في جهاز الطرد المركزي لفصل مصل الدم بسرعة 4000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وتحفظ الامصال (serums) في الثلاجة (Refrigerator) في درجة حرارة ($4C^{o}$) لإتمام القياسات الكيموحيوية. وتم جمع عينات من نخاع العظم لأجراء القياسات الوراثية.

3.3. الفحوصات المختبرية:

1.3.3. اختبار المذنب Comet assay

اختبار المذنب Comet assay يستخدم هذا الاختبار لقياس مقدار الضرر في DNA استخدمت العدة oxiselect comet assay kit لاجراء هذا الاختبار كما استخدم برنامج Softwear لاجراء قياسات مختلفة لكل عينة (De Boeck *et al*., 2000;Olive *et al*., 1990).

تحضير الكواشف Reagent preparation

يجب ان تكون الكواشف المحضرة عليها علامات تميزها عن غيرها ويتم اعدادها قبل الاستعمال مباشرة ويوجب استخدام قفازات وبدلات المختبر عند استخدام اي مادة كاشفة XPBS 1 مزج 10XPBS مع الماء الايوني لتجهيز هذا المركب وحفظت بدرجة حرارة الغرفة وتكون كالتالي:-

1- Lysis solution محلول التحلل لتحضير اكثر من عشرة شرائح زجاجية نموذجين في كل شريحة .

a- محلول حلّ الخلايا Lysis solution (40 ml).

b- DMSO (اختياري) 4 مل تم التبريد على درجة حرارة 4 درجة مئوية او في الثلج لمدة 20 دقيقة على الاقل قبل الاستعمال اما اضافة DMSO فهي اختيارية وهي فقط في حالة الخلايا الحاوية على مادة الحديد كالدم والانسجة .

2- هلام المذنب Comet LMAgarose يحضر الهلام الخاص بالفحص وهو صالح للاستعمال مرة واحدة عند إذابته ويتم اذابة الهلام بوضع العلبة في حمام مائي من 90-100 $م^{0}$ لمدة خمس دقائق او حتى ذوبان الهلام مع ازالة غطاء العلبة من اجل السماح للهلام بالتمدد نتيجة الحرارة بعد ذلك تم وضع الهلام في حمام مائي لخفض درجة حرارته وحفظ هذه الدرجة لحين اتمام تحضير العينة .

3- محلول التصبيغ SYBER® green staining solution

إنَّ الكمية المذابة المخزونة من هذه المادة تبقى صالحة للاستعمال لعدة اسابيع اذا ما خزنت على درجة 4 درجة مئوية في الظلام

a_ 1000XSYPER Green مع 1 µlDMSO

b- المحلول المنظم TE PH=7.5.

4- محلول منع التلاشي (اختياري) يحضر في حالة حدوث تلاشي اختفاء في العينات نمزج 500 ملغم من Phenulenedi aminedihydro chloride مع 1XPBS (4.5) ملغم حتى الذوبان في انبوبة بحجم 10 مل .

5- محلول فك الالتفات التحلزن القاعدي Alkaline unwinding solution

عند تحضير هذا المحلول يوجب الحذر وارتداء القفازات في كل 50مل من هذا المحلول يوجد 4.0 غم من NaOH و 250 مايكرو mMغرام EDTA و 200 ملغم من dH2O

يحرك حتى اتمام عملية الذوبان تترتفع درجة حرارة المحلول ، وثم يترك حتى يكون بدرجة حرارة الغرفة قبل الاستعمال .

6- تحضير محلول الترحيل الكهربائي القاعدي لاختبار المذنب ولتحضير1 لتر من محلول الترحيل الكهربائي NaOH8 غرام مسحوق 2 مل 500 Mmو8 pH EDTA، dH2O (بعد ذوبان NaOH تضاف إلى 11) بعد ذلك يحفظ في التبريد بدرجة 4 درجة مئوية .

اختبار تحلل المذنب Comet Assay

1- تحضير محلول التحلل ويبرد على درجة 4 درجة مئوية لمدة 20 دقيقة قبل الاستخدام .

2- اذابة الهلام في بيكر ماء مغلي لمدة 5 دقائق ثم يوضع في حمام مائي على درجة 37 درجة مئوية قبل 20 دقيقة من العمل .

3- مزجت الخلايا بتركيز $10^5 \times 1$مع الهلام الذائب في درجة حرارة 37 درجة مئوية وبنسبة 1:10 (حجم /حجم) وسحبت مباشرة بالماصة إلى شريحة المذنب واذا كان من الضروري نستخدم المساحة الجانبية للفوهة البلاستيكية للماصة لنشر الهلام والخلايا فوق مساحة العينة للشريحة لتأكد من تغطية كافة مساحة العينة واذا لم تتوزع بشكل متساوي تدفئ الشريحة بدرجة 37 درجة مئوية قبل اكمال التطبيق.

4- في حالة العمل مع عدة عينات يجب تقسيم الهلام في قناني او انابيب بدرجة 37 درجة مئوية واضافة الخلايا وتمزج بلطف بطريقة التقليب ونشر 50 µl في مساحة العينة توضع العينات على سطح مستوي ومنظم وعند درجة 4م^0 في الثلاجة لمدة 10دقائق إذ ستظهر قطرة واضحة بقطر

0.55mm في حافة المساحة المحددة للعينة ان زيادة وقت التبلور إلى 30 دقيقة يزيد من التصاق العينات في حالة الرطوبة العالية.

5- غمرت العينات في محلول التحلل بدرجة 4 م^0 لمدة 30- 60 دقيقة ولغرض زيادة حساسية الاختبار يمكن استمرار مدة الحضن بنفس الدرجة لمدة 12 ساعة .

6- يجب ازالة المحلول الزائد من العينة وغمر بمحلول منع الالتفات القاعدي على ان يحضر قبل الاستعمال مباشرة .

7- يستمر الغمر في المحلول السابق لمدة 20 دقيقة في درجة حرارة الغرفة او لمدة ساعة بدرجة 4 م^0 وفي الظلام .

8- لاجراء اختبار المذنب يضاف 1 مل بدرجة 4 م^0 من محلول الترحيل القاعدي ثم ينقل النموذج إلى الترحيل الكهربائي ويغطى بالغطاء الخاص مع ضبط الجهاز على 21 فولت لمدة 30 دقيقة .

9- يزال محلول الترحيل الكهربائي الزائد بلطف وتغمر العينة ب H_2O لمدة خمس دقائق وتكرر العملية مرتين ثم يغمر في محلول كحولي 70% لمدة خمس دقائق.

10- يجفف النموذج في درجة 37 م^0 لمدة 10-15 دقيقة ويعمل التجفيف على جعل الخلايا في مستوى واحد مما يسهل عملت مراقبتها ثم تخزن النماذج في درجة حرارة الغرفة مع التجفيف المسبق لإجراء القياسات في المرحلة .

11- وضع 100مل من صبغة SYBR Green في دائرة الاكروز الجاف ولمدة 30 دقيقة بدرجة حرارة الغرفة في الظلام ثم يرفع النموذج برفق لإزالة الصبغة الزائدة ويغسل في الماء لمدة قليلة ثم يسمح للنموذج ان يجف بشكل كامل بدرجة 37 م^0.

12- يوضع النموذج في المجهر الومضي Fluorescence اذ يكون مرشح الوميض كافي لإجراء الاختبار كما يمكن اجراء خمسين قياس مختلف في هذا الاختبار وتقاس من النسبة W/L دليل المذنب وان المدى 1.2-2.0 يشير إلى ان المستوى الضرر قليل (LD low (DNA damage .

2.3.3. اختبار التشوهات الكروموسومية Chromosomal aberration studies

قبل تشريح الحيوان بثلاث ساعات يحقن كل جرذ تحت الغشاء البريتوني(1ملغم /كغم كولجسين) المحضر مسبقاً .

تحضير الشرائح المجهرية

1- يتم التضحية بالجرذ.

2- يفتح التجويف ألبطني بمقص حاد ، مع الحذر من قطع الأحشاء.

3- وتشمل كل مما يلي:

a- نزيل عظام الساقِ الخلفية (عظم الفخذ وعظم القصبة) بقطع إلى العظامِ من الكاحل وقُرب الحوض قدر الإمكان.

b- نخلع العظامِ مِنْ العضلات والدهونِ قدر الإمكان.

c- نفصل العظمين بالقطع خلال مفصل الركبةَ.

d- بعد قطع العظامِ ،يجب أن تفتح النهايتين كلتيهما في تجويف نُخاع العظم لكل عظم.

4- بعد ذلك تنفذ الخطوات التالية قبل البدء.

a- نملأ حقنة (3مل) بمحلول (كلوريد البوتاسيوم 0.075 مولاري) المحضر مسبقا.

b- ندخل رأس الإبرةِ إلى النهاية الضيّقةِ لأكثر مِن عظم واحد، مع الإمساك بالعظام إذ يَسيل نخاع العظم في أنبوبة الاختبار.

c- نكرر هذا الإجراءِ لبقية العظامِ، حتى يسِيل نخاع العظم من كل واحد إلى أنبوبة الاختبار.

d- يستخدم فقط جزء من كلوريد البوتاسيوم في الحقنة لكل عظم (وبمعنى آخر: لا يَستخدم أكثر من مجموع 3 مل كلوريد البوتاسيوم في الحقنةِ لجرذ واحد.

5- يَسحب المحلول ببطء بواسطة ماصة باستور حتى يكون المعلق الناتج تقريباً مُتَجانسا خلوياً.

6- يحضن معلق الخلايا لمدة 15دقيقة عند 37 م^0 في الحاضنة .

7- ينبذ المعلق بجهاز الطرد المركزي لمدة 2 دقيقة بسرعة 1500 دورة/دقيقة.

8- ويكون من جزئيين :-

a- نزيل الرائق ويبقى الراسب وهو عبارة عن Pellet بيضاء اللون

b- بعد سحب الراشح يتبقى (0.5 مل) ،تفصل بقعة الخلايا ببطء بوساطة رأس الماصة.

-9

a- أملأ الماصة بـ(مثبّت Carnoy) المحضر مسبقاً جديد و بارد، عن طريق إضافته لجدران الأنبوب.

b- يترك المحلولَ يَستقرُّ لمدة 30 ثانية تقريباً، بعد ذلك يسحب ببطء.

c- ينبذ بجهاز الطرد المركزي قبل ذلك.

10- يزال كُلّ الراشح باستعمال الماصة ، بدون بعثرة بقعة الخلايا.

11- يتم إعادة الخطوة 9 ،مرتين قبل الانتقال للخطوة .12

12- تعلق الخلايا بحوالي (1مل)من المثبت.

13 -وهذا يتضمن-:

a- يتم وضع اثنين من الشرائح المجهرية على حافة المنضدة.

b- يجب التأكد من عدم وجود أوراق أو مواد مشتعلة قرب الشرائح.

14- يتم تقطير (2- 4 قطرة) لكل شريحة ثم يتم بسرعة إشعال عود ثقاب تحت معلق الخلايا ندع شخص أخر يقوم بالإشعال إثناء سقوط القطرات على الشرائح المجهرية.

-15

a- ضع الشرائح المجهرية بشكل عمودي على ورق تجفيف ليتحرك السائل خارجاً. لا يتم مسح الشرائح باليد.

b- تترك الشرائح تجف بالهواء.

16- تم صبغ الشرائح إذ توضع في حامل داخل علبة التصبيغ الحاوية على محلول صبغة كمزا (2%) لمدة (10دقيقة)

17- يتم فحص الشرائح تحت العدسة الزيتية.(Tolliverand Robbins,1991) .إذ يتم فحص 1000خلية وحسبت الخلايا المنقسمة والخلايا غير المنقسمة ويحسب معامل الانقسام MI(Mitotic Index)حسب المعادلة الآتية:-

معامل الانقسام=(عدد الخلايا المنقسمة ÷ العدد الكلي للخلايا)×100

3.3.3. قياس بعض المعايير الكيموحيوية

1.3.3.3. تقدير مستوى إنزيم الكاتاليز Determination of Catalase Level

تم قياس مستوى إنزيم الكاتاليز عن طريق تقديم مقايسة لونية بسيطة ودقيقة لأنشطة الكاتلاز(Hadwan and Abed.,2016). تعتمد هذه الطريقة على تفاعل بيروكسيد الهيدروجين غير المتحلل مع موليبدات الأمونيوم لإنتاج لون مصفر له أقصى امتصاص عند 374 نانومتر. تتميز الطريقة بإضافة عامل تصحيح لاستبعاد التداخل الذي ينشأ من وجود الأحماض الأمينية والبروتينات في مصل الدم. يعمل الفحص على منع التداخلات التي نشأت من قياس الامتصاصية عند أطوال موجية غير مناسبة. وحسب التفاعلات الآتية:

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Catalase} 2H_20 + O_2$$

$$Ti^4 + H_2O_2 + H_20 = H_2TiO_{4\,(pertitanic\ acid)} + 4H^+$$

تحضير الكواشف

1- كاشف التيتانيوم: 0.1٪ (حجم / حجم) TiCl4 في 20٪ (حجم / حجم) H2SO4.

2- محلول فوسفات الصوديوم والبوتاسيوم (50mM، 7.4PH): يتم تحضير هذا المحلول بإذابة 1.1 جرام من Na2 HPO4 و 0.27 جرام من KH2 PO4 في 100 مل ماء مقطر.

3- H_2O_2 (20mM) في محلول 50mmol/L صوديوم وفوسفات بوتاسيوم: هذا المحلول مخفف باستخدام معامل انقراض مولاري يبلغ $43.6\ M^{-1}\ cm^{-1}$ عند 240 نانومتر .

طريقة العمل

1- يتم إعداد التكرارات من كل أنابيب اختبار القياسية والعينة ومحلول الكفء .
2- يضاف (100 µl) سيرم الدم كل من العينة و اختبار التحكم (Control-test).
3- وبعد ذلك يضاف ماء مقطر 1000 µl كل أنابيب الاختبار ما عدى العينة .
4- ثم يضاف بيروكسيد الهيدروجين 1000 µl للمحلول القياسي والعينة.
5- يتم مزج الانابيب جيدا ثم حضن في حمام مائي بدرجة 37 سيليزي لمدة دقيقتين.
6- اضافة كاشف التيتانيوم 3000 µL لجميع الانابيب و بعد ذلك يتم حفظ الانابيب في درجة حرارة الغرفة لمدة عشر دقايق ، ثم قرأ الامتصاصية عند طول موجي 452 نانو متر.

الحسابات

يتم حساب تركيز الكاتلاز بحسب المعادلة الآتية :-

$$\text{Catalase Activity of testkU} = \frac{2.303}{t} \times \left[\log \frac{s^0}{S-M}\right] \times \frac{Vt}{Vs}$$

t: الوقت.

S^o: امتصاص الأنبوب القياسي.

S: امتصاص أنبوب الاختبار.

M: اختبار الامتصاصية للتحكم (معامل التصحيح).

Vt: الحجم الكلي للكواشف في أنبوب الاختبار.

Vs: حجم المصل.

2.3.3.3. تقدير الكلوتاثيون Determination of Glutathione

يعتمد أكثر من نوع واحد من الطرق التحليلية المستعملة في تحديد الكلوتاثيون في المصل (GSH) على عمل مجموعات السلفيدريل ،وبالتالي تشمل الأساليب الضوئية ، الأنزيمية ، الفلوريتيري flourometiric وHPLC مبدأ عمل الكشف يعتمد على المركب- Dithiobis (2-nitrob enzoic acid) (DTNB) عبارة عن كروموجين adi يختزل بسهولة مجموعة sulfhydry من GSH لإنتاج مركب أصفر كثيف. اختزال الكروموجين لديه امتصاصية قصوى عند 412 نانومتر ويتناسب مباشرة مع تركيز GSH.

اعداد الكاشف

1. محلول الترسيب . حامض التريكلوروسيتيك (TCA 0 5٪) (50 غم من TCA يذاب في حجم نهائي قدره 100 مل من الماء المقطرDDW .

2. يتم إذابة - EDTA-Na2) (0.4) Ethylene di amine tetra acetic acid- di sodium مليون) 148.9 غم من EDTA في حجم نهائي قدره من الماء المقطرDDW .
3. تحضير بفر.(0.4) Tris-EDTA buffer (pH = 8)
4. يذوب 48.458 غم من تريس في 800 مل من الماء المقطر. DDW. تتم إضافة 100 مل من محلول (0.4M EDTA) ويصل حجمه النهائي إلى 1 لتر مع D الماء المقطر.. ضبط الرقم الهيدروجيني إلى 8.9 بإضافة 1 M من حمض الهيدروكلوريك.
5. DTNB reagent (0.01M).
6. كاشف 0.01M (DTNB) يتم إذابة 0.099 غم من DTNB في الميثانول المطلق ،ويصل حجمه النهائي إلى 25 مل (هذا الكاشف مستقر لمدة 13 أسبوعًا على الأقل عند 4 درجات مئوية).
7. GSH القياسي Standard GSH
8. محلول قياسي ستوك (M 0.001) تم تحضيره عن طريق إذابة 0.0307 غم من GSH بحجم نهائي 100 مل من محلول (EDTA0.4M). التخفيف في محلول EDTA إلى , 20 , 30 , 40 2 ,5 ,10 µM (يجب إعداد محلول العمل القياسي هذا يوميًا).

طريقة العمل

تم تحديد عينة GSH باستخدام طريق عمل معدلة باستخدام كاشف(Ellman DTNB) ، والذي تم تلخيصه على النحو التالي:-

1- يتم إعداد التكرارات من كل أنابيب اختبار القياسية والعينة ثم تحقن في أنابيب الاختبار.
2- يتم اضافة 100 µl من المصل إلى انبوب العينة .
3- اضافة 100 µl إلى المحلول القياسي .
4- وبعد ذلك يضاف ماء مقطر 900 µl كل من العينة ومحلول الكفء في حين يضاف 100 µl للمحلول القياسي .
5- حامض التريكلوروسيتيك TCA يضاف 100 µl إلى جميع الانابيب .
6- يتم خلط الأنابيب في خليط دوامة. بشكل متقطع لمدة 10 - 15 دقيقة ، و في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة في 3000 دورة ، ثم يجمع الطافي Supernatant في أنابيب الاختبار(Owens and Belcher, 1965).

3.3.3.3. قياس تركيز ايون الصوديوم (Sodium ion (Na^{+1})

تم قياس مستوى عنصر الصوديوم في مصل الدم من خلال تغير الونية ، حيث إن الصوديوم معجل بواسطة خلات يورانيل المغنيسيوم ، حيث ايونات اليورانيل باقية على شكل معقد اسمر مصفر مع حامض الكلايكوليك الكبريتي . الاختلاف بين الكاشف الكفء (بدون معجل الصوديوم) والتحليل يتناسب مع تركيز الصوديوم (Henry, 1974).

طريقة العمل

1- يضاف المحلول القياسي 0.2ml ، العينة 0.2ml وتخلط مع 0.1ml معجل الصوديوم كل منه المحلول القياسي والعينة .
2- تغلق الأنابيب وتمزج جيدا وتترك لمدة 5 دقائق وفي خليط دوامة لمدة 30 ثانية ويترك ليستقر مدة 30 دقيقة ويوضع بجهاز الطرد المركزي لمدة 5-10 دقائق بسرعة عالية ، ويفصل الراشح النظيف إلى أنابيب أخرى .
3- يحضر انبوبة الكفء (Blank) بإضافة كل من معجل الصوديوم 0.2ml و الكاشف 1.0ml
4- الراشح من الخطوة الأولى 0.2ml كل من العينة والمحلول القياسي ويضاف الكاشف 1.0ml لكل منهما .
5- تخلط الأنابيب جيدا وتترك لتستقر بدرجة حرارة الغرفة ، وبعدها تقاس الامتصاصية لمحلول الكفء القياسي والعينة بجهاز spectrophotometerعلى طول موجي 410nm.

الحسابات

وتم حساب ايون الصوديوم حسب المعادلة الاتية:-

$$\text{con.of sodium (mmol/L)} = \frac{Abs.\ of\ Blank - Abs.of\ Sample}{Abs.\ of\ Blank - Abs.of\ Standard} \text{x } 150$$

4.3.3.3. قياس تركيز ايون البوتاسيوم (Potassium ion (K^{+1})

لقياس مستوى البوتاسيوم في المصل استعملت عدة الاختبار الجاهزة (Kit) ،قدر مستوى البوتاسيوم من خلال طريقة العكورة Turbidometric. حيث إن مدى العكورة يتناسب مع تركيز البوتاسيوم ومن ثم تم قياس الامتصاصية بطول موجي مقدارة 578 nm (Henry, 1974).

طريقة العمل

1- يضاف المحلول القياسي 25ml إلى العينة ، ويضاف له 25ml من مصل الدم ، بعد ذلك يضاف كاشف البوتاسيوم1000µl كل من العينة والمحلول القياسي .

2- تمزج الأنابيب جيدا وتترك لمدة 5 دقائق في درجة حرارة الغرفة ، وتقاس الامتصاصية للمحلول القياسي والعينة ضد الماء المقطر الذي استعمل كمحلول كفء في (578 nm) ضمن حدود 10 دقائق .

الحسابات

وتم حساب ايون البوتاسيوم حسب المعادلة الاتية:-

$$\text{Con.of potassium (mmol/L)} = \frac{\boldsymbol{Abs.of\ Sample}}{\boldsymbol{Abs.of\ Standard}} \text{ x Con. of Standard}$$

5.3.3.3. تقدير انزيم ناقلة امين الاسباراتات Aspartate aminotransferase

تم قياس مستوى فعالية إنزيم AST في مصل دم الجرذان باستخدام طريقة (Clin,1976; Thefeld et al.,1974) وعلى أساس التفاعلين الآتيين :

$$\text{L} - \text{Asparate} + \text{alpha} - \text{ketoglutarate} \xrightarrow{AST} \text{Oxaloacetate + L-Glutamat}$$

$$\text{Oxaloacetate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{MDH} \text{L} - \text{Malate} + \text{NAD}^+$$

AST: Aspartate aminotransferase

MDH : Malate dehydrogenase.

تحضير الكواشف

1- الكاشف الاول (R1) يتكون من Tris Buffer 88mmol/L و L- الأسبارتات 260mmol/L و نازعة هيدروجين اللاكتات LDH 1500 U/L ومالات ديهيدروجينيز(Malate dehydrogenase) 900U/L.

2- الكاشف الثاني (R2) يتكون من ألفا- كيتوجلوتارات 12mmol/L و NADH 0.24mmol/L

3- يمزج 4 حجم من الكاشف الاول (R1) مع 1 حجم كاشف الثاني (R2) يكون كاشف العمل مستقرًا لمدة 30 يومًا عند $2 - 8C^0$.

طريقة العمل

1- يضاف الكاشف العمل 1000 µL و العينة100 µL.

2- مزج وحضن في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة .

3- ويتم قياس التغيير في الامتصاصية لكل دقيقة (OD / دقيقة) خلال3دقائق.

الحسابات

تم حساب فعالية انزيم ناقلة امين الاسبارتات في العينة وفق الآتي :

$$\text{SGOT activity (U/L)} = (\text{OD/min}) \times 1745$$

6.3.3.3. قياس أنزيم ناقلة امين ألانين Alanine aminotransferase

تم قياس مستوى فعالية إنزيم ALT في مصل دم الجرذان باستخدام طريقة (Clin,1976; Thefeld *et al.*,1974) وعلى أساس التفاعلين الآتيين :

$$\text{L} - \text{Asparate} + \text{alpha} - \text{ketoglutarate} \xrightarrow{ALT} \text{Oxaloacetate + L-Glutamat}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{LDH} \text{L} - \text{Lactate} + \text{NAD}^+$$

ALT – Alanine aminotranferase

LDH - Lactate dehydrogenase

تحضير الكاشف

1- الكاشف الاول (R1) يتكون من Tris Buffer 110mmol/L و L- ألانين 600mmol/L و نازعة هيدروجين اللاكتات LDH 1500 U/L

2- الكاشف الثاني (R2) يتكون من ألفا- كيتوجلوتارات 16mmol/L و NADH 0.24mmol/L

3- يمزج 4 حجم من الكاشف الاول (R1) مع 1 حجم كاشف الثاني (R2) يكون كاشف العمل مستقرًا لمدة 30 يومًا عند $2 - 8C^0$.

طريقة العمل

1- يضاف الكاشف العمل 1000 µL و العينة100 µL.

2- تمزج ويحضن لمدة 1 عند 37 درجة مئوية.

3- ويتم قراءة التغيير في الامتصاصية كل 20 ثانية خلال 1 دقيقة .

الحسابات

تم حساب فعالية انزيم ناقلة امين ألانين في العينة وفق الآتي :

$$\text{SGPT activity (U/L)} = (\text{OD/min}) \times 1745$$

7.3.3.3. قياس فعالية إنزيم الفوسفاتيز القاعدي Alkaline phosphatase

تم تقدير مستوى إنزيم ALP بحسب طريقة (Schlebusch *et al*.,1974; Z. Klin,1972) التحديد لـ ALP وفقًا للتفاعل التالي:

$$\text{Para} - \text{nitrophenyl phosphate} + H_2O \xrightarrow{ALP} \text{p} - \text{nitrophenol} + \text{Inorgnic phosphate}$$

تحضير الكواشف

1- الكاشف الاول (R1) يتكون من عازلة ديثانولامين (Diethanolamine Buffer) (125mmol/L) و كلوريد المغنيسيوم 0.625mmol/L

2- الكاشف الثاني (R2) يتكون فوسفات نيتروفينيل (P-Nitrophenyl phosphate) (50mmol/L)

3- يمزج 4 حجم من الكاشف الاول (R1) مع 1 حجم كاشف الثاني (R2) يكون كاشف العمل مستقرًا لمدة 30 يومًا عند $2 - 8C^0$.

طريقة العمل

1- يضاف الكاشف العمل 1000 µL و العينة20 µL.

2- مزج وحضن في درجة حرارة 37 درجة مئوية لمدة دقيقة واحدة.

3- ويتم قياس التغيير في الامتصاصية لكل دقيقة (OD / دقيقة) خلال 3 دقائق.

الحسابات

تم حساب فعالية انزيم الفوسفاتيز القاعدي في العينة وفق الآتي :

$$\text{ALP Activity (U/L)} = (\text{OD} / \text{min.}) \times 2750$$

8.3.3.3. تقدير تركيز اليوريا Urea

تم قياس مستوى اليوريا في مصل الدم بحسب طريقة (Kassirer and New eng.,1971; Talke et al.,1965) تحديد الأنزيمي لليوريا حسب التفاعل التالي:

$$\boldsymbol{Urea + H_2O \xrightarrow{Urease} 2NH_3 + CO_2}$$

$$\boldsymbol{2NH_3 + 2 - ketoglutarate + 2NADH \xrightarrow{GLDH} L - Glutamate + 2NAD^2 + H_2O}$$

طريقة العمل

1- يضاف الكاشف 1000 µl كل من انبوبة العينة والمحلول القياسي وبعد ذلك يضاف 10 µl محلول قياسي ثم يتم 10 µl السيرم إلى انبوبة العينة .

2- رجت الأنابيب و قراءة الامتصاصية (T1) بعد 30 ثانية من العينة أو الإضافة القياسية. والقراءة الثانية (T2) بعد 60 ثانية من القراءة الأولى.

الحسابات

تم قياس مستوى اليوريا حسب المعادلات الآتية:

$$\text{Urea Conc.}\left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right) = \frac{(T_1 - T_2)\ of\ sample}{(T_1 - T_2)\ of\ standard} \times 50$$

$$Urea\ BUN\ Conc.\left(\frac{mg}{dL}\right) = \frac{(T_1 - T_2)\ of\ sample}{(T_1 - T_2)\ of\ standard} \times 23.4$$

9.3.3.3. تقدير تركيز الكرياتنين Creatinine

تم قياس مستوى الكرياتنين استنادا إلى الطريقة المذكورة في عدة التقدير *Kit* (Artiss *et al.*,1984) حيث يمكن الحصول على تركيز الكرياتينين عن طريق قياس صبغة الكينون قياس ضوئي حسب التفاعل التالي:

$$\text{Creatinine} + H_2O \xrightarrow{Creatininase} \text{Creatine}$$

$$\text{Creatine} + H_2O \xrightarrow{Creatinase} \text{Sarcosine} + \text{Urea}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow{Sarcosine\ Oxidase} \text{Glycine} + \text{HCHO} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + 4 - AA^{*1} + TOOS^{*2} \xrightarrow{Peroxidase} \text{Quinone pigment} + 4H_2O$$

*1:4-Aminoantipyrine

*2: N-ethyl-N-(2-hydroxy -3-sulfopropyl)-m-toluidine

طريقة العمل

1- يضاف الكاشف الأول 450 µL كل من أنابيب المعيار والعينة و أنبوبة الكفء (Blank).

2- يضاف 10 µL Calib./Std للأنبوبة المعيار . وبعدها يضاف للعينة 10 µL من السيروم
3- يخلط ويحضن لمدة 5 دقائق عند 37 درجة مئوية.
4- ثم تم اضافة الكاشف الثاني 150 µL للكل .
5- يتم مزج واحتضان لمدة 5 دقائق عند 37 درجة مئوية. قياس امتصاص العينة والمعيار مقابل كاشف فارغ(Blank).

الحسابات

تم حسابها بحسب المعادلة التي:

$$\text{Creatinine Conc } \left(\frac{\text{mg}}{\text{dL}}\right) = \frac{Absorbance\ of\ sample}{Absorbance\ of\ Standard} \times \text{standard conc.}$$

4.3.3. التحضيرات النسجية Histological preparations

تم حفظ العينة في البداية بعد استئصالها من الحيوان في محلول الفورمالين بتركيز10 % وبعد 24-48 ساعة استخرجت من الفورمالين وغسلت بالماء الجاري وبعدها اجريت عليها سلسلة من العمليات اعتماداً على الطريقة الموصوفة من قبل (Suvarna *et al*.,2013).

1.4.3.3. الانكاز والترويق Dehydration and Clearing

تم سحب الماء من النسيج وذلك بتمرير النماذج في سلسلة تراكيز تصاعدية من الكحول الاثيلي (70%، 80%، 90%، 100%، 100%) ولمدة ساعتين في كل تركيز بعدها روقت النماذج بوضعها في الزايلين لمدة ساعة- ساعتين.

2.4.3.3. الارتشاح Infiltration

بعد الانتهاء من عملية الترويق نقلت النماذج إلى أواني زجاجية حاوية على خليط من شمع البرافين Paraffin wax ذي درجة انصهار 57-60 مْ المنصهر والمرشح والزايلين بنسبة 1:1 لمدة نصف ساعة داخل فرن كهربائي درجة حرارته 60 مْ وذلك لابقاء الشمع منصهراً ولضمان تمام عملية التشريب الكامل للنماذج بالشمع نقلت إلى قناني أخرى حاوية على شمع البرافين داخل الفرن ايضاً لمدة ساعتين ثم نقلت مرة أخرى إلى قناني أخرى حاوية على شمع البرافين لمدة ساعتين ايضاً.

3.4.3.3. الطمر Embedding

تم عمل قوالب من الشمع حاوية على نماذج العينات وذلك بصب الشمع في قوالب حديد خاصة على شكل حرف L طمرت فيها النماذج وتركت في درجة حرارة المختبر لتتصلب ثم فصلت عن القالب وحفظت حتى وقت تقطيعها.

4.4.3.3. التقطيع Sectioning

تم استخدام جهاز المشراح اليدوي الدوار Rotary Microtome لتقطيع النماذج وبسمك تراوح ما بين 5-6 مايكروميتر، ثم حملت اشرطة المقاطع على شرائح زجاجية Slides نظيفة بعد أن وضعت في حمام مائي درجة حرارته 50 مْ لمدة دقيقة- دقيقتين لضمان فرش المقاطع على الشرائح بعدها تركت على صفيحة ساخنة Hot Plate لتجف بدرجة حرارة 37 م^0.

5.4.3.3.التصبيغ والتحميل Staining and Mounting

صبغت جميع المقاطع النسجية باستخدام صبغة هيماتوكسلين- ايوسين Haematoxylin-Eosin stainاذ وضعت الشرائح في الزايلين لمدة 5 دقائق للتخلص من الشمع ثم مررت بسلسلة تراكيز تنازلية من الكحول الاثيلي (100%، 100%، 90%، 80%، 70%، 50%) لمدة 5 دقائق في كل تركيز بعدها صبغت بصبغة الهيماتوكسلين لمدة 5 دقائق ثم غسلت بالماء الجاري لمدة 10 دقائق بعدها غطست بالكحول الحامضي لمرتين أو ثلاث مرات لإزالة الصبغة الزائدة ثم صبغت بصبغة الايوسين لمدة 30 ثانية وغسلت بعدها بالماء المقطر لمدة 5 دقائق ونقلت بعدها إلى سلسلة تصاعدية من الكحول الاثيلي (50%، 70%، 80%، 90%، 100%، 100%) ولمدة دقيقتين في كل تركيز ما عدا التركيز الأخير وضعت فيه لمدة 5 دقائق ثم روقت بالزايلين لمدة 10 دقائق بعدها أجريت عليها عملية التحميل باستخدام D.P.X لتثبيت غطاء الشريحة ثم تركت على صفيحة ساخنة لتجف لمدة 8 ساعات لتكون جاهزة للفحص.

6.4.3.3. التصوير المجهري Microphotography

تم تصوير المقاطع النسجية باستخدام مجهر ضوئي نوع MEIJI light microscope مزود بكاميرا مجهر Digital Camera نوع Canon عالية الدقة.

5.3.3.التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم إجراء التحليل الإحصائي لتجربة وفق التصميم العشوائي الكامل لدراسة تأثير الفعالية التطفيرية لعقار (Azithromycin) والدور الوقائي لفيتامين C في ذكور الجرذ الأبيض حيث استعمال تحليل التباين الثنائي واختبار LSD الفرق المعنوي الأصغر لبيان دلالة الفروق بين الأوساط الحسابية لمتغيرات البحث المدروس علما أن جميع التحليلات الاحصائية قد تمت باستخدام البرنامج الاحصائي الجاهز SPSS.V.25 (الساهوكي ووهيب ، 1990).

الفصل الرابع

النتائـــج

Results

4. النتائج Results

4 .1. تأثير عقار الأزيثرومايسين وفيتامين C على نسبة تحطم DNA.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية جدول (4-1) انخفاضاً معنوياً ($P <0.05$) في نسبة DNA غير المتحطم مقارنة مع مجموعة السيطرة، للمجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15- 30 mg/kg) على التوالي . وأشار الجدول أيضاً الجدول الى وجود انخفاض معنوي ($P<.0.05$) في نسبة DNA غير المتحطم في مجاميع الوقائية الرابعة والخامسة ومقارنة مع مجموعة السيطرة ، التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg) على التوالي .

بين جدول (4-1) انخفاضاً معنوياً ($P <0.05$) في نسبة التحطم القليل في DNA ومقارنة مع مجموعة السيطرة، للمجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15- 30 mg/kg) على التوالي .بينما اظهرت المجاميع الوقائية الرابعة والخامسة عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$) في نسبة تحطم قليل في DNA مقارنة مع مجموعة السيطرة، التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg) على التوالي .

بين جدول (4-1) ارتفاعا معنويا ($P <0.05$) في نسبة متوسط تحطم في DNA في مجاميع الثانية والثالثة ومقارنة مع مجموعة السيطرة، التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي.

أمَّا المجموعة الوقاية الرابعة عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) في نسبة تحطم متوسط في DNA ومقارنة مع مجموعة السيطرة، التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15mg/kg) على التوالي ، والمجموعة الخامسة ارتفاعا معنويا ($P <0.05$) في نسبة متوسط تحطم في DNA ومقارنة مع مجموعة السيطرة، التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (30 mg/kg) على التوالي .

بينت الدراسة الحالية في الجدول (4-1) ارتفاعا معنويا ($P <0.05$) في نسبة تحطم عالي في DNA في المجموعة الثالثة ومقارنة مع مجموعة السيطرة، حيث اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (30 mg/kg).

أمَّا المجاميع الثانية والرابعة والخامسة عدم وجود فروقات معنوية ($P>0.05$) في نسبة تحطم عالي في DNA ومقارنة مع مجموعة السيطرة الاول .

جدول (4-1) تأثير عقار الأزيثرومايسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على نسبة تحطم لـ(DNA)

المجاميع	غير متحطم %(mean±SE)	تحطم قليل (mean±SE)	% تحطم متوسط (mean±SE)	% تحطم عالي (mean±SE)
السيطرة	A 49.064±3.282	A 40.010±3.065	D 5.304±0.853	C 5.622±1.018
مجموعة العقار G2 (15mg/kg)	C 39.282±2.405	B 35.428±2.526	B 13.090±2.752	A 12.200±1.864
مجموعة العقار G3 (30mg/kg)	D 35.560±1.722	B 34.782±1.268	A 16.064±2.460	A 13.594±0.888
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G4 (15mg/kg)	B 44.408±0.957	A 40.872±0.815	D 7.580±1.059	C 7.140±0.807
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G5 (30mg/kg)	C 41.506±1.790	A 38.954±1.397	C 10.194±1.504	B 9.354±0.875
P-Value	0.00014	0.00021	0.0002	0.00011
LSD	2.869293	2.638604	2.485756	6.837499

لمعدل ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة المختلفة بالأتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية P>0.05.

2.4. تأثير عقار الأزيثروميسين وفيتامين (C) على معدل التشوهات الكروموسومية.

واظهرت نتائج الدراسة في جدول (4-2) ارتفاعاً معنوياً (P<0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات المحذوفة (Deletion) في المجموعة الثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (30mg/kg) مقارنة مع مجموعة السيطرة . أمَّا المجاميع الثانية والرابعة والخامسة بينت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات المحذوفة مقارنة مع مجموعة السيطرة.

اوضحت نتائج الدراسة في جدول (4-2) ارتفاعا معنويا (P<0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات الثنائية المركز(Dicentric) في المجموعة الثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (30mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

أمَّا المجاميع الثانية والرابعة والخامسة عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات الثنائية المركز ومقارنة مع مجموعة السيطرة .

كما بينت الدراسة في جدول (4-2) ارتفاعاً معنوياً (P <0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات اللامركزية (Acentric) في المجموعة الثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز

(30mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا المجاميع الثانية والرابعة والخامسة أظهرت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات اللامركزية مقارنة مع مجموعة السيطرة .

اشارت الدراسة في جدول (4-2) ارتفاعاً معنوياً (P <0.05) في نسبة ظهور الكروموسوم الحلقي(Ring) في المجموعة الثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (30mg/kg) مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا المجاميع الثانية والرابعة والخامسة أوضحت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في نسبة ظهور الكروموسوم الحلقي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

كما اشارت الدراسة في جدول (4-2) ارتفاعا معنويا (P <0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات المتكسرة (Chromosome break) في المجاميع العلاجية الثانية الثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا المجاميع الوقاية الرابعة والخامسة بينت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في نسبة ظهور الكروموسومات المتكسرة التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100 mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

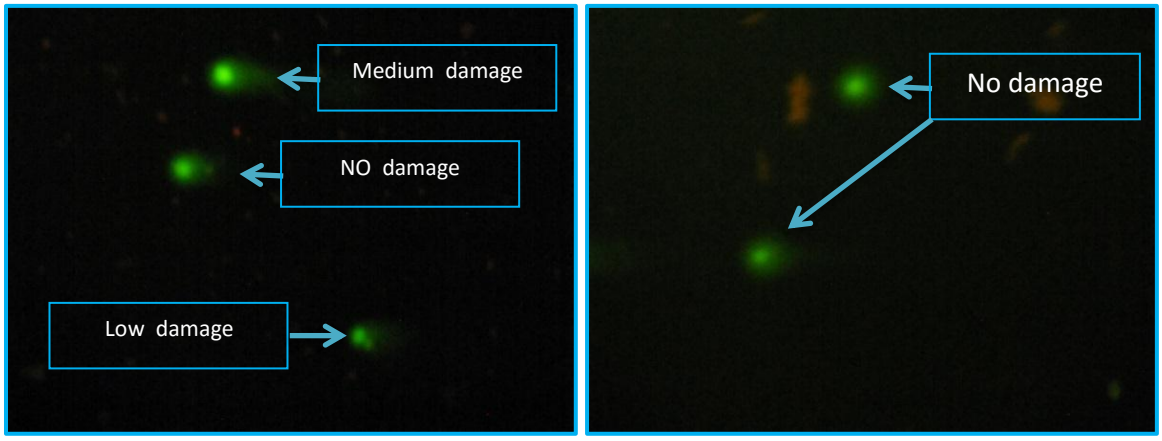
واشارت الدراسة الحالية في الجدول (4-2) ارتفاعاً معنوياً (P <0.05) في نسبة التشوهات الكروموسومات الكلية Total في مجاميع العلاجية الثانية و الثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .أمَّا المجاميع الوقاية الرابعة والخامسة أوضحت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في نسبة التشوهات الكروموسومات الكلية Total التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg) على التوالي ومقارنة مع مجموعة السيطرة .

جدول (4-2) تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على نسب (ظهور الكروموسومات المحذوفة- ظهور الكروموسومات الثنائية المركز - ظهور الكروموسومات اللامركزية - ظهور الكروموسوم الحلقي- ظهور الكروموسومات المتكسرة- ظهور التشوهات الكروموسومات الكلية).

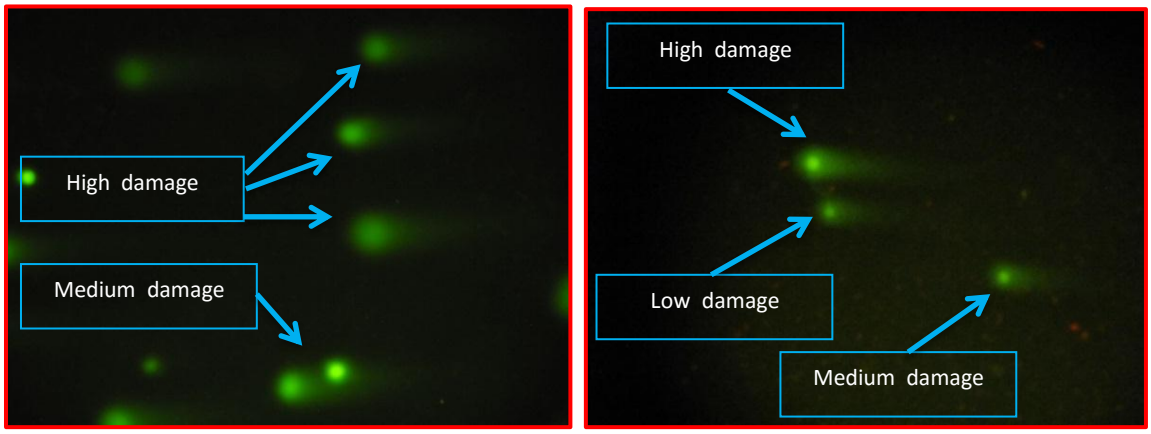
المجاميع	الكروموسومات % المحذوفة (mean+SE)	الكروموسومات % الثنائية المركز (mean+SE)	الكروموسومات % اللامركزية (mean+SE)	الكروموسوم الحلقي % (mean+SE)	الكروموسومات % المتكسرة (mean+SE)	التشوهات الكروموسومات الكلية % (mean+SD)
السيطرة	B 0.1912+0.0964	B 0.25020+0.04794	BC 0.3966+0.0728	B 0.08540+0.08636	C 0.17100+0.06643	C 1.0946+0.1564
مجموعة العقار G2 (15mg/kg)	AB 0.3106+0.0772	B 0.32880+0.08142	AB 0.4386+0.1145	B 0.17040+0.10639	B 0.27260+0.07571	B 1.5208+0.3061
مجموعة العقار G3 (30mg/kg)	A 0.4136+0.1588	A 0.51460+0.11392	A 0.5602+0.1399	A 0.29240+0.06468	A 0.36440+0.07659	A 2.1450+0.3680
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G4 (15mg/kg)	B 0.1888+0.0956	B 0.27480+0.13352	C 0.2912+0.0961	B 0.14680+0.06329	C 0.16460+0.05364	C 1.0656+0.2805
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G5 (30mg/kg)	B 0.2112+0.1097	B 0.33200+0.08587	BC 0.3548+0.0648	B 0.10460+0.07608	C 0.16760+0.06082	BC 1.1710+0.1507
P-Value	0.017	0.003	0.006	0.006	0.00011	0.0002
LSD	0.146318	0.128047	0.133895	0.106774	0.088698	0.351539

المعدل ± الخطأ القياسي

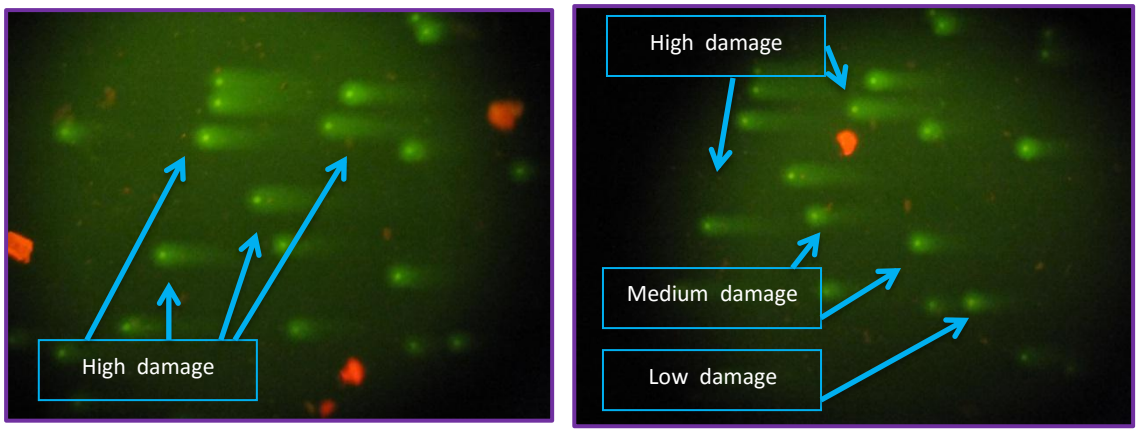
الحروف الكبيرة المختلفة بالأتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية P> 0.05.



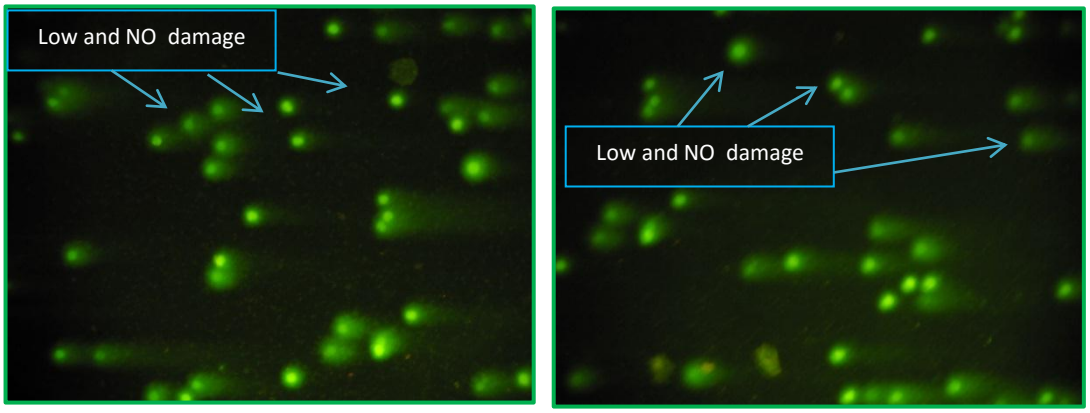
شكل (4-1) تبين DNA في مجموعة السيطرة



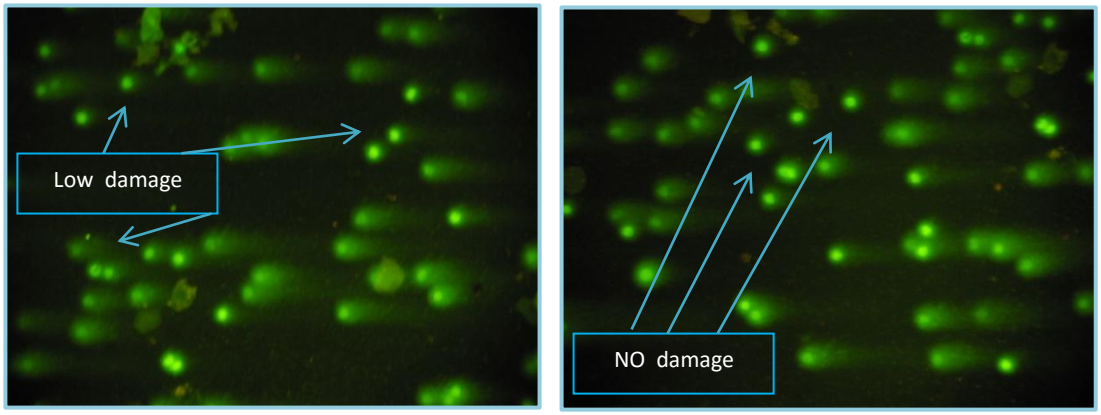
شكل (4-2) تبين تحطم قليل والمتوسط في DNA في المجموعة العلاجية الثانية



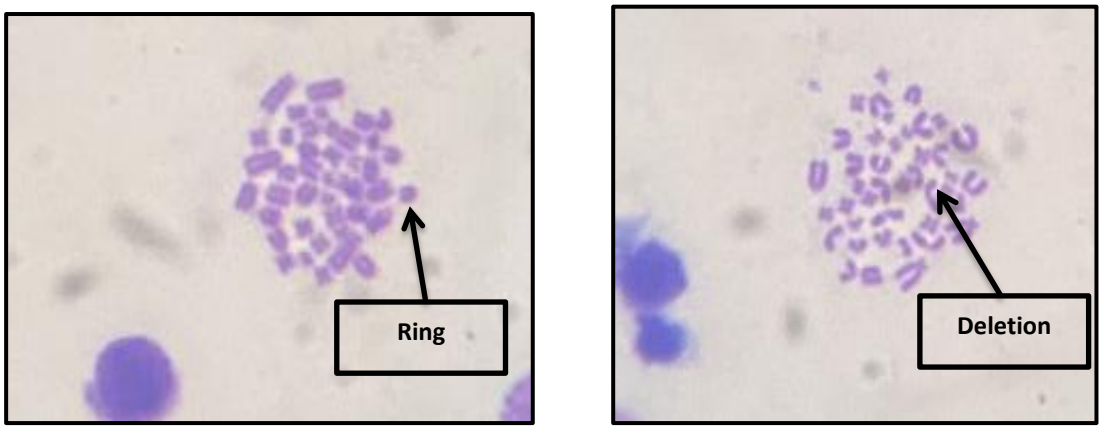
شكل (4-3) تبين تحطم عالي في DNA في المجموعة العلاجية الثالثة



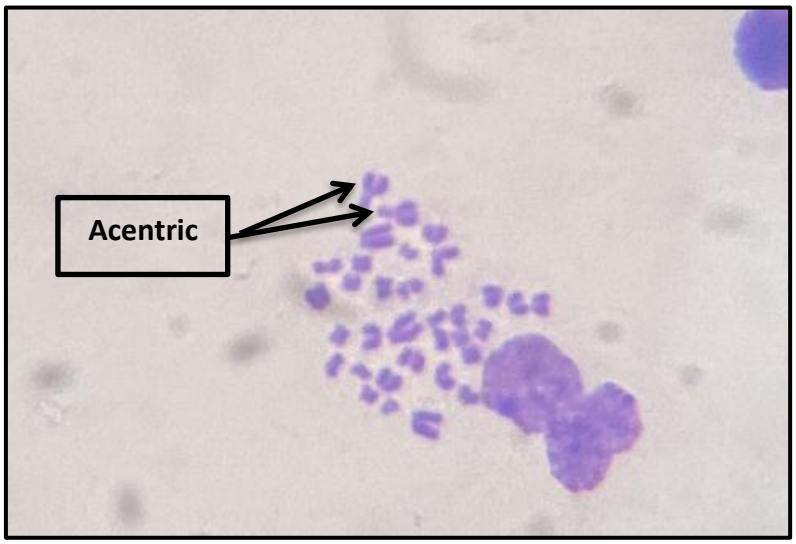
شكل (4- 4) تبين DNA طبيعي غير متحطم او قليل في مجموعة الوقاية الرابعة



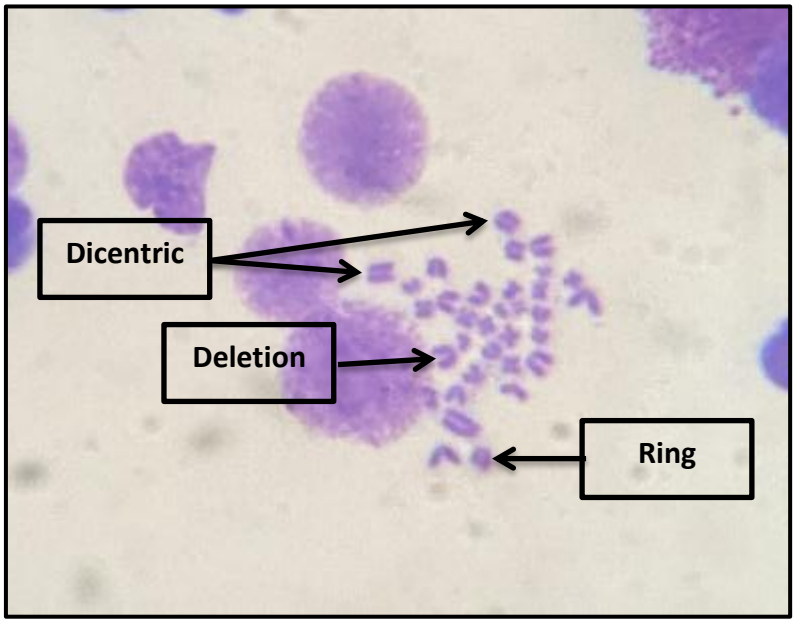
شكل (4- 5) تبين DNA طبيعي غير متحطم او قليل في مجموعة الوقاية الخامسة



شكل (4- 6) كروموسوم حلقي و المحذوفة في الطور الاستوائي لخلايا نقي العظم للجرذان مجموعة السيطرة (قوة التكبير1000، صبغة كمزا)



صورة (4- 7) كروموسوم لا مركزي في الطور الاستوائي لخلايا نقي العظم للجرذان للمجموعة العلاجية الثانية (قوة التكبير1000، صبغة كمزا)



صورة(4-8) كروموسومات محذوفة و كروموسوم لا مركزي و حلقي في الطور الاستوائي لنقي العظم في الجرذان لمجموعة العلاج الثالثة (قوة التكبير 1000، صبغة كمزا)

3.4. تأثير عقار الأزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى الكلوتاثيون GSH و الكتاليز CAT.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية جدول (3-4) انخفاضاً معنوياً (P< 0.05) في مستوى الكلوتاثيون GSH و الكاتاليز CAT في مصل الدم لذكور الجرذان البيض في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

أمَّا المجاميع الوقائية اظهرت نتائج الدراسة لمستوى الكلوتاثيون GSH و الكاتاليز CAT في مصل الدم لذكور الجرذان البيض عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في المجاميع الرابعة والخامسة التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg)على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .

جدول (3-4): تأثير عقار أزيثرومايسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى الكلوتاثيون GSH والكاتاليز CAT في ذكور الجرذان البيض

المجاميع	الكلوتاثيونmmol/mg (mean±SE)	الكتاليزU/ml (mean±SE)
السيطرة	AB 4.0920±0.3293	A 468.03±10.24
مجموعة العقار G2 (15mg/kg)	C 3.1120±0.2564	C 390.30±17.50
مجموعة العقار G3 (30mg/kg)	D 2.1500±0.2664	C 382.96±35.32
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار (15mg/kg) G4	A 4.1480±0.4277	AB 430.08±27.27
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار (30mg/kg) G5	B 3.6400±0.4300	BC 405.91±43.16
P-Value	0.0003	0.001
LSD	0.462697	38.53176

المعدل ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة المختلفة بالأتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية P>0.05.

4.5. تأثير عقار الأزيثروميسين وفيتامين (C) على الشوارد.

أظهرت نتائج الدراسة الحالية في جدول (4-4) وجود انخفاضاً معنوياً (P<.0.05).في معدل مستوى الصوديوم في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي أعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .أمَّا المجاميع الوقاية الرابعة والخامسة فبينت عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05) في معدل مستوى الصوديوم التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

وكذلك بينت الدراسة في جدول (4-4) وجود ارتفاع معنوي(P<0.05).في معدل مستوى البوتاسيوم في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة. في حين اظهرت مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة ارتفاع معنوي (P<0.05) في معدل مستوى البوتاسيوم التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

جدول رقم (4-4): تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى الصوديوم (mmol/L) والبوتاسيوم (mmol/L) في ذكور الجرذان البيض

المجاميع	الصوديوم mmol/L (mean±SE)	البوتاسيوم mmol/L (mean±SE)
السيطرة	A 178.27±10.72	D 4.0014±0.0374
مجموعة العقار G2 (15mg/kg)	B 167.31±5.86	B 4.4166±0.1817
مجموعة العقار (30mg/kg) G3	C 154.90±10.13	A 4.8734±0.1406
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G4 (15mg/kg)	AB 173.65±5.26	C 4.1962±0.0550
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G5 (30mg/kg)	AB 171.92±4.13	BC 4.2704±0.0678
P-Value	0.001	0.00013
LSD	10.15948	0.146911

المعدل ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة المختلفة بالأتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية P> 0.05.

5.4. تأثير عقار ألازيثرومايسين وفيتامين (C) على انزيمات الكبد.

أشارت نتائج الدراسة في جدول (4-5) الى ارتفاع معنوي($P<.0.05$) في معدل مستوى انزيم ناقلة أمين الاسباراتات AST في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة. أمَّا مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة فاظهرت عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$) في معدل مستوى انزيم ناقلة امين الاسباراتات AST التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (30-15 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة.

كما بينت نتائج الدراسة في جدول (4-5) عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$) في معدل مستوى أنزيم ناقلة امين ألانين ALT في المجموعة العلاجية الثانية التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15mg/kg) أمَّا المجموعة الثالثة ارتفاع معنوي($P<.0.05$) في معدل مستوى أنزيم ناقلة امين ألانين ALT التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (30mg/kg) أمَّا مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$) في معدل مستوى انزيم ناقلة امين الاسباراتات AST التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (30-15 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .

اوضح الدراسة في جدول (4-5) عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$). في معدل مستوى انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في المجموعة العلاجية الثانية التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15 mg/kg) أمَّا المجموعة الثالثة ارتفاع معنوي($P<.0.05$) في معدل مستوى انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (30 mg/kg). أمَّا مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة فبينت عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$) في معدل مستوى انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (30-15 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .

جدول (4-5) :تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى انزيمات الكبد التغيرات في الانزيمين الناقلين لمجموعة الامين AST and ALT و في انزيم الفوسفاتيز القاعدي ALP في ذكور الجرذان البيض.

المجاميع	ناقلة أمين الاسباراتات AST U/L(mean±SE)	ناقلة امين ألانين ALT U/L (mean±SE)	الفوسفاتيز القاعدي (mean±SE) ALP U/L
السيطرة	C 59.796±6.313	BC 25.014±3.214	B 69.482±3.572
مجموعة العقار G2 (15mg/kg)	B 68.174±4.642	AB 28.502±2.666	B 73.332±5.942
مجموعة العقار G3 (30mg/kg)	A 77.364±5.596	A 30.132±2.413	A 84.700±4.027
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G4 (15mg/kg)	C 55.260±4.176	C 24.430±3.391	B 70.400±3.965
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار G5 (30mg/kg)	C 60.960± 5.721	BC 26.060±2.449	B 71.316±4.554
P-Value	0.0001	0.023	0.00021
LSD	7.055	3.766	5.914

المعدل ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة المختلفة بالأتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية P> 0.05.

6.4. تأثير عقار أزيثروميسين وفيتامين (C) على مستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتينين Creatinine.

أظهرت نتائج الدراسة في جدول (4-6) وجود ارتفاع معنوي(P<.0.05) في معدل مستوى الكرياتينين Creatinine في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة . أمَّا مجاميع الوقاية اوضحت عدم وجود فروقات معنوية (P<.0.05) في معدل مستوى الكرياتينين للمجموعة الرابعة التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .أمَّا المجموعة الخامسة أدت الى ارتفاع معنوي (P<.0.05) في معدل مستوى الكرياتينين مقارنة مع مجموعة السيطرة التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار

Azithromycin بمقدار (30mg/kg) على التوالي. كما بين الجدول (4-6) ارتفاع معنوي(P<.0.05) في معدل مستوى اليوريا Urea في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي.

أمَّا مجاميع الوقاية اشارت النتائج الى عدم وجود فروقات معنوية (P>0.05). في معدل مستوى اليوريا Urea للمجموعة الرابعة ومقارنة مع مجموعة السيطرة التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (15 mg/kg) على التوالي . أمَّا المجموعة الخامسة أدت الى ارتفاع معنوي (P<.0.05) .في معدل اليوريا Urea مقارنة مع مجموعة السيطرة التي اعطيت فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) والعقار Azithromycin بمقدار (30 mg/kg) على التوالي.

جدول (4-6): تأثير عقار أزيثروميسين (Azithromycin) وفيتامين (C) على مستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتنين Creatinine في مصل الدم لذكور الجرذان البيض

المجاميع	الكرياتنينMg/dl (mean±SE)	اليوريا Mg/dl (mean±SE)
السيطرة	D 0.362±0.0321	C 41.408±3.598
مجموعة العقار G2 (15mg/kg)	B 0.529±0.0409	B 50.040±3.848
مجموعة العقار G3 (30mg/kg)	A 0.621±0.0333	A 53.441±4.903
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار (15mg/kg) G4	CD 0.402±0.0351	C 40.986±3.122
مجموعة المعاملة بفيتامين C (100mg/kg) والعقار (30mg/kg) G5	C 0.448±0.0378	BC 45.372±4.437
P-Value	0.00032	0.0004
LSD	0.0475	5.310

المعدل ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة المختلفة بالأتجاه العمودي تدل على وجود فروقات معنوية P> 0.05.

7.4.تأثير ازثرومايسين وفيتامين C على نسيج الكبد والكلى.

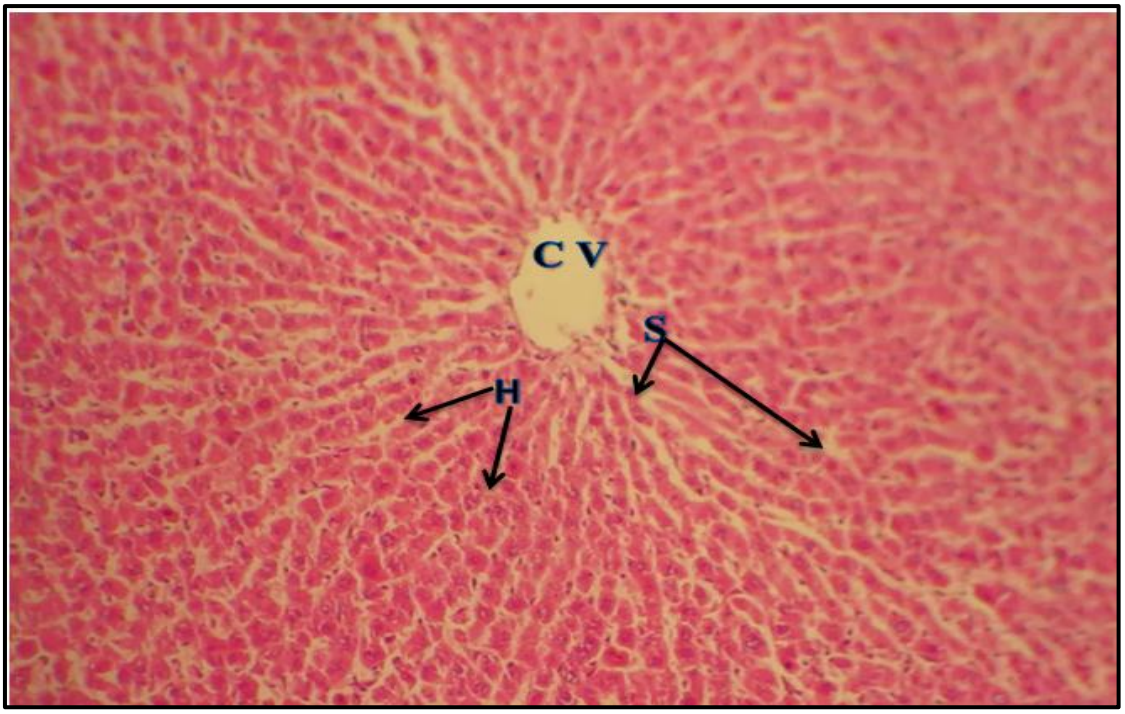
يلاحظ من الصورة (4-9) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة يلاحظ فيه انها مكونة من عدة فصيصات كل فصيص يحتوي على وريد مركزي Central vein محاطا بخلايا مكعبة الشكل هي الخلايا الكبدية Hepatocytes ومرتبة بشكل أشرطة وما بين هذه الأشرطة توجد فسح دموية تسمى بالجيبانيات Sinusoids.

تبين الصورة (4-10) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطائها (mg/kg 15) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها احتقان الوريد المركزي Congestion blood viens تنخر الخلايا الكبدية Necrosis hepatic cell وتغلض الانوية وتوسع الجيبانيات وجود خلايا التهابية مزمنة حول الوريد وعدم انتظام الحبال مقارنة مع مجموعة السيطرة(4-9).

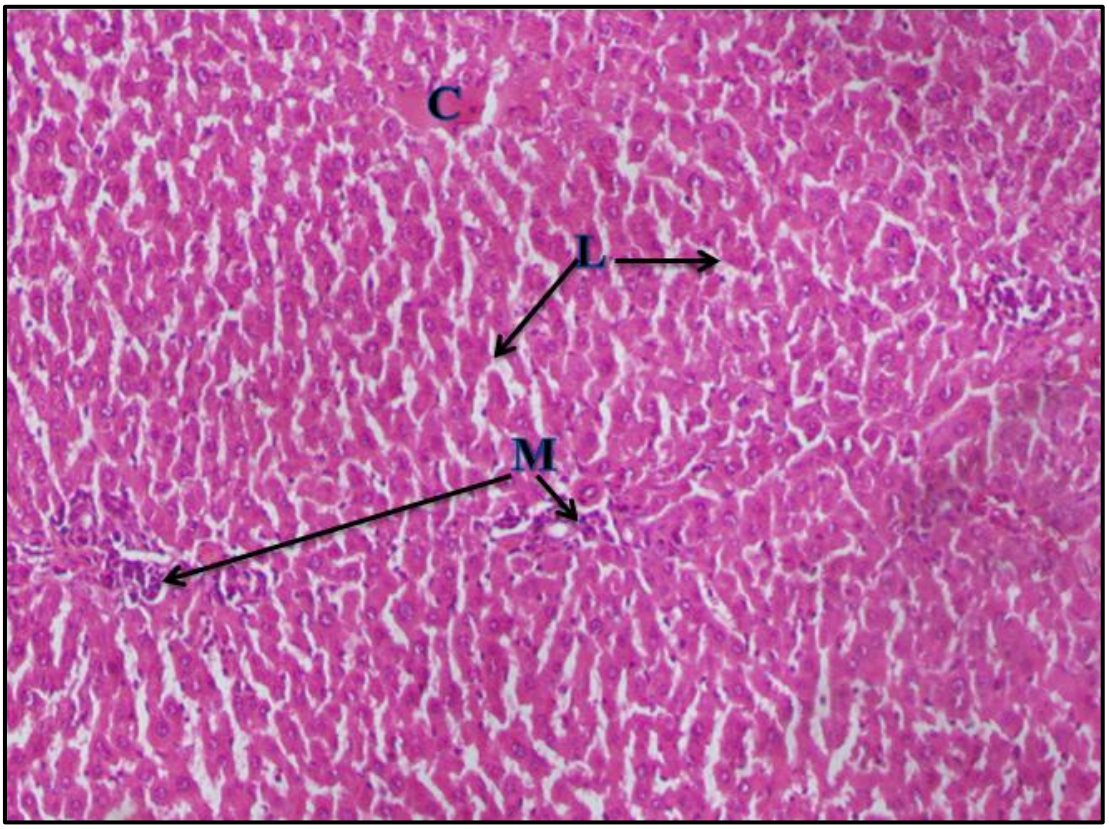
توضح الصورة (4-11) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطائها (30 mg/kg) من عقار Azithromycin ، يظهر بها احتقان الأوعية الدموية Congestion blood viens في الوريد المركزي الكبدي Central vein وتنخر الخلايا الكبدية Necrosis hepatic cell وتغلض الانوية الكبد مع وجود خلايا التهابية مزمنة بين الخلايا الكبدية مع انحلال بعض الخلايا الكبدية مقارنة مع مجموعة السيطرة (4-9).

تبين الصورة (4-12) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم اعطائها فيتامين (C) بمقدار (100 mg/kg) و (15 mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها احتقان الوريد المركزي Congestion blood مع انتظام جزء الحبال الكبدية ووجود الجيبانيات مقارنة مع مجموعة السيطرة (4-9).

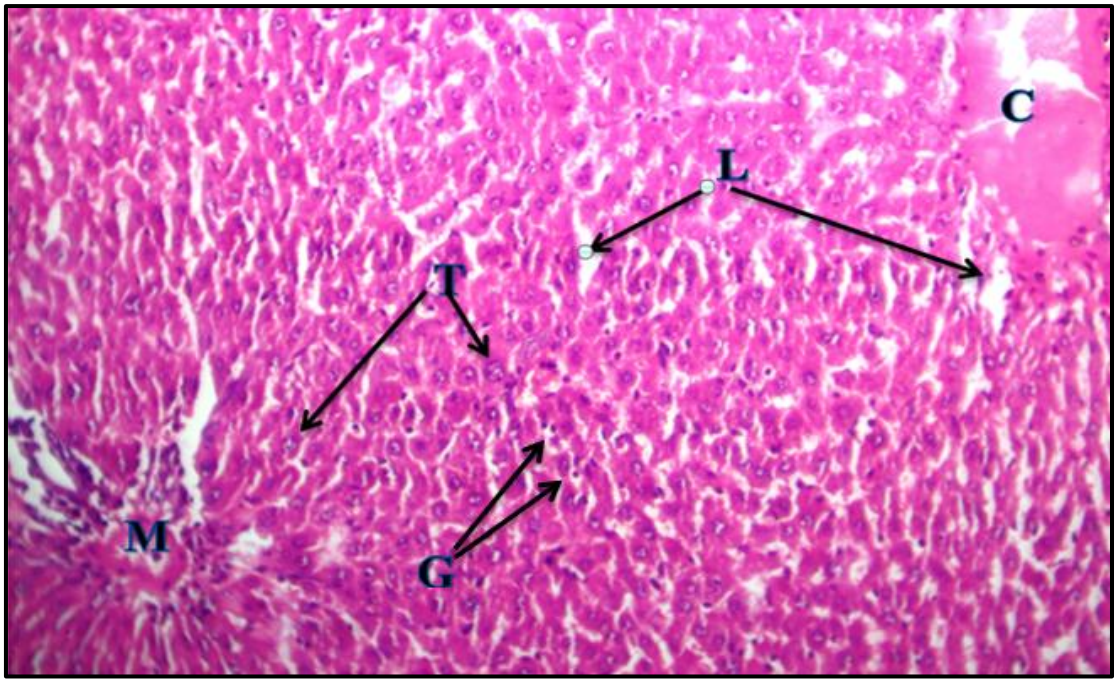
توضح الصورة (4-13) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) و (30 mg/kg) من عقار Azithromycin ، يظهر بها احتقان الأوعية الدموية Congestion blood viens في الوريد المركزي الكبدي Central vein وتنخر الخلايا الكبدية Necrosis hepatic cell وتغلض الانوية الكبد مع وجود خلايا التهابية مزمنة بين الخلايا الكبدية مع انحلال بعض الخلايا الكبدية مقارنة مع مجموعة السيطرة (4 -9).



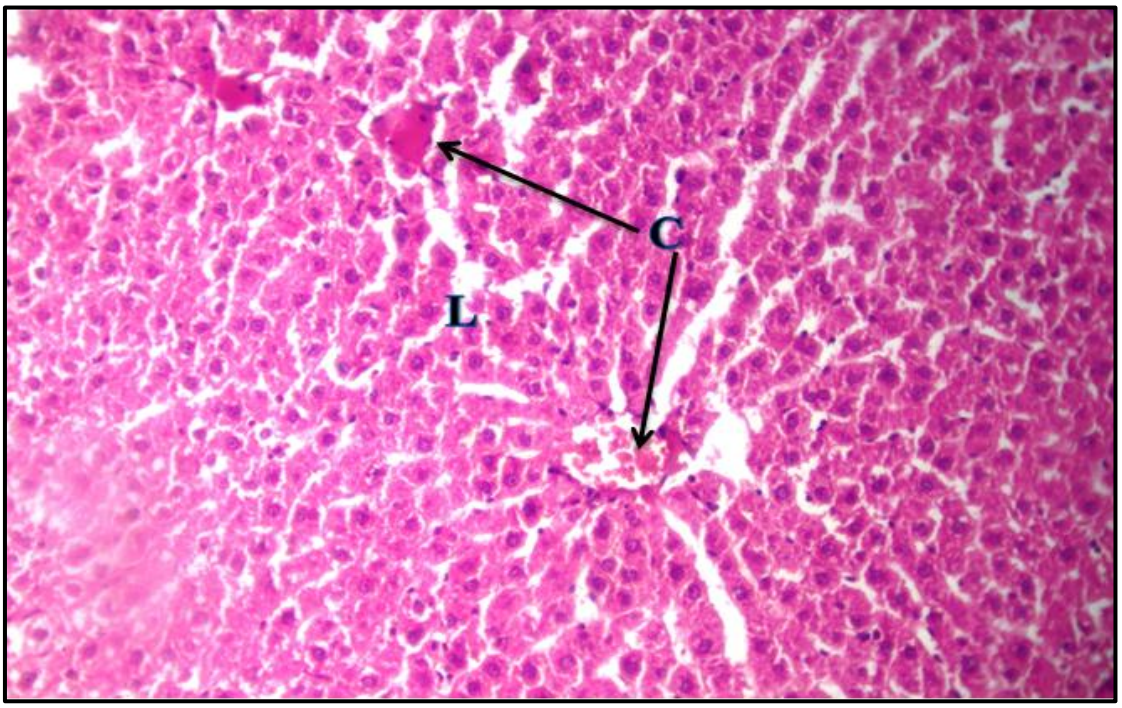
صورة رقم (4-9) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة يلاحظ فيها تراكيب الكبد الطبيعية الوريد المركزي CV الخلايا الكبدية H والجيبانيات S (H and E 200X).



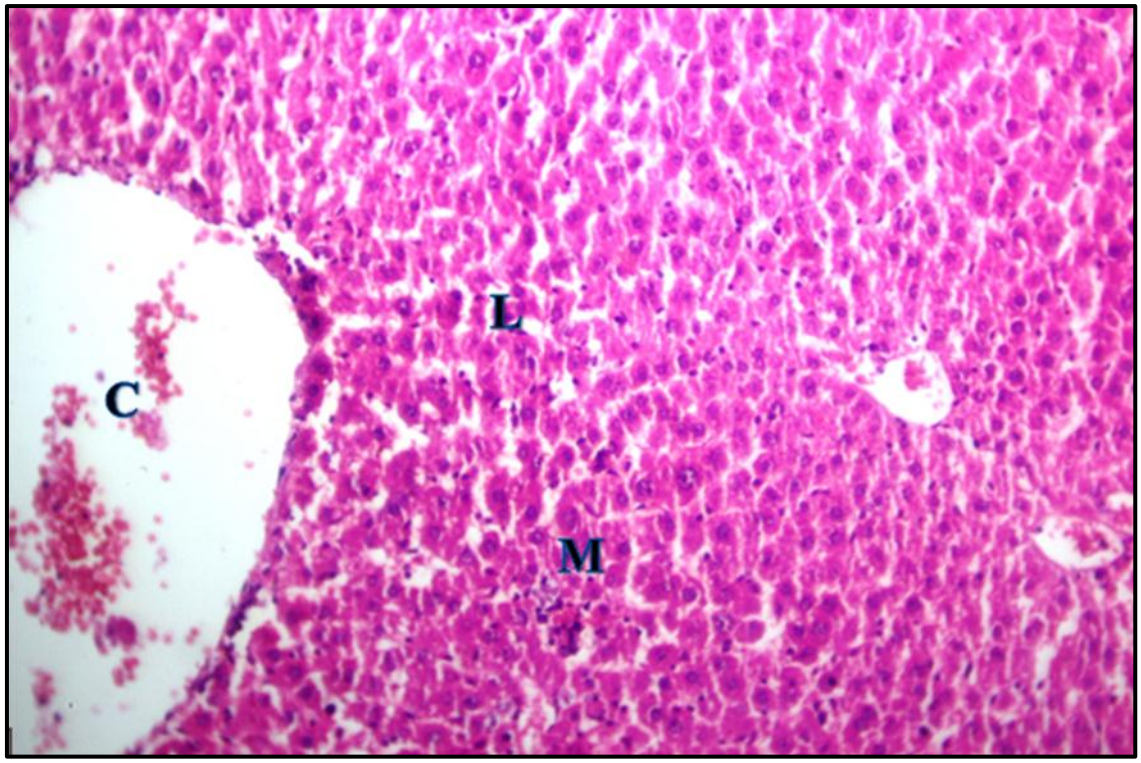
صورة رقم (4-10) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (15mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها احتقان الوريد الكبدي C تنخر الخلايا الكبدية وتغلض الانوية وتوسع الجيبانيات L وجود خلايا التهابية مزمنة حول الوريد M وعدم انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .



صورة رقم (4-11) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (30 mg/kg) من عقار Azithromycin ، يلاحظ فيها احتقان الوريد الكبدي C تنخر الخلايا الكبدية وتغلض الانوية وتوسع الجيبانيات وجود خلايا التهابية مزمنة حول الوريد M مع انحلال بعض الخلايا الكبدية Gوعدم انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .



صورة رقم (4-12) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم اعطاؤها فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) و(15mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها احتقان الوريد الكبدي C وتغلض الانوية وتوسع الجيبانيات L وبداية انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .



صورة رقم (4-13) مقطع نسجي مستعرض لكبد ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها اعطائها فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) و (30 mg/kg) من عقار Azithromycin ، يلاحظ فيها احتقان وتوسع الوريد الكبدي C وتوسع الجيبانيات وجود خلايا التهابية مزمنة قليلة في أمَّاكن متفرقة M و انتظام الحبال الكبدية (H and E 200X) .

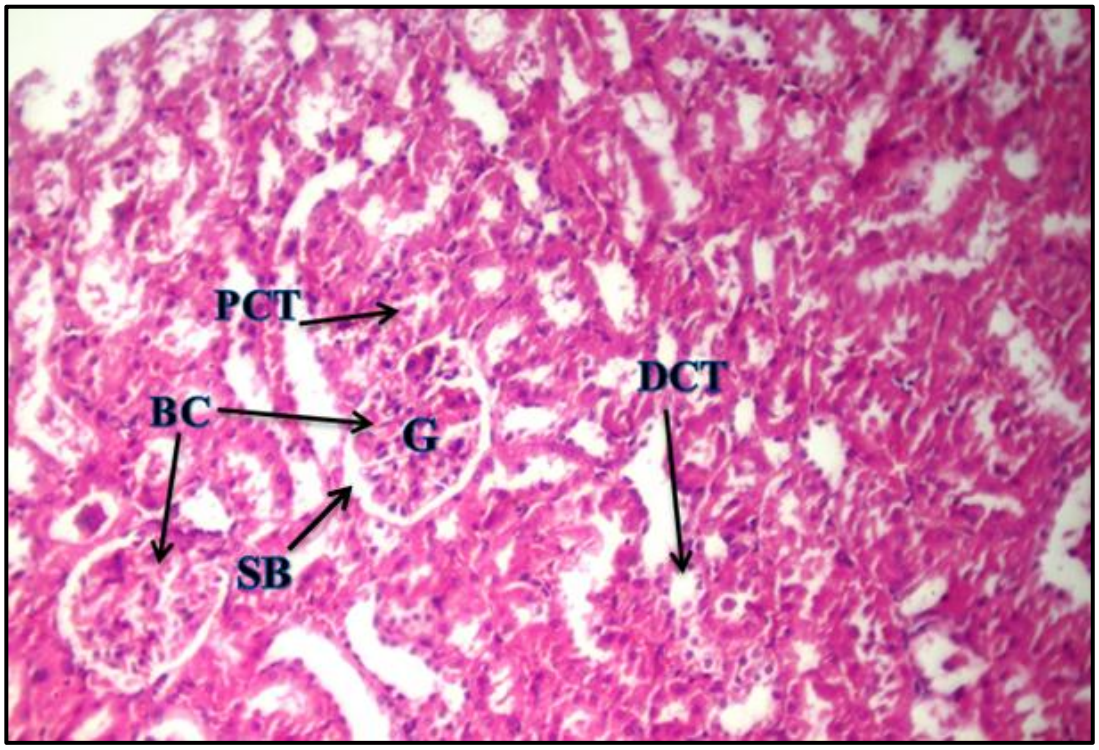
يلاحظ من الصورة (4-14) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة يلاحظ فيه انها مكونة فيها تراكيب الكلية الطبيعية الكبيبة Glomerulus ومحفظة بومان Bowman capsule والنبيب البولي الداني Proximal renal tubules والنبيب البولي القاصي Distal renal tubule وفسحة بومان Bowman space.

تبين الصورة (4-15) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (15mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها ضمور في حجم الكبيبة Glomerulus ومحفظة بومان Bowman capsule و تحطم جدران النبيب البولي الداني Proximal renal tubules والنبيب البولي القاصي Distal renal tubule وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان Bowman space مقارنة مع مجموعة السيطرة(4-14).

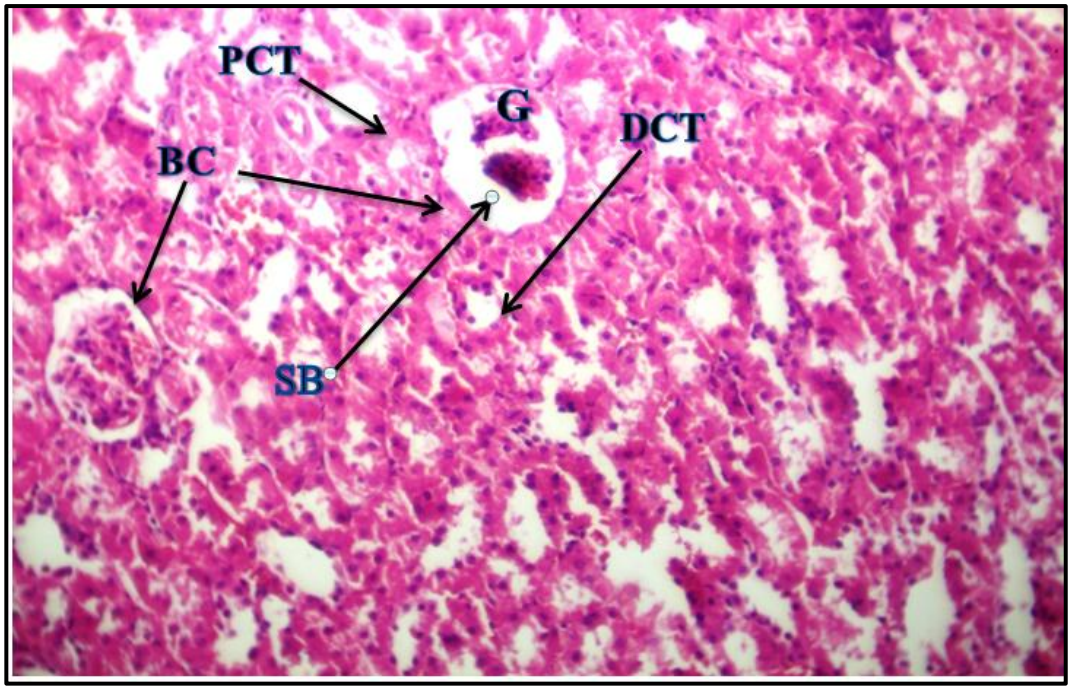
اظهرت الصورة (4-16) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (30 mg/kg) من عقار Azithromycin ، يلاحظ فيها ضمور في حجم الكبيبة Glomerulus ومحفظة بومان Bowman capsule و تحطم جدران النبيب البولي الداني Proximal renal tubules والنبيب البولي القاصي Distal renal tubule وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان Bowman space واحتقان الأوعية الدموية مقارنة مع مجموعة السيطرة (4-14).

تبين الصورة (4-17) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم اعطاؤها فيتامين (C) بمقدار (100 mg/kg) و (15 mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات Glomerulus ومحفظة بومان Bowman capsule وتحطم جدران النبيب البولي الداني Proximal renal tubules والنبيب البولي القاصي Distal renal tubule وزيادة في حجم فسحة بومان Bowman space واحتقان الاوعية الدموية مقارنة مع مجموعة(4-14) و(4-15).

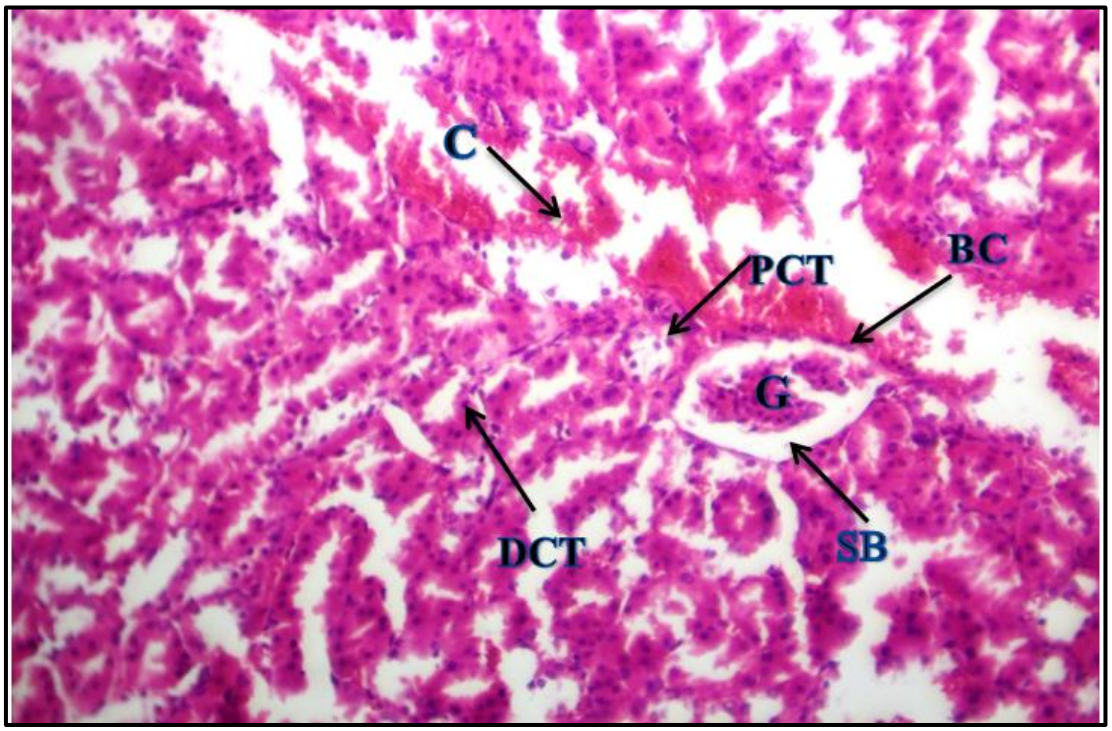
توضح الصورة (4-18) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها فيتامين (C) بمقدار (100 mg/kg) و (30 mg/kg) من عقار Azithromycin ، يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات Glomerulus ومحفظة بومان Bowman capsule وتحطم جدران النبيب البولي الداني Proximal renal tubules والنبيب البولي القاصي Distal renal tubule وزيادة في حجم فسحة بومان Bowman space وحصول ضرر في نسيج الكلية مقارنة مع مجموعة (4-14) و(4-16).



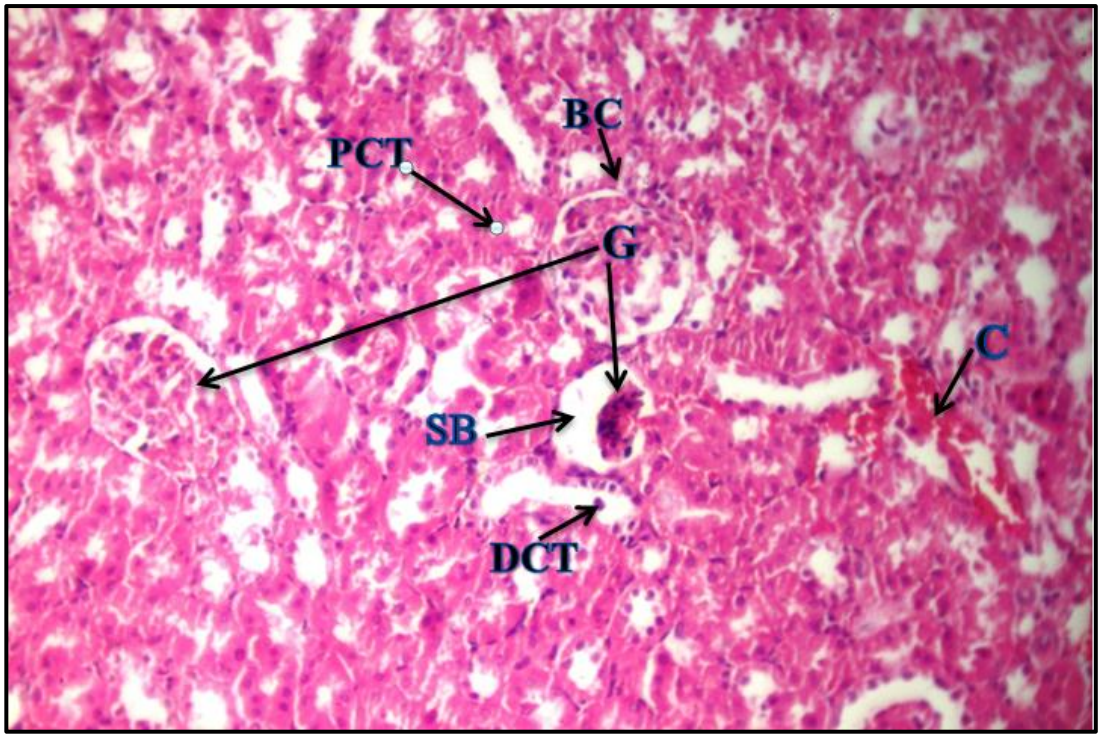
صورة رقم (4-14) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان لمجموعة السيطرة يلاحظ فيها تراكيب الكلية الطبيعية الكبيبة G ومحفظة بومان BC والنبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT وفسحة بومان SB (H and E 200X).



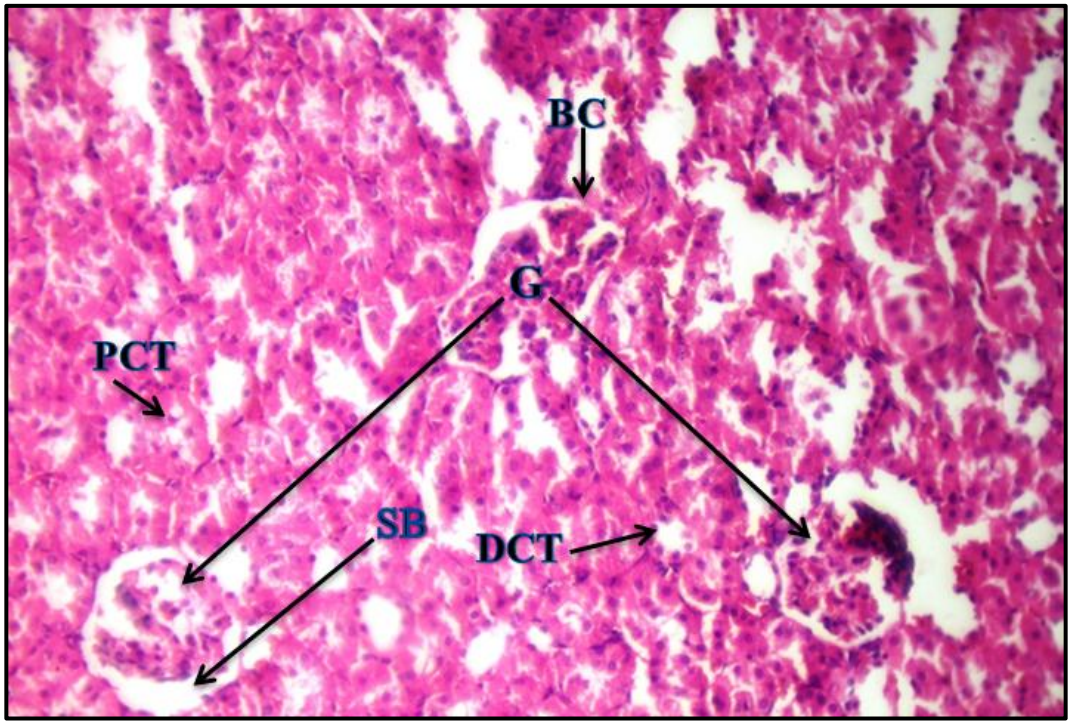
صورة رقم (4-15) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (15mg/kg) من عقار Azithromycin يلاحظ فيها ضمور في حجم الكبيبة G ومحفظة بومان BC و تحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان SB (H and E 200X).



صورة رقم (4-16) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (30 mg/kg) من عقار Azithromycin يلاحظ فيها ضمور في حجم الكبيبة G ومحفظة بومان BC و تحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان SB واحتقان الاوعية الدموية C (H and E 200X.



صورة رقم (4-17) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم اعطاؤها فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) و(15mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات G ومحفظة بومان BC وتحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT ووزيادة في حجم فسحة بومان SB واحتقان الاوعية الدموية C (H and E 200X).



صورة رقم (4-18) مقطع نسجي مستعرض لكلية ذكور الجرذان التي تم اعطاؤها فيتامين (C) بمقدار (100mg/kg) و(30mg/kg) من عقار Azithromycin، يلاحظ فيها ضمور في حجم بعض الكبيبات G ومحفظة بومان BC وتحطم جدران النبيب البولي الداني PCT والنبيب البولي القاصي DCT ووزيادة في حجم فسحة بومان SB وحصول ضرر في نسيج الكلية (H and E 200X).

الفصل الخامس

المناقشة

Discussion

5 . المناقشة Discussion

5 .1 . تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على نسبة تحطم DNA .

اشارت نتائج الدراسة الحالية وجود ارتفاع معنوي في نسبة تحطم عالي لـDNA في المجموعة الثالثة التي اعطيت عقار أزيثرومايسين بتركيز (30 mg/kg) مقارنة مع مجموعة السيطرة. واتفقت هذه النتائج مع دراسة Jiang *et al.*(2019) التي اوضح أن عقار أزيثروميسين تسبب في سمية الميتوكوندريا وإنتاج ROS reactive oxygen species وتحطم الحامض النووي في الخط الظهاري للثدي البشري والأرومة الليفية الأولية ، بتنظيم HIF1a والجينات المرتبطة بتحلل السكر وتسبب في تحلل الخلايا الهوائية، وقاومت ذلك من خلال الخلايا السليمة وأنظمة دفاعها مثل تنظيم جينات التكوُّن الحيوي للميتوكوندريا ومضادات الأكسدة لكن هذه الدفاع أبطأ بكثير من ضرر ROS في الممارسة السريرية ويمكن أن يؤدي تكوين الجذور الحرة المتزايد إلى تخفيف الدفاعات المضادة للأكسدة بواسطة أزيثروميسين الناتج عن تحطم الحمض النووي .

بينت نتائج مماثلة في الدراسة Singh *et al.* (2013) حيث استعمل عقار اريثرومايسين على صغار الجرذان المعالجة أثناء الحمل وكذلك مدة الرضاعة ،وبينت النتائج أنَّ عقار الإريثرومايسين تسبب في تحطم الحمض النووي في الجرذان في حياتهم بعد الولادة، حيث اوضح ان زيادة مستوى منتج بيروكسيد الدهون MDA ، هو العلامة الحيوية المميزة للإجهاد التأكسدي وتؤدي المستويات المتزايدة من MDA أيضًا إلى تحطم الحامض النووي عن طريق تكوين التقارب (adduct) مع التفاعل deoxyguanosine و deoxyadenosine) (Łuczaj and Skrzydlewska.,2003;Marnett 2000,.) . تسبب أيضًا إعطاء كلاريثروميسين في تحطم الحامض النووي مما يشير إلى وجود نخر، ويعزى السبب في ذلك إلى تحطم الحامض النووي بسبب زيادة ROS و RNS (مثل البيروكسي نيتريت) الذي يتفاعل مع الجزيئات الخلوية مثل الحامض النووي ويسبب الانقسام الكيميائي لـ DNA ، Pyknosis أو النوى المنكمشة ، هو تكثيف لا رجعة فيه للكروماتين في نواة الخلية نخر أو موت الخلايا المبرمج (Kandila *et al.*,2015). قد يكون السبب في زيادة تحطم DNA للأجهاد التأكسدي الناتج عن زيادة مستويات أنواع الأكسجين التفاعلية ROS .كشف اختبار المذنب comet assay عن انخفاض كبير في تحطم الحامض النووي في المجموعة المعالجة بفيتامين C حيث اشارت النتائج إلى عدم وجود فروقات معنوية للمجاميع الوقائية و مقارنتها بمجموعة السيطرة وتتفق هذه النتائج مع دراسات كل من Brennan *et al.* (2000) Lutsenko *et al.*(2002) Sram *et al.*(2012) و تشير الدراسات إلى أن فيتامين C له دور في منع تحطيم الحامض النووي وقد اوضح Du *et al.*(2012) ان فيتامين C

يحمي من أضرار أنواع الأكسجين التفاعلية التي تلحق بالبروتين والدهون والحمض النووي (DNA و RNA) والكربوهيدرات في الوسط المائي سواء داخل الخلايا أو خارجها وفي العديد من الأمراض التي يسببها أنواع الأكسجين التفاعليةROS، ويعزى السبب إلى أن التركيزات العالية داخل الخلايا من حمض الأسكوربيك تقلل الطفرات الذي يسببها الإجهاد التأكسدي وقد يكون لديها القدرة على تركيز فيتامين C بشكل فعال لتوفير الحماية الخلوية ضد الآثار الضارة المحتملة للجزيء الحيوي لإنتاجية الجذور الحرة.

2.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على حدوث التشوهات الكروموسومية.

اظهرت نتائج الدراسة الحالية حدوث ارتفاع معنوي في معدل التشوهات الكروموسومية في المجموعة العلاجية الثانية والثالثة مقارنة بمجموعة السيطرة وجاءت متفقة مع دراسة(Ashraf and Karima.,1998) حيث تسبب أزيثرومايسين في زيادة معنوية في مجموع الانحرافات الهيكلية والعددية للكروموسومات مقارنته بمجموعة السيطرة. وذكر دراسة Ibrahim and El-Sherbeny(,2006) أن كلاريثرومايسين يسبب انحرافات الكروموسومات في كل من خلايا نخاع العظام وخلايا الطحال في الفئران. حيث استعملت وبشكل واسع الانحرافات الكروموسومية كأداة خلوية في تحقق من الوضع الصحي لعدد كبير من البشر غالبًا ما يُعرف تحطم الحامض النووي بالسمية الجينية ، بسبب السمية أو التحطم الذي يصيب الجينوم المكون من الحامض النووي. تتجلى سمية العقار في احداث التشوهات الكروموسومية والتغيرات العددية في الكروموسومات (Rama *et al*.,2002). وفي دراسة اشارت أن الجرعات المختلفة من كلاريثرومايسين تسببت في زيادة نسبة انحرافات الكروموسومات في كل من خلايا نخاع العظم وخلايا الطحال بعد اعطائها فمويا للجرذان يمكن أن يُعزى هذا إلى الامتصاص السريع والكامل من التمثيل الغذائي المعدي المعوي الذي يكون قابلاً للتشبع (Ibrahim and El-Sherbeny,2006). كما خالفت نتائجنا دراسة (Amacher *et al*.,1993) الذي افاد بأن أزيثرومايسين لا يسبب طفرات جينية في الخلايا الميكروبية أو الثديية أو تشوهات الكروموسومية في الخلايا الليمفاوية البشرية المستزرعة أو في نخاع عظم الفأر في الجسم الحي.

في حين اظهرت المجاميع الوقائية عدم وجود فروقات معنوية للتشوهات الكروموسومية واتفقت هذه النتائج مع دراسة كل من (Dutta *et al*.,2018; Das Roy *et al*.,2013; Sram *et al*.,2012; Kahl *et al*.,2012) حيث اشاروا إلى أن فيتامين C قلل نسبة أضرار الحامض النووي التي تسببها العوامل السمية للعقار وقلل بشكل ملحوظ عدد الانحرافات والتشوهات الكروموسومات . في دراسة أجراها Abasova *et al*.(2013) انخفضت المستويات الإجمالية من الاضطرابات الوراثية الخلوية بنسبة 38 ٪ ، مما أكد دورة فيتامين C وتأثيرها المضاد للطفرات وهو أحد مضادات الأكسدة القوية التي تحمي الجسم من الاضرار التأكسدية الداخلية والخارجية ، فمن المحتمل أن يلعب دوره كعامل مساعد

للعديد من الإنزيمات المنظمة الحيوية والجينات دورًا رئيساً في تأثيرات تعديل المناعة. يحفز فيتامين Cهجرة خلايا neutrophil إلى موقع الإصابة ، ويعزز البلعمة وتوليد الأكسدة ، وقتل الميكروبات. في الوقت نفسه ، يحمي الانسجة من التلف المفرط عن طريق تعزيز موت الخلايا المبرمج للخلايا neutrophil والتخلص بواسطة خلايا البلعمية وتقليل نخر العدلات. بالتالي يحافظ على استجابة كافية ضد مسببات الأمراض ، مع تجنب الضرر المفرط للمضيف (Carr and Maggini.,2017).

3.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى الكلوتاثيون GSH والكاتاليز CAT .

في الدراسة الحالية اشارت النتائج إلى وجود انخفاض معنوي في مستوى الكاتاليز CAT و الكلوتاثيون GSH في المجموعة العلاجية الثانية والثالثة التي اعطيت عقار Azithromycin بتراكيز (15-30 mg/kg) على التوالي مقارنة مع مجموعة السيطرة .وتتفق هذه النتائج مع دراسة كل من (El-Shitany and El-Desoky (2016 و Elkomy *et al.*(2018) حيث اشاروا إلى أن عقار أزيثروميسين (Azithromycin) تسبب في انخفاض انزيميي GSH و CAT وأن السبب في ذلك قد يكون ناجماً عن اضطرابات الإجهاد التأكسدي من خلال عدم التوازن بين الجذور الحرة ومضادات الأكسدة في الجرذان و يؤدي الإجهاد التأكسدي المتزايد في أعضاء مثل الكبد والقلب والكلى إلى إحداث أضرار وظيفية وكيموحيوية وهيكلية، او قد يكون زيادة توليد أنواع الأكسجين التفاعلية ROS في القلب مما يؤدي بدوره إلى تثبيط هذه الإنزيمات(Bilginoğlu *et al.*,2014) . وقد تفسير أن الإجهاد التأكسدي حدث بشكل ثانوي مع تلف القلب الناجم عن أزيثرومايسين. كما أن أزيثرومايسين له استخدامات على نطاق واسع لعلاج أو منع بعض أنواع العدوى البكتيرية وغالبًا ما تسبب التهابات الأذن الوسطى والتهاب الحلق والالتهاب الرئوي والتيفوئيد والتهاب الجيوب الأنفية ومع ذلك تشير عدد متزايد من الأدلة إلى أن لديها خطر السمية الكبدية والسمية القلبية كتأثير ضار(Lockwood *et al.*,2010). تم إثبات أن الإجهاد التأكسدي بوساطة أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) يعتبر صلة مشتركة بين تلف الكبد المزمن والتليف الكبدي. يحتوي جسم الإنسان على مجموعة من آليات الدفاع المضادة للأكسدة (مضادات الأكسدة غير الأنزيمية والإنزيمية) لإزالة أنواع الأكسجين التفاعلية الضارة بمجرد تكوينها ولمنع آثارها الضارة(Di Sario *et al.*,2007). تشمل مضادات الأكسدة غير الأنزيمية فيتامينات E و C وجلوتاثيون مخفض (GSH) ، في حين تشمل مضادات الأكسدة الأنزيمية ديسموتاز الفائق (SOD) والكاتلاز (CAT) والجلوتاثيون بيروكسيديز (GSHPx). من المعروف أيضًا أن المضادات الحيوية لماكرولايد تعمل على تغيير توازن الأكسدة والاختزال الفسيولوجي مما يؤدي إلى الإجهاد التأكسدي وبيروكسيد الدهون(Müller *et al.*,2011).

الإجهاد التأكسدي هو آلية ممرضة شائعة تساهم في بدء وتطور تلف الخلايا(Medina and Moreno-Otero .,2005). يشير الإجهاد التأكسدي إلى حالة الخلية التي تتميز بالإنتاج المفرط لأنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) أو أنواع النيتروجين التفاعلية (RNS) أو انخفاض في الدفاعات المضادة للأكسدة المسؤولة عن عملية التمثيل الغذائي(El-Neweshy and El-Sayed.,2011; Aly et al.,2010). يشمل الضرر الناجم عن أنواع الأكسجين التفاعلية تغييرات في الجزيئات الكبيرة الخلوية مثل دهون الغشاء أو الحامض النووي أو البروتين، قد يغير الضرر وظيفة الخلية من خلال التغيرات في الكالسيوم داخل الخلايا أو درجة الحموضة داخل الخلايا ، ويمكن أن يؤدي في النهاية إلى موت الخلايا (Oboh and Ogunruku *et al.*,2010; Ryan *et al.*,2010).

أمَّا مجاميع الوقائية اظهرت نتائج الدراسة لمستوى الكلوتاثيون GSH و الكاتاليز CAT في مصل الدم لذكور الجرذان البيض عدم وجود فروقات معنوية ($P<.0.05$) في المجاميع الرابعة والخامسة مقارنة مع مجموعة السيطرة. وتفقت هذه النتائج مع دراسة (El-Shitany and El-Desoky.,2016) حيث بين ان المعالجة المسبقة للفئران بالأزيثرومايسين بفيتامين C إلى حماية الفئران من معظم التغيرات الفسيولوجية والوظيفية. قد تُعزى إلى تأثيرات مضادات الأكسدة ومضادات الالتهاب وبالتالي حفاظاً على سلامة ونفاذية الأغشية الخلوية بالإضافة إلى ان حمض الأسكوربيك يمثل الخط الأول للدفاع عن مضادات الأكسدة. تتجسد الآلية التي يقلل بها فيتامين C من السمية الكبدية التي تسببها العوامل السامة في حقيقة أن فيتامين C قد يخفف الضرر التأكسدي عن طريق تقليل بيروكسيد الدهون وتغيير نظام الدفاع المضاد للأكسدة أو عن طريق الإشارة إلى الإلكترونات بالجذور الحرة وإنهاء تفاعلها (Wilson ,2013; Bendich,1990) بالإضافة إلى ذلك ، فإنه يمنع استنفاد الكلوتاثيون الكبدي في السمية الكبدية الناتجة عن المواد الكيميائية في الفئران ، حيث يعمل الكلوتاثيون كمنظفات الجذور الحرة داخل الخلايا والخلايا المحمية ضد الأكسدة الدهنية الجذرية (Koekkoek and van Zanten.,2016; Cuddihy *et al.*,2008).

4.5. تأثير عقار الأزيثروميسين وفيتامين (C) على الشوارد.

أظهرت نتائج هذه الدراسة وجود انخفاض معنوي ($P<.0.05$).في معدل الصوديوم في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة. واتفقت هذه مع نتائج (Abdullah *et al.*2020) و Cadle *et al.*(1997) أن معظم الأدوية يمكن أن تسبب نقص الصوديوم في الدم عن طريق زيادة مستويات الهرمون المضاد للادرار البول بشكل غير مناسب ، إلا أن المضادات الحيوية من ناحية القاعدة لا تزال غير محددة جيدًا على وجه الخصوص أزيثروميسين أقل مقارنة ببعض المضادات الحيوية الأخرى من حيث إمكانية إحداث نقص صوديوم في الدم كون حدوث انخفاض في حالات قليلة

جدا. قد يكون سبب النقص في الصوديوم ناتج عن طريق منع إعادة امتصاص الصوديوم في النبيبات البعيدة مما تسبب في فقد الصوديوم أكثر نسبيًا من الماء ، أو قد تسبب ازثرومايسين في التهاب الكلى الذي يؤثر على النسيج الخلالي المحيط بالكلى وبالتالي تسبب في نقص الصوديوم (Van der Zalm *et al*.,2020; Cortés and Muñoz ,2018) .

كما بينت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعاً في مستوى البوتاسيوم ويعزى هذا السبب إلى الآثار الجانبية للعقار منها حدوث سمية قلبية للأزيثرومايسين عند مقارنتها بمشتقات الماكروليد الأخرى (Svanström *et al*.,2013;Ray *et al*.,2012)، كما تعد مستويات البوتاسيوم الطبيعية في الدم ضرورية للحفاظ على النظم الكهربائي للقلب. يمكن أن يؤدي ارتفاع مستويات البوتاسيوم في الدم إلى عدم انتظام ضربات القلب. تأثير آخر مهم لفرط بوتاسيوم الدم هو التدخل في عمل عضلات الهيكل العظمي(Enwa *et a*l.,2021) قد يكون ازثرومايسين اثر على عدة عوامل منها عدم قدرة الكلى على إفراز البوتاسيوم او ضعف الآليات التي تنقل البوتاسيوم من الدورة الدموية إلى الخلايا أو مزيج من هذه العوامل، عادة ما تحدث النوبات الحادة من فرط بوتاسيوم الدم عن طريق تأثير الادوية على توازن البوتاسيوم ؛ يمكن أن يكون المرض أو الجفاف أيضًا من العوامل المحفزة (Joyce *et al*.,2006).

اما مجاميع الوقاية الرابعة والخامسة عدم وجود فروقات معنوية في معدل مستوى الصوديوم التي اعطيت فيتامين C واتفقت مع نتائج (2006),.Eteng *et al* و (2020),.Anthony and Iorhemba إذ اشاروا إلى فيتامين C لا يؤثر سلبيا على مستويات الصوديوم ويعزى هذا السبب إلى الدور الوقائي لفيتامين سي من خلال قدرته على منح الالكترون وكذلك العمل كمضاد اكسدة وكاسح للجذور الحرة . كما اشارت النتائج إلى ارتفاع معنوي في مستوى البوتاسيوم واتفقت مع نتائج (Meng *et al*.,2005) حيث اشارت إلى أن حمض الأسكوربيك يتسبب في زيادة كاذبة في نتائج البوتاسيوم او طفيفة وهذه الزيادة لا تؤثر سلبا على الجسد.

5.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى انزيمات الكبد AST and ALP and ALT.

بينت النتائج الدراسة الحالية وجود ارتفاع معنوي في انزيمات الكبد (ASTو ALT و ALP) في المجاميع العلاجية الثانية والثالثة ولكن المجموعة الثانية ارتفاع فقط انزيم AST وتتوافق هذه النتائج مع دراسة (Helal et al.,2021; Paulose et al.,2016; Olayinka and Ore et al.,2014) حيث اشاروا ان عقار أزيثرومايسين عمل على ارتفاع انزيمات الكبد لـ ALT و AST و ALP يعزى السبب في ذلك ان العقار مؤشر بدرجة كبيرة على السمية الكبدية و التأثيرات السامة للكبد تتطور من خلال توليد الجذور الحرة و ROSs . ثبت أن التقييم المتكامل للبيانات من مستويات البلازما لـ ALT و AST و

ALP مهم في تحديد الإصابة الكبدية الصفراوية (Boone *et al*.,2005). ثبت أن الأدوية السامة للكبد تسبب ضررًا لأغشية خلايا الكبد مما يجعل الإنزيمات مثل AST و ALT و ALP تتسرب إلى المصل وتظهر زيادة فيها (Kumar *et al*.,2004) من المعروف جيداً أن الماكروليدات تحفز تسمم الكبد ، ومؤخراً ، ربطت التقارير المتفرقة أزيثرومايسين بالسمية الكبدية ، خاصة في المرضى الذين يعانون من أمراض الكبد الموجودة مسبقًا(Koffas *et al*.,2017). وكذلك اشارت نتائج لحالات مرضية منها ركود صفراوي داخل الكبد و سمية كبدية وفشل الكبد الحاد ناجمه عن عقار أزيثرومايسين حيث تسبب بارتفاع انزيمات الكبد الـ ALT و AST و ALP (Park *et al*.,2020; Han *et al*.,2017; Das,2011).

يبدو أن التأثيرات السامة للكبد للأزيثرومايسين تتطور من خلال إنتاج ROS كما يتضح من انخفاض مستويات مضادات الأكسدة في الدراسة الحالية ، لاحظنا انخفاضًا كبيرًا في أنشطة CAT و GSH في كبد الحيوانات المعالجة بالأزيثرومايسين. يتطابق النشاط المنخفض بشكل ملحوظ لأنزيم ROS الكاسح ، GSH و CAT ، عن طريق التعرض لأزيثرومايسين ، قد يكون هذا بسبب الآثار الضارة للجذور الحرة التي قد تنتج عن عمل العقار (Yazar *et al*.,2002).

اما المجاميع الوقائية لم يكون هنالك اي فروقات معنوية في انزيمات الكبد حيث تتفق هذه النتائج مع كل من الدراسات (AL-Janabi *et al*.,2020; Abdulkhaleq *et al*.,2018; Eze *et al*.,2012) التي اوضحت ان فيتامين C عمل على استعادت الانزيمات الكبد الـ ALT و AST و ALP إلى مستوى الطبيعي او القريب من الطبيعي ويعزى إلى الدور الوقائي للفيتامين C ، من خلال الخصائص المضادة للأكسدة وهو أحد مضادات الأكسدة المهمة القابلة للذوبان في الماء في السوائل البيولوجية هو منظف فعال لجذور الحرة وأنواع الأكسجين التفاعلية وذلك لخصائصه الكيميائية (Premkumar and Bowlus,2004). يعد هذا الفيتامين من أهم مضادات الأكسدة في السوائل خارج الخلية وقد ثبت أن وظيفته المضادة للأكسدة تتلخص بشكل فعال من الأكسيد الفائق وبيروكسيد الهيدروجين والهيدروكسيل والبيروكسيل وجذور الأكسجين المفردة ويعمل كمانح للإلكترون (Sedhrouchni *et al*.,2002). يمكن لفيتامين C أن يزيل الجذور الحرة بكفاءة قبل أن يتمكنوا من بدء أكسدة الدهون ، ويساهم في استقرار الأغشية الخلوية والقاعدية (El-Shitany and El-Desoky.,2016).

6.5.تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على مستوى اليوريا Urea و مستوى الكرياتينين Creatinine

اشارت الدراسة الحالية إلى وجود ارتفاع معنوي في كل من اليوريا والكرياتينين في مجاميع العلاجية الثانية والثالثة مقارنة مع مجموعة السيطرة . واتفقت مع نتائج Ebenezer and Ayokanmi.,(2014) و Sayed *et al*.,(2018) Mobasher Ahmad *et al*.,(2018). قد تسبب

العقار في ارتفاع اليوريا والكرياتينين في الدم حيث يعد كل منهما مؤشران رئيسيان لوظيفة الكلى. اليوريا والكرياتينين عبارة عن نواتج استقلابية يتم ترشيحها بواسطة الكبيبات في الكلى، يعزى هذا الارتفاع إلى الاجهاد التأكسدي ، يمكن للجذور الحرة أن تتفاعل مع الأكسجين لإنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (Reactive oxygen species)، كما يحفز ROS بيروكسيد الدهون للخلايا الظهارية الكبيبية ويدمر بنية ووظيفة غشاء الترشيح ، مما يؤدي إلى بروتينية ومتلازمة كلوية لاحقة (Lee and Harris,2011). كما ابلغت عديد من الحالات التهاب الحاد الناجم عن العقار. (Woodruff *et al.*,2015; Persico *et al.*,2011) .

اما مجاميع الوقاية اشارت النتائج الدراسة إلى عدم وجود فروقات معنوية في مستوى اليوريا والكرياتينين يعزى ذلك إلى الدور الوقائي لفيتامين C ضد الاجهاد التأكسدي حيث يتخلص فيتامين C بشكل مباشر وسريع من الجذور الحرة أو يمنع تكوينها بصرف النظر عن الدفاعات المضادة للأكسدة الداخلية او بشكل غير مباشر ، عن طريق تجديد أنظمة مضادات الأكسدة الأخرى، فإن فيتامين C يحمي الحمض النووي للخلايا من التلف الذي تسببه الجذور الحرة، كما انه يثبط العديد من آثار السموم ، بما في ذلك مبيدات الآفات والمعادن الثقيلة (Daud *et al.*,2016 ;El-Gendy *et al.*,2010). حيث اشارت نتائج (Lee, *J et al.*,2006) إلى أن فيتامين C قد أثر على الأنسجة الكلوية التي تضررت بسبب نقص التروية الدموية. إذ اوضح ان حمض الأسكوربيك يحمي الأنسجة الكلوية من الإصابة عن طريق ضخه وبالتالي يساعد في استعادة وظائف الكلى.

7.5. تأثير عقار أزيثرومايسين وفيتامين (C) على نسيج الكبد والكلية .

بينت نتائج الدراسة إن ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (15 mg/kg) و(30 mg/kg) من عقار Azithromycin، أدى إلى حصول تغيرات في الكبد مقارنة مع مجموعة السيطرة وهي متفقة مع دراسة كل من(2015).Moy *et al* و (2017).Koffas *et al* و(2020).Usadadia *et al* حيث ذكرت حصول العديد من التغيرات التي يسببها إعطاء الازثرومايسين مثل حصول احتقان ونزف حاد في الجيبانيات وتمزق في الحبال الكبدية وحصول ارتشاح الخلايا الالتهابية وتنكس فجوي وتغيرات بالنسيج الدهني.

وأظهرت نتائج الدراسة إن ذكور الجرذان التي تم إعطاؤها (15mg/kg) و(30mg/kg) من عقار Azithromycin ، أدى إلى حصول تغيرات في الكلية مقارنة مع مجموعة السيطرة وهي متفقة مع دراسة كل من (2011).Persico *et al* و (2011).Woodruff *et al* حيث ذكرت حصول العديد من التغيرات التي يسببها إعطاء الازثرومايسين مثل حصول ضمور في حجم الكبيبة وتحطم جدران النبيب البولي الداني والنبيب البولي القاصي وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان .

ولان الازثرومايسين يوصف لعلاج العديد من حالات المعدية ويتوزع على نطاق واسع في سوائل وانسجة الجسم ليثبط البكتريا على الرغم من التأثيرات التي يسببها على الكبد والكلية والقلب، ومن التأثيرات السامة للازثرومايسين على الكبد بسبب تولد الجذور الحرة شديدة التفاعل Highly reactive free radicals وبسبب التهديد التاكسدي الناجم عن الدواء الذي عطل الأداء الخلوي للكبد والكلية ، حيث ذكرت بعض المصادر ان في حالة حدوث أي خلل في غشاء الخلية كالتمزق او زيادة النفاذية في غشاء الخلية مما يجعل الإنزيمات مثل AST و ALT و ALP تتسرب إلى المصل وتظهر زيادة في نشاطها يؤدي إلى زيادة انتشار انزيمات الكبد في مجرى الدم .(Olayinka and Ore, 2014) من المعروف أن الأسباب الكبدية لزيادة أنشطة ALT و AST في المصل تشمل نخر الخلايا الكبدية (Meyer and Harvey,2004). ان إعطاء ألازيثرومايسين بجرع عالية يحفز الفشل الكلوي والكبدي في الجرذان ، وكان هذا واضحًا من اختبار وظائف الكلى والكبد حيث زادت التراكيز للكرياتينين واليوريا والبيليروبين في البلازما بشكل ملحوظ في المجموعات المعالجة ، مما يشير إلى ضعف وظائف الكلى والكبد، اليوريا والكرياتينين عبارة عن نفايات أيضية يتم ترشيحها بواسطة الكبيبات في الكلى وتستخدم تراكيز المصل / البلازما بشكل شائع للكشف عن أمراض الكلى أو القلب والأوعية الدموية) (Traynor *et al*.,2006)ارتفاع مستويات البلازما من الكرياتينين واليوريا هو مؤشر على ضعف وظيفة الكلى (Mouton and Holder ,2006).

وقد اتفقت هذه الدراسة مع دراسة كل من Avci *et al*. (2008) و Khalil (2012) حيث بينت انه عند إعطاء بينها فيتامين C بشكل وقائي فان له دور في إعادة هيكلية النسيج الكبدي ليصبح اقرب لمجموعة السيطرة من مجموعة المعاملة بالازثرومايسين حيث قل ارتشاح الخلايا الالتهابية والتنكس الفراغي كان خفيفا وانخفاض التنخر والموت المبرمج للخلايا .

أظهرت الدراسات البشرية والحيوانية ان بعض الادوية والعوامل الكيميائية التي يتم التعرض لها يكون لها تاثيرات سمية محتملة للكبد والكلية ،من خلال توليد أنواع من الاوكسجين التفاعلية ROS ، وللتخلص من هذه التاثيرت عن طريق استعمال مضادات الاكسدة ومن بينها فيتامين C وهو مضاد اكسدة قابل للذوبان في الماء ، أظهرت الأبحاث ان فيتامين C يثبط السمية الكبدية الناتجة عن الادوية والمعادن الثقيلة ومبيدات الحشرات العضوية وبعض العوامل الكيميائية ،فهو عامل مهم للتخلص من الجذور الحرة في السوائل خارج الخلية وحماية الاغشية الحيوية (Adikwu and Deo, 2013).او قد تكون جمع التغيرات التي حدثت للحيوانات من ظهور الافات التنكسية والتغيرات النسجية والنزف والاحتقان كان بسبب تعرض الحيوانات للتجريع اليومي ولمدة 14 يوماً.

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

الاستنتاجات Conclusions

1- سبَّب العقار حدوث تأثيرات وراثية متمثلة بالتشوهات الكروموسومية وتحلل الـDNA وذلك بحسب الجرعةِ المعطات .

2- سبَّب العقار تأثير على المعاير الكيموحيوية إذ أدى إلى انخفاض (GSH) و(CAT) وكذلك أدى إلى انخفاض أيون الصوديم (Na) وارتفاع ايون البوتاسيوم (K) وبالمقابل أدى ايضاً الى ارتفاع كل من انزيمات الكبد و الكرياتين واليوريا .

3- أثَّر العقار على نسيج الكبد متمثلاً بإحتقان الوريد المركزي و تنخر الخلايا الكبدية و تغلض الانوية وتوسع الجيبانيات ووجود خلايا التهابية كما سبَّب تأثيراً على نسيج الكلى إذ أدى إلى ضمور في حجم الكبيبة ومحفظة بومان وتحطم جدران النبيب البولي الداني والنبيب البولي القاصي وزيادة كبيرة في حجم فسحة بومان واحتقان الاوعية الدموية.

4- ساهم فيتامين C في التقليل من اضرار الحامض النووي DNA وكذلك التشوهات الكروموسومية.

5- كان لاستعمال فيتامين C دوراً في تقليل الاضرار الناجمة عن تأثير العقار على مستوى المعاير الكيموحيوية والنسجية

6- تعد جرعة (30 mg/kg) من العقار اكثر تأثيراً على التغيرات الوراثية والكيموحيوية والنسجية.

التوصيات Recommendations

اوصي بما يلي:-

1- الحذر من تناول جرعات كبيرة من عقار الازثرومايسين .

2- تناول الفيتامينات وخصوصا فيتامين C خصوصاً عند تناول المضادات من عائلة المايكروليدات.

3- دراسة تأثير العقار على نسيج الطحال والغضاريف.

4- دراسة وراثية حول تأثير العقار على بعض الجينات مضادات الاكسدة وجينات اخرى.

5- استخدام تقنيات اخرى لتحديد التلف ،الطفرات ، والتغيرات الوراثية .

6- استخدام sequencing لتحديد في اذا كان هنالك تغيرات على مستوى التسلسلات للقواعد .

المصـــــادر

References

المصادر العربية

الساهوكي ، مدحت وكريمة محمد وهيب . 1990 . تطبيقات في التصميم وتحليل التجارب. دار الحكمة للطباعة والنشر . جامعة الموصل. العراق .

المصادر الاجنبية

Abasova, O. Y., Reutova, N. V., Sycheva, L. P., and Chernysheva, E. A. (2013). Studies of Antimutagenic Effects of Vitamins A and C in Humans. Bulletin of Experimental Biology and Medicine, 154(5), 649–653.

Abdulkhaleq, F. M., Alhussainy, T. M., Badr, M. M., Khalil, A. A. A., Gammoh, O., Ghanim, B. Y., and Qinna, N. A. (2018). Antioxidative stress effects of vitamins C, E, and B12, and their combination can protect the liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Drug design, development and therapy*, *12*, 3525.

Abdullah, E., Ahmed, A. K. L., and Nezar, B. (2020). Azithromycin induced hyponatremia in elderly patients: a case report and review of the literature. *Urol Nephrol Open Access J*, *8*(5), 136-137.

Abu-Gharbieh, E., Vasina, V., Poluzzi, E., and De Ponti, F. (2004). Antibacterial macrolides: a drug class with a complex pharmacological profile. *Pharmacological research*, *50*(3), 211-222.

Adikwu, E. and Deo, O. (2013).Hepatoprotective Effect of Vitamin C (Ascorbic Acid) .Pharmacology and Pharmacy . 4 (1).

Ahmad, R. M., AL-Hubaity, A. Y., & Alazow, N. S. (2019). The Role of Vitamin C on the Structural Changes of Male Albino Rats Kidney Induced by Tramadol. *Annals of the College of Medicine*, Mosul, 41(1), 57-62.

Akhyani, M., Ehsani, A. H., Ghiasi, M., & Jafari, A. K. (2008). Comparison of efficacy of azithromycin vs. doxycycline in the treatment of rosacea: a randomized open clinical trial. *International journal of dermatology*, *47*(3), 284-288.

Al-harchan, N. A. (2009). Therapeutic study of rosacea by Azithromycin and Metronidazole. *Journal of the Faculty of Medicine Baghdad*, *51*(4), 429-432.

AL-Janabi, A. I. H., Khadairi, M. M., Al-amari, M. J., and Hirallah, A. A. K. (2020). CURATIVE ROLE OF VITAMIN (C) IN REDUCTION OF CADMIUM TOXICITY ON THE LEVELS OF SOME LIVER FUNCTIONS, LIPID PEROXIDATION AND ANTIOXIDANTS ENZYMES IN IN VIVO CONDITION. *Plant Archives*, *20*(2), 936-940.

Aly, N., Kawther, E. G., Mahmoud, F., and El-Sebae, A. K. (2010). Protective effect of vitamin C against chlorpyrifos oxidative stress in male mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *97*(1), 7-12.

Amacher, D. E., Ellis Jr, J. H., Joyce, A. J., Muehlbauer, P. A., Turner, G. N., Wahrenburg, M. G., ... & Ray, V. A. (1993). Preclinical toxicology studies with azithromycin: genetic toxicology evaluation. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *300*(2), 79-90.

Amal H. Hamza.(2017). Vitamin C, BoD – Books on Demand, PP 25 , DOI:10.1002/9783527681754.

Amin, F., Khan, S., Shah, S. M. H., Rahim, H., Hussain, Z., Sohail, M., ... and Shahat, A. A. (2018). A new strategy for taste masking of azithromycin antibiotic: development, characterization, and evaluation of azithromycin titanium nanohybrid for masking of bitter taste using physisorption and panel testing studies. *Drug design, development and therapy*, *12*, 3855.

Anthony, G. I., & Iorhemba, P. A. (2020). The effect of combined treatment of vitamin C and loperamide on intestinal sodium and potassium ion ATPase, alkaline phosphatase and lipid peroxidation on castor oil induced diarrheal rats. *bioRxiv*. .11.13.380469.

Araujo, L. and Demoly, P. (2008) Macrolides allergy. Current Pharmacological Decisions 14, 2840-2862.

Arsic, B., Barber, J., Čikoš, A., Mladenovic, M., Stankovic, N., and Novak, P. (2018). 16-membered macrolide antibiotics: a review. *International journal of antimicrobial agents*, *51*(3), 283-298.

Artiss, J.D., Mc Enroe, R.J., Zak, B.; Clin.Chem, 30 (1984)1389

Ashraf M, S., and Karima F, M. (1998). Effect of azithromycin" Zithromax [R]" on the chromosomal pattern of bone marrow and liver cells in albino rats.

Atli, O., Ilgin, S., Altuntas, H., and Burukoglu, D. (2015). Evaluation of azithromycin induced cardiotoxicity in rats. *International journal of clinical and experimental medicine*, *8*(3), 3681.

Avci, A.; Çetin, R.; Ergüder, I. B.; Devrim, E .; Kiliçoglu, B .; Çandir, Ö.; Öztürk, H.S and Durak, L. (2008). Cisplatin causes Oxidation in Rat Liver Tissues:Possible Protective Effects of Antioxidant Food Supplementation. Turk. J. Med. Sci., 38(2): 117-120.

Bakheit, A. H., Al-Hadiya, B. M., and Abd-Elgalil, A. A. (2014). Azithromycin. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, *39*, 1-40.

Bednarz, B., Chamiec, T., and Ceremuzyński, L. (2003). Antioxidant vitamins decrease exercise-induced QT dispersion after myocardial infarction. *Kardiologia polska*, *58*(5), 375-379.

Bendich A (1990): Micro-nutrients and ImmuneFunctions. Bendich, A., Chandra, R.K. (Eds.). Academy Sciences، New York. pp. 175.

Bertram, S., Glowacka, I., Müller, M. A., Lavender, H., Gnirss, K., Nehlmeier, I., ... & Pöhlmann, S. (2011). Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease. *Journal of virology*, 85(24), 13363-13372.

Bilginoğlu, A., Aydın, D., Özsoy, Ş., and Aygün, H. (2014). Protective effect of melatonin on adriamycin-induced cardiotoxicity in rats. Turk Kardiyol Dern Ars, 42(3), 265-273.

Boone, L., Meyer, D., Cusick, P., Ennulat, D., Bolliger, A. P., Everds, N., ... and Regulatory Affairs Committee of the American Society for Veterinary Clinical Pathology. (2005). Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies. *Veterinary Clinical Pathology*, *34*(3), 182-188.

Brennan, L. A., Morris, G. M., Wasson, G. R., Hannigan, B. M., and Barnett, Y. A. (2000). The effect of vitamin C or vitamin E supplementation on basal and H 2 O 2-induced DNA damage in human lymphocytes. *British Journal of Nutrition*, *84*(2), 195-202.

Bright, G. M., and Hauske, J. R. (1984). *U.S. Patent No. 4,465,674*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Butt, M. U., Jabri, A., and Elayi, S. C. (2019). Azithromycin-induced thrombocytopenia: a rare etiology of drug-induced immune thrombocytopenia. *Case reports in medicine*, *2019*.

Cadle, R. M., Darouiche, R. O., and Ashton, C. M. (1997). Symptomatic syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion associated with azithromycin. *Annals of Pharmacotherapy*, *31*(11), 1308-1310.

Carr, A. C., and Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, *9*(11), 1211.

Catani, M. V., Savini, I., Rossi, A., Melino, G., and Avigliano, L. (2005). Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutrition reviews*, *63*(3), 81–90.

Cheung, O., & Sanyal, A. J. (2010). Recent advances in nonalcoholic fatty liver disease. *Current opinion in gastroenterology*, *26*(3), 202-208.

Clin. Chem, Acta. 70, 19-42 (1976*)*

Cocco, G., and Jerie, P. (2015). Torsades de pointes induced by the concomitant use of ivabradine and azithromycin: an unexpected dangerous interaction. *Cardiovascular toxicology*, *15*(1), 104-106.

Cortés, M. M., and Muñoz, P. G. (2018). Hyponatremia and Psychotropic Drugs. In Fluid and Electrolyte Disorders. IntechOpen.pp34.

Cuddihy SL, Parker A and Winterbourn C .(2008). Ascorbate interacts with reduced glutathione to scavenge phenoxyl radicals in HL60 cells. Free Rad. Biol. Med., 44: 1637– 1644.

D. Hasan J, Ahmad J.(2019). Azithromycin-Induced Acute Kidney Injury in an Elderly Patient. Clin Case Rep Int.; 3: 1095.

Das Roy, L., Giri, S., Singh, S., and Giri, A. (2013). Effects of radiation and vitamin C treatment on metronidazole genotoxicity in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 753(2), 65–71*.

Das, B. K. (2011). Azithromycin induced hepatocellular toxicity and hepatic encephalopathy in asymptomatic dilated cardiomyopathy. *Indian journal of pharmacology*, *43*(6), 736.

Daud, Z. A. M., Ismail, A., and Sarmadi, B. (2016). Ascorbic Acid: Physiology and Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health, 266–274.*

De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Vande, P. A., and Kirsch-Volders, M. (2000). Mutat. Res. 469, 181–197.

DePhillipo, N. N., Aman, Z. S., Kennedy, M. I., Begley, J. P., Moatshe, G., and LaPrade, R. F. (2018). Efficacy of vitamin C supplementation on collagen synthesis and oxidative stress after musculoskeletal injuries: a systematic review. *Orthopaedic journal of sports medicine*, *6*(10), 2325967118804544.

Dhaher, A., S., and R Luaibi, M. (2016). Efficacy and Safety of Combined Isotretinoin and Azithromycin for Treatment of Severe Nodulocystic Acne. *The Medical Journal of Basrah University*, *34*(2), 68-76.

Di Sario, A., Candelaresi, C., Omenetti, A., & Benedetti, A. (2007). Vitamin E in chronic liver diseases and liver fibrosis. *Vitamins & Hormones*, *76*, 551-573.

Doll . S and Ricou . B.(2013). Severe vitamin C deficiency in a critically ill adult: a case report. *European Journal of Clinical Nutrition*, 67:881-882.

Drouin, G., Godin, J. R., and Pagé, B. (2011). The genetics of vitamin C loss in vertebrates. *Current genomics*, *12*(5), 371-378.

Du, J., Cullen, J. J., and Buettner, G. R. (2012). Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, *1826*(2), 443-457.

Dutta, J. (2018). Modulatory Effects of Vitamin C on Enrofloxacin Induced Chromosome Damage and AgNOR Counts in Chick Bone Marrow Nuclei. Toxicology International, 25(3), 1-6.

Ebenezer, T. O., and Ayokanmi, O,.(2014). Influence of Azithromycin Treatment on Hepatic Lipid Peroxidation and Antioxidant Defence Systems of Rats. *British Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2), 240-256.

Ebisch, Pierik FH, Jong FH. Thomas CMG, Steeger-Theunissen RPM. Does folic acid and zinc sulphate intervention affect endocrine parameters and sperm characteristics in men؟ Intern J Androl. 2006; 29(2):339-345.

El-Gendy, K. S., Aly, N. M., Mahmoud, F. H., Kenawy, A., and El-Sebae, A. K. H. (2010). The role of vitamin C as antioxidant in protection of oxidative stress induced by imidacloprid. *Food and chemical Toxicology*, 48(1), 215-221.

Elkomy, A., M. Kandeil, A., Abo-Salem, M., A. Hassan, W., Aboubakr, M., and A. Elhemiely, A. (2018). *Effect of azithromycin on fetal development in rats. International Journal of Pharmacology and Toxicology, 6(1), 18.*

Ellulu, M. S. (2017). Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: a review of facts and underlying mechanisms. *Inflammopharmacology*, *25*(3), 313-328.

Elmore A.(2005). Final report of the safety assessment of l-ascorbic acid, calcium ascorbate, magnesium ascorbate, magnesium ascorbyl phosphate,

sodium ascorbate, and sodium ascorbyl phosphate as used in cosmetics. *International Journal of Toxicology*. 24(2):51-111.

El-Neweshy, M. S., and El-Sayed, Y. S. (2011). Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Experimental and Toxicologic Pathology*, *63*(3), 221-227.

El-Shitany, N. A., and El-Desoky, K. (2016). Protective Effects of Carvedilol and Vitamin C against Azithromycin-Induced Cardiotoxicity in Rats via Decreasing ROS, IL1-β, and TNF-αProduction and Inhibiting NF-κB and Caspase-3 Expression. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2016, 1–13.*

Enwa, F. O., Jemikalajah, J. D., Adjekuko, C. O., and Ogbare, C. B. (2021). Evaluation of Some Biochemical Parameters of Wistar Rats Induced by Staphylococcus aureus Isolated from Pneumonia Patients. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 77-84.

Er, A., Ulutas, E., Altan, F., Cetin, G., Bulbul, A., Elmas, M., and Yazar, E. (2011). Tulathromycin disturbs blood oxidative and coagulation status. *African Journal of Biotechnology*, *10*(16), 3243-3247.

Eteng, M. U., Ibekwe, H. A., Amatey, T. E., Bassey, B. J., Uboh, F. U., & Owu, D. U. (2006). Effect of vitamin C on serum lipids and electrolyte profile of albino Wistar rats. *Nigerian journal of physiological sciences*, *21*(1-2).

Eyer P, Podhradský D. (1986).Evaluation of the micromethod for determination of glutathione using enzymatic cycling and Ellman's reagent .Analytical biochemistry, 15;153(1):57-66.

Eze, E. D., Dawud, F. A., Zainab, A. A., Jimoh, A., Malgwi, I. S., and Isa, A. S. (2012). Preliminary studies of effects of vitamin C and zinc on some liver enzymes in alloxan-induced diabetic wistar rats. *Asian J Med Sci*, *4*(1), 17-22.

Feola, D. J., Garvy, B. A., Cory, T. J., Birket, S. E., Hoy, H., Hayes, D., Jr. and Murphy, B. S. (2010) compartmentalization during lung infection with Pseudomonas. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 54, 2437-2447.

Finley W. H. (1975). Effect of drugs on chromosome structure. *The American journal of clinical nutrition*, *28*(5), 521–529.

Gallie DR.(2013). Increasing vitamin C content in plant foods to improve their nutritional value-successes and challenges. Nutrients, 5:3424-3446.

Grzybowski A, Pietrzak K: Albert Szent-Györgyi (1893-1986): the scientist who discovered vitamin C. Clinics in Dermatology 2013, 31(3):327-331.

Gupta, S., Agarwal, A., Banerjee, J., and Alvarez, J. G. (2007). The role of oxidative stress in spontaneous abortion and recurrent pregnancy loss: a systematic review. *Obstetrical and gynecological survey*, *62*(5), 335-347.

Hadwan, M. H., and Abed, H. N. (2016). Data supporting the spectrophotometric method for the estimation of catalase activity. Data in brief, 6, 194-199.

Han, B., Sheng, Y., Wang, L., Feng, H., Hou, X., and Li, Y. (2017). Intrahepatic cholestasis of pregnancy or azithromycin-induced intrahepatic cholestasis: A case report. Medicine, 96(52).

Han, Q., Shen, T., Wang, F., Wu, P., and Chen, J. (2018). Preventive and Therapeutic Potential of Vitamin C in Mental Disorders. *Current Medical Science, 38(1), 1–10.*

Helal, M., Shawky, M., Elhusseiny, S., and Abd Elhameed, A. (2021). Lactoferrin Ameliorates Azithromycin-induced Cardiac Injury: Insight into Oxidative Stress/TLR4/NF-κB Pathway. Journal of Advanced Pharmacy Research, 5(2), 285-296.

Hemilä, H. (2017). Vitamin C and Infections. *Nutrients*, 9(4), 339.

Henry, R. . (1974). Clinical Chemistry Principle and Techniques.

Hodge, P. and Michalowicz, B. (2001) Genetic predisposition to periodontitis in children and young adults. *Periodontology* 2000 26, 113-134.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., ... & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *cell*, *181*(2), 271-280.

Hopkins, S. (1991). Clinical toleration and safety of azithromycin. *The American journal of medicine*, 91(3), S40-S45.

Ibrahim, A. A. E., and El-Sherbeny, K. M. (2006). Clarithromycin Genotoxicity in Mice. CYTOLOGIA, 71(1), 5–10.

Ila, H. B., & Topaktas, M. (2001). Effects of Spiramycin on Chromosome Aberration and Micronucleus Formation in Rat Bone Marrow Cells. *CYTOLOGIA, 66(4), 395–401*.

Jacob, R. A., and Sotoudeh, G. (2002). Vitamin C Function and Status in Chronic Disease. Nutrition in Clinical Care, 5(2), 66–74. doi:10.1046/j.1523-5408.2002.00005.x

Jaeschke, H., & Ramachandran, A. (2011). Reactive oxygen species in the normal and acutely injured liver. *Journal of hepatology*, *55*(1), 227.

Jelić, D., Mutak, S., and Lazarevski, G. (2013). The azithromycin success story. *Medicinal chemistry in drug discovery: design, synthesis and screening*, 1-16.

Jiang, X., Baucom, C., & Elliott, R. L. (2019). Mitochondrial toxicity of azithromycin results in aerobic glycolysis and DNA damage of human mammary epithelia and fibroblasts. *Antibiotics*, *8*(3), 110.

JOYCE C. HOLLANDER-RODRIGUEZ, M.D., and JAMES F. CALVERT, JR., M.D.(2006). Hyperkalemia, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon., 15;73(2):283-290.

Kadota, J., Mizunoe, S., Kishi, K., Tokimatsu, I., Nagai, H. and Nasu, M. (2005) Antibiotic- induced apoptosis in human activated peripheral lymphocytes. *International Journal of Antimicrobial Agents* 25, 216-220.

Kahl, V. F. S., Reyes, J. M., Sarmento, M. S., and da Silva, J. (2012). *Mitigation by vitamin C of the genotoxic effects of nicotine in mice, assessed by the comet assay and micronucleus induction. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 744(2), 140–144.*

Kandila, A. M., Farrag, A. R. H., Hassan, B. N., and I S, D. E. E. (2015). Histological Study and DNA Changes in the Kidneys of Rat Fetuses Maternally Treated with Clarithromycin. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine*, *61*(1), 575-590.

Kardeh, S., Saki, N., Jowkar, F., Kardeh, B., Moein, S. A., and Khorraminejad-Shirazi, M. H. (2019). Efficacy of azithromycin in treatment of acne vulgaris: a mini review. *World journal of plastic surgery*, *8*(2), 127.

Kassirer, J.P. New eng. J. Med.285, 385 (1971)

Kawakami, K., Kadota, J., Iida, K., Fujii, T., Shirai, R., Matsubara, Y. and Kohno, S. (1997) Phenotypic characterization of T cells in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and peripheral blood of patients with diffuse panbronchiolitis; the importance of cytotoxic T cells. *Clinical Experiments in Immunology* 107, 410-416.

Khalil, R. M. A. (2012).The histological changes induced by cisplatineum on the liver tissue in rats: The role of vitamin C. M.Sc. / Thesis. University of Mosul .College of Medicine.

Koekkoek, W. A. C., and van Zanten, A. R. (2016). Antioxidant vitamins and trace elements in critical illness. *Nutrition in clinical practice*, 31(4), 457-474.

Koffas, A., Murray-Lyon, I. M., and Williams, R. (2017). Azithromycin-induced cholestatic hepatitis. *Oxford medical case reports*, *2017*(6), omx027.

Kong, F. Y. S., Rupasinghe, T. W., Simpson, J. A., Vodstrcil, L. A., Fairley, C. K., McConville, M. J., and Hocking, J. S. (2017). Pharmacokinetics of a single 1g dose of azithromycin in rectal tissue in men. PLOS ONE, 12(3), e0174372.

Kuiper HC, Bruno RS, Traber MG, Stevens JF (2011) Vitamin C supplementation lowers urinary levels of 4-hydroperoxy-2- nonenal metabolites in humans. *Free Radic Biol Med* 50:848–853.

Kumar, G., Banu, G. S., Pappa, P. V., Sundararajan, M., and Pandian, M. R. (2004). Hepatoprotective activity of Trianthema portulacastrum L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, *92*(1), 37-40.

Kumar, V., Harjai, K., and Chhibber, S. (2008). Effect of clarithromycin on lung inflammation and alveolar macrophage function in Klebsiella pneumoniae B5055-induced acute lung infection in BALB/c mice. *Journal of Chemotherapy*, *20*(5), 609-614.

Kurdowska, A., Noble, J. M. and Griffith, D. E. (2001) The effect of azithromycin and clarithromycin on ex vivo interleukin-8 (IL-8) release from whole blood and IL-8 production by human alveolar macrophages. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 47, 867-870.

Lee, J. I., Kim, M. J., Park, C. S., and Kim, M. C. (2006). Influence of ascorbic acid on BUN, creatinine, resistive index in canine renal ischemia-reperfusion injury. *Journal of veterinary science*, *7*(1), 79.

Lee, V. W., and Harris, D. C. (2011). Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrology*, *16*(1), 30-38.

Li DQ, Zhou N, Zhang L, Ma P, Pflugfelder SC.(2010). Suppressive effects of azithromycin on zymosan-induced production of proinflammatory mediators by human corneal epithelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci.;51(11):5623-5629.

Li, H., Liu, D.-H., Chen, L.-L., Zhao, Q., Yu, Y.-Z., Ding, J.-J., … Xie, C.-M. (2013). Meta-Analysis of the Adverse Effects of Long-Term Azithromycin Use in Patients with Chronic Lung Diseases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58(1), 511–51.

Li, H., Zhou, Y., Fan, F., Zhang, Y., Li, X., Yu, H., ... and Jiang, D. (2011). Effect of azithromycin on patients with diffuse panbronchiolitis: retrospective study of 51 cases. *Internal Medicine*, *50*(16), 1663-1669.

Lockwood, A. M., Cole, S., & Rabinovich, M. (2010). Azithromycin-induced liver injury. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *67*(10), 810-814.

Lu, Z. K., Yuan, J., Li, M., Sutton, S. S., Rao, G. A., Jacob, S., and Bennett, C. L. (2015). Cardiac risks associated with antibiotics: azithromycin and levofloxacin. *Expert opinion on drug safety*, *14*(2), 295-303.

Łuczaj, W., and Skrzydlewska, E. L. Ż. B. I. E. T. A. (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. Cell Mol Biol Lett, 8(2), 391-413.

Lutsenko, E. A., Cárcamo, J. M., and Golde, D. W. (2002). Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(19), 16895-16899.

Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. carcinogenesis, 21(3), 361-370.

Martinez, M. A., Vuppalanchi, R., Fontana, R. J., Stolz, A., Kleiner, D. E., Hayashi, P. H., … Chalasani, N. (2015). Clinical and Histologic Features of Azithromycin-Induced Liver Injury. Clinical Gastroenterology and Hepatology, 13(2), 369–376.e3.

Matzneller, P., Krasniqi, S., Kinzig, M., Sörgel, F., Hüttner, S., Lackner, E., ... and Zeitlinger, M. (2013). Blood, tissue, and intracellular concentrations of azithromycin during and after end of therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, *57*(4), 1736-1742.

McEvoy CT, Schilling D, Clay N, Jackson K, Go MD, Spitale P et al (2014) Vitamin C supplementation for pregnant smoking women and pulmonary function in their newborn infants: *a randomized clinical trial*. JAMA 311:2074–2082.

McMullan, B. J., and Mostaghim, M. (2015). Prescribing azithromycin. *Australian prescriber*, *38*(3), 87.

MD. Hasan J, Ahmad J. (2019). Azithromycin-Induced Acute Kidney Injury in an Elderly Patient. Clin Case Rep Int. 3: 1095.

Medina, J., and Moreno-Otero, R. (2005). Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs*, *65*(17), 2445-2461.

Meng, Q. H., Irwin, W. C., Fesser, J., & Massey, K. L. (2005). Interference of ascorbic acid with chemical analytes. *Annals of clinical biochemistry*, *42*(6), 475-477.

Meyer, D.J. and Harvey, J.W. (2004).Hepatobiliary and skeletal muscle enzymes and liver function tests. In: Meyer DJ and Harvey JW, editors. Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 3rd ed. St. Louis, MO: Saunders;:169–192.

Mobasher Ahmad, Iqra Masood, Hafeez Ikram, Rukhsana Anwar, Afroze Mobasher, Sairah Hafeez Kamran and Usman Akhtar, (2018). Pharmacological Investigation of *Phoenix dactylifera* L. in Azithromycin Induced Toxicity. *International Journal of Pharmacology, 14: 61-67.*

Mokhtari, G., & Teimoori, M. (2018). Effects of pre-transplant azithromycin administration on kidney graft function: study protocol for a double-blind randomized clinical trial. Trials, 19(1).

Mouton, R. and Holder, K.(2006). Laboratory tests of renal function. Anaesthesia Intensive Care Medicine.7:240-243.

Moy, B.T.; Dojki, F.K. Scholes, J.V. and Hoffman, M.G.(2015). Azithromycin induced cholestatic hepatitis. Conn Med., 79: 213-5.

Müller, L., Fröhlich, K., and Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (αTEAC), DPPH assay and peroxyl radical scavenging assay. *Food Chemistry*, *129*(1), 139-148.

Mumtaz S, Ali S, Khan R, Shakir HA, Tahir HM, Mumtaz S, Saiqa Andleeb S (2020) Therapeutic role of garlic and vitamins C and E against toxicity induced by lead on various organs. Environmental Science and Pollution Research 27(9):8953–8964.

Netke, S.P., M.V. Roomi, C. Tsao and A. Niedzwiecki, 1997. Ascorbic acid protects guinea pigs from acute aflatoxin toxicity. Toxicol. Appl. Pharmacol., 143: 429-435.

Oboh, G., and Ogunruku, O. O. (2010). Cyclophosphamide-induced oxidative stress in brain: protective effect of hot short pepper (Capsicum frutescens L. var. abbreviatum). *Experimental and Toxicologic Pathology*, *62*(3), 227-233.

Olayinka, E. T. and Ore, A. (2014). Influence of azithromycin treatment on hepatic lipid peroxidation and antioxidant defence systems of rats.British *Journal of Pharmaceutical Research*, 4(2):240-256.

Olive, P. L., Banath, J. P., and Durand, R. E. (1990). Radiat. Res. 122, 86–94.

OWENS, C., and BELCHER, R. (1965). A COLORIMETRIC MICRO-METHOD FOR THE DETERMINATION OF GLUTATHIONE. Biochemical Journal, 94(3), 705–711.

Padayatty SJ, Sun H, Wang Y, Riordan HD, Hewitt SM, Katz A, Wesley RA, Levine M .(2004). Vitamin C pharmacokinetics: implications for oral and intravenous use. Ann Intern Med,140:533-7

Padayatty, S. J., & Levine, M. (2016). Vitamin C: the known and the unknown and Goldilocks. *Oral diseases*, *22*(6), 463-493.

Park, H. J., Seo, K. I., and Choi, Y. I. (2020). Liver transplantation for azithromycin-induced severe liver injury. Korean Journal of Transplantation, 34(4), 279-285.

Parnham, M. J., Haber, V. E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G. M., and Vos, R. (2014). Azithromycin: mechanisms of action

and their relevance for clinical applications. *Pharmacology and therapeutics*, 143(2), 225-245.

Paulose, P., Juliet, S., Samraj, S., Nair, S. N., Chandrasekhar, L., George, A. J., ... and Ravindran, R. (2016). Ameliorative effect of vitamin E on azithromycin induced biochemical and histological changes in liver tissue of rats. *Adv. Anim. Vet. Sci*, *4*(2), 85-91.

Pehlivan, F. E. (2018). Vitamin C: An Epigenetic Regulator. In *Vitamin C-an Update on Current Uses and Functions*. IntechOpen.pp35-36.

Persico, C., Rocchi, A., Edefonti, A., Milani, G. P., Mazzoni, M. B. and Fossali, E. F. (2011). The acute interstitial nephritis induced by azithromycin. *NDT plus*, 4(3): 218.

Premkumar K. and Bowlus C. L., "Ascorbic acid does not increase the oxidative stress induced by dietary iron in C3H mice," Journal of Nutrition, vol. 134, no. 2, pp. 435–438, 2004.

Rama, R. P., Kaul, C. L., and Jena, G. B. (2002). Genotoxicity testing, a regulatory requirement for drug discovery and development: impact of ICH guidelines. *Indian journal of pharmacology*, *34*(2), 86.

Ray, W. A., Murray, K. T., Hall, K., Arbogast, P. G., and Stein, C. M. (2012). Azithromycin and the risk of cardiovascular death. *The New England journal of medicine*, *366*(20), 1881–1890.

Righi, N. C., Schuch, F. B., De Nardi, A. T., Pippi, C. M., de Almeida Righi, G., Puntel, G. O., ... and Signori, L. U. (2020). Effects of vitamin C on oxidative stress, inflammation, muscle soreness, and strength following acute exercise: meta-analyses of randomized clinical trials. *European journal of nutrition*, 1-13.

Rocchi, A.; Edefonti, A. G.; Milani, G.P.; Mazzoni, M.B. and FossalI, E.F.(2011). The acute interstitial nephritis induced by azithromycin. NDT Plus, 4(3): 1 Pages 218.

Rodrigues, S., Antunes, S. C., Correia, A. T., & Nunes, B. (2016). Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of Oncorhynchus mykiss. *Science of The Total Environment, 545-546, 591–600.*

Romanowska-Sarlej, J., Matysiak, W., Kifer-Wysocka, E., Czerny, K., Masłyk, T., and Piskórz, J. (2004, January). Ultrastructure of the hepatocytes after application of azithromycin (Sumamed). In Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska. Sectio D: Medicina (Vol. 59, No. 2, pp. 57-60).

Ryan, M. J., Dudash, H. J., Docherty, M., Geronilla, K. B., Baker, B. A., Haff, G. G., ... and Alway, S. E. (2010). Vitamin E and C supplementation reduces oxidative stress, improves antioxidant enzymes and positive muscle work in chronically loaded muscles of aged rats. *Experimental gerontology*, *45*(11), 882-895.

Sakurai, T., Kamio, K., Sasaki, K., Nishimoto, T., Yamaguchi, J. I., Sasaki, M., & Tsutsumi, S. (2018). Imaging mass microscopy of kidneys from azithromycin-treated rats with phospholipidosis. *The American journal of pathology*, *188*(9), 1993-2003.

Salimi, A., Eybagi, S., Seydi, E., Naserzadeh, P., Kazerouni, N. P., and Pourahmad, J. (2016). Toxicity of macrolide antibiotics on isolated heart mitochondria: a justification for their cardiotoxic adverse effect. *Xenobiotica*, *46*(1), 82-93.

Sayed M. G. A. EL. ., Enas A. H. Farag ., Mona Y. M. Kandil .(2019). Hepatorenal protective effect of curcumin in normal and infected with staphyococuss aureus treated with azithromycin. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences* , Vol 8, Issue 4.

Schlebusch, H., et al.; Dtsch .Med. Wschr. 99, 765 (1974)

Sedhrouchni, I., J. Drai, E. Bammier, J. Riviere, P. Calmard, I. Garcia, J. Orgiazzi and A. Revol, 2002. Oxidative stress parameters in type 1, type 2

and insulin-treated type 2 diabetes mellitus; insulin treatment efficiency. Clin. Chim. Act., 321: 89-96.

Shinkai, M., Foster, G. H. and Rubin, B. K. (2006) Macrolide antibiotics modulate ERK phosphorylation and IL-8 and GM-CSF production by human bronchial epithelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology* 290, L75-L85.

Shinkai, M., Henke, M. O. and Rubin, B. K. (2008) Macrolide antibiotics as immunomodulatory medications: proposed mechanisms of action. *Pharmacological Therapeutics* 117, 393-405.

Simonson W. (2020). Vitamin C and coronavirus. *Geriatric nursing (New York, Ny)* , 41(3), 331–332.

Singh, H., Prakash, A., Kalia, A. N., & Majeed, A. B. A. (2016). Synergistic hepatoprotective potential of ethanolic extract of Solanum xanthocarpum and Juniperus communis against paracetamol and azithromycin induced liver injury in rats. *Journal of traditional and complementary medicine*, *6*(4), 370-376.

Singh, P., Singh, I. N., Kumar, S., and Gupta, R. (2014). Developmental Genotoxicology and genotoxicity testing guidelines: an overview on erythromycin genotoxicity. Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology, 2(4), 1348.

Singh, P., Singh, L., Mondal, S. C., Kumar, S., and Singh, I. N. (2013). *Erythromycin-induced genotoxicity and hepatotoxicity in mice pups treated during prenatal and postnatal period. Fundamental and Clinical Pharmacology, 28(5), 519–529.*

Soni, N., Harrington, J. W., Weiss, R., Chander, P. and Vyas, S. (2004). Recurrent acute interstitial nephritis induced by azithromycin. The Pediatric Infectious Disease Journal, 23(10): 965-966.

Sorice A, Guerriero E, Capone F, Colonna G, Castello G, Costantini S. (2014). Ascorbic acid: its role in immune system and chronic inflammation diseases. *Mini Rev Med Chem*. 14(5):444-52.

Sram, R. J., Binkova, B., and Rossner, P. (2012). Vitamin C for DNA damage prevention. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 733(1-2), 39–49.*

Suvarna, S. K.; Layton, C. & Bancroft, J. D. (2013). Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. Elsevier.

Svanström, H., Pasternak, B., & Hviid, A. (2013). Use of azithromycin and death from cardiovascular causes. *New England Journal of Medicine*, *368*(18), 1704-1712.

Talke, H., Schubert, G.E. ; Klin. Wochenschr, 43, 174(1965)

Tan, J., Wang, J., Geng, L., Yue, Y., Wu, N., and Zhang, Q. (2020). Comparative Study of Fucoidan from Saccharina japonica and Its Depolymerized Fragment on Adriamycin-Induced Nephrotic Syndrome in Rats. *Marine drugs*, *18*(3), 137.

Thefeld, W., et al.; Dtsch. Med Wschr.99, 343 (1974)

Tolliver, D.K., Robbins, L.W., (1991). Techniques in karyology: The bone marrow extraction method. In: Goldman, C.A. (Eds.), Tested studies for laboratory teaching. Volume 12.. Proceedings of the 12th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), pp. 69–74.

Traynor, J.; Geddes, C.C. and Fox, J.G. (2006).How to measure renal function in clinical practice.BMJ.;333:733-737.

Ullah, S., Begum, M., Ahmad, S. and Dhama, K., (2016) a. Genotoxic effect of Endosulfan at sublethal concentrations in Mori (Cirrhinus mrigala) fish using single cell gel electrophoresis (comet assay). *International Journal of Pharmacology*, 12, 169-176

Usadadia, V.; Patel, J. M.; Vihol, P. D. and Urkude, A. P. (2020). Protective Effect of Quercetin on Azithromycin Induced Hepatotoxicity and Nephrotoxicityin Wistar Rats. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 9(9): 2926-2934.

Van der Zalm, I. J., Tobé, T. J., and Logtenberg, S. J. (2020). Omeprazole-induced and pantoprazole-induced asymptomatic hyponatremia: a case report. Journal of Medical Case Reports, 14(1), 1-4.

Velíšek, J., and Cejpek, K. (2007). Biosynthesis of food constituents: Vitamins. 2. Water-soluble vitamins: Part 1 - a review. *Czech Journal of Food Sciences*, 25(No. 2), 49–64.

Villacorta, L., Azzi, A., and Zingg, J. M. (2007). Regulatory role of vitamins E and C on extracellular matrix components of the vascular system. *Molecular aspects of medicine*, *28*(5-6), 507–537.

Wilson RJ, Willis R, Gearry P, Skidmore E, Fleming C, Frampton A (2017) Inadequate vitamin C status in prediabetes and type 2 diabetes mellitus: associations with glycaemic control, obesity, and smoking. Nutr 9(9):997–102.

Wilson, J. X. (2013). Evaluation of vitamin C for adjuvant sepsis therapy. *Antioxidants and redox signaling*, 19(17), 2129-2140.

Woodruff, A. E., Meaney, C. J., Hansen, E. A., and Prescott, G. M. (2015). Azithromycin-Induced, Biopsy-Proven Acute Interstitial Nephritis in an Adult Successfully Treated with Low-Dose Corticosteroids. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, *35*(11), e169-e174.

Woodward, R. B. (1957). Struktur und biogenese der makrolide. *Angewandte Chemie*, *69*(1-2), 50-58.

Yang, C., Song, G., & Lim, W. (2020). A review of the toxicity in fish exposed to antibiotics. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, *237*, 108840.

Yang, M. G., and De, Q. (2017). Effect of azithromycin combined with fat-soluble vitamin on serum inflammatory cytokines and chemokines as well as lung function in children with mycoplasma pneumonia. *Journal of Hainan Medical University*, *23*(7), 126-130.

Yazar, E., Altunok, V., Elmas, M., Traş, B., Baş, A. L., & Özdemir, V. (2002). The effect of tilmicosin on cardiac superoxide dismutase and glutathione peroxidase activities. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, *49*(4), 209-210.

Yazdani, A., and Sayadi, M. H. (2018). Sonochemical degradation of azithromycin in aqueous solution. *The Journal of Mediret and Mohandessin Behdasht Mehit*, 5 (2), 85-92.

Z. Klin. Chem. Klin Biochem. 8,658 (1980) 10, 182 (1972).

Zimmermann, P., Ziesenitz, V. C., Curtis, N., and Ritz, N. (2018). The immunomodulatory effects of macrolides—a systematic review of the underlying mechanisms. *Frontiers in immunology*, 9, 302.

Summary

This study was conducted in the Graduate Studies Laboratory - Department of Life Sciences - College of Education for Pure Sciences - University of Karbala from October 13, 2020 to May 15, 2021, the current study aimed to know the mutagenic activity of Azithromycin and the protective role of vitamin C in male albino rats by studying some Variables in genetic, biochemical and histological parameters, 25 white male rats were used and divided randomly into five groups. The first group was considered the control group, where it was given physiological salt (Normal Saline), and it was administered orally, while the second and third groups were given a dose (15-30mg/kg) on the Azithromycin was taken orally on the first day of the experiment and for a period of 14 days, as they were returned from the treatment groups - the fourth group was orally dosed with vitamin C at a concentration of (100 mg/kg) and Azithromycin at a dose of (15 mg/kg), and the fifth group was dosed orally with vitamin C at a concentration of (100 mg) /kg) and Azithromycin at a dose of (30mg/kg) of body weight, respectively, for 14 days, which were considered as protection groups. Blood samples were collected from the five groups after 14 days of the experiment to measure the following parameters: DNA breakage, chromosomal abnormalities, level of catalase, glutathione, sodium ions (Na+), potassium (K+), liver enzymes (ALT-AST-ALP) and urea levels. And the level of creatinine, as well as the evaluation of histological changes in the liver and kidneys, and we obtained the following results:

Azithromycin caused a significant increase ($P < 0.05$) in the percentage of DNA breakage in the third group G3 compared with the control group, while the second groups G2, the fourth G4 and the fifth G5 showed no significant differences ($P<0.05$) in the percentage of high DNA breakage compared with the control group. control group. Azithromycin also caused a significant ($P < 0.05$) increase in the percentage of total chromosomal abnormalities in the second treatment groups G2 and third G3 compared with the control group. As for the

fourth and fifth prevention groups G4 and G5, there were no significant differences (P<0.05) in the percentage of chromosomal abnormalities. college compared with the control group.

Azithromycin caused a significant decrease (P< 0.05) in the level of CAT catalase and GSH glutathione in the second treatment groups G2 and the third G3 compared with the control group. As for the protective groups, the results of the study for the level of GSH and CAT showed no significant differences (P<0.05) in the groups. fourth and fifth compared with the control group. Azithromycin also caused a significant (P<0.05) decrease in the mean sodium level in the second and third treatment groups compared with the control group. As for the fourth and fifth prevention groups, it was found that there were no significant differences (P<0.05) in the sodium rate compared with the control group. While the results showed a significant (P<0.05) increase in the potassium rate of the therapeutic and preventive groups compared with the control group, and it also led to a significant (P<0.05) increase in the AST level in the second and third treatment groups that were given the drug compared to the control group. As for the fourth and fifth prevention groups, there were no significant differences (P>0.05) in the mean AST level that were given compared with the control group. While the results showed that there were no significant differences (P>0.05) in the level of ALT and ALP in the second treatment group compared with the control group, while they increased significantly (P<0.05) in the third treatment group compared with the control group. The fourth and fifth prevention groups also showed no significant differences (P>0.05) in the level of ALT and ALP compared with the control group. It was also caused by a significant increase (P<0.05) in the level of urea and creatinine in the second and third treatment groups compared with The control group As for the prevention groups, the results indicated that there were no significant differences (P>0.05) in the level of urea and creatinine for the fourth group compared with the control

group, while the cause of a significant increase (P<.0.05) in the level of urea and creatinine in the fifth group compared with the control group. .

Azithromycin caused histological changes to the liver in the second and third groups compared to the control group, such as central vein congestion, hepatocyte necrosis, nuclei constriction, sinusoidal dilatation, and the presence of inflammatory cells, while the fourth and fifth protective groups showed central vein congestion with regularity of part of the hepatic cords and the presence of sinusoids with the presence of cells Chronic inflammatory compared with the control group. Azithromycin also caused changes in the kidney tissue in the second and third treatment groups from atrophy in the volume of the glomerulus and Bowman's capsule and the destruction of the walls of the proximal urinary tubule and the distal urinary tubule and a significant increase in the size of Bowman's space and vascular congestion compared with the control group. As for the third and fourth protective groups, atrophy in the size of some glomeruli and Bowman's capsule, destruction of the walls of the proximal urinary tubule and the distal urinary tubule, an increase in the size of Bowman's space, and damage to the kidney tissue compared with the control group.

From the foregoing, we conclude that Azithromycin caused DNA damage and chromosome abnormalities, as well as changes in the biochemical and histological parameters of the liver and kidneys. The administration of vitamin C reversed the side effects of the drug. The study proved this result for the first time in Iraq, as it studied the changes in DNA and chromosomal abnormalities as well as the parameters. Biochemistry as a result of drug administration.

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Karbala
College of Education for Pure Sciences
Department of Biology

cytogenetic study of azithromycin effect on physiological and histological parameters and the protective role of vitamin C in male Rats (*Rattus Norvegicus*)

By

Hatem Karim Jassab

B. Sc. Biology / 2013

A Thesis submitted to the College of Education Pure Science of Karbala University as a partial fulfillment of the requirements for the degree of master in Biology-Zoology

Supervised By

Professor Dr. **Yasemin Khudiar Alghanimi**

Lecture **Alaa Hussein Mahdi Alsafy**

2021.A.D. **1442 A . H.**