العسل الطبيعي مضاداً للطفرة المحدثة بعقار الميثوتركسيت Methotrexate في الفئران البيض *Mus musculus*

عباس حسين مغير الربيعي

كلية التربية الاساسية–جامعة بابل

الخلاصة

لقد تم دراسة الكفاءة التثبيطية للعسل الطبيعي Natural Honey من خلال دراسة تأثير العسل في تثبيط الفعل السمي والتطفيري لعقار الميثوتركسيت (MTX) على الخلايا الجسمية والخلايا الجنسية في الفأر الابيض *Mus Musculus* وبالاعتماد على التحليلات قصيرة الامد المتمثلة باختبار مؤشر الانقسام الخيطي للخلايا الجسمية والخلايا الجنسية واختبار التغيرات الكروموسومية في الخلايا الجسمية واختبار تكوين النوى الصغيرة واختبار التشوهات في رؤوس الحيامن.

استخدم العسل بالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/ كغم وزن الجسم في حين استخدام العقار (MTX) بجرعة مقدارها (3.25) ملغم/كغم وزن الجسم وقد استخدمت نوعين من المعاملات في الاولى يعطى العسل قبل اعطاء العقار ويعطى في الثانية بعد اعطاء العقار.

لقد اظهرت النتائج انعدام التأثيرات السمية والتطفيرية للعسل وللتراكيز المستخدمة كافة بالاضافة الى قدرة العسل في تحفيز الانقسام وخفض التردد التلقائي لتكوين النوى الصغيرة وامتلاك العقار (MTX) القدرة على خفض مؤشر الانقسام واستحثاث ظهور التغيرات الكروموسومية وتكوين النوى الصغيرة وزيادة نسبة ظهور التشوهات في رؤوس الحيامن. كما اظهرت النتائج الكفاءة التثبيطية العالية لتراكيز العسل تجاه التأثيرات السمية والتطفيرية لعقار الميثوتركسيت عند استخدامه قبل او بعد استخدام العقار.

Abstract

This study is designed to investigate the inhibitory efficiency of natural honey to the toxic and mutagenic effects of methotrexate drug in mice [*Mus musculus*] through using short-term assays which included cytogenetic analyses such as mitotic index of bone marrow and germ cells, chromosomal aberrations, micronucleus test and sperm head abnormities assays.

The potential genotoxic and mutagenic activity of honey at doses 150, 300, 450 and 600 mg/kg B.wt were investigated by using the above parameters. Simultaneously antimatation effect of honey against MTX (at dose 3.25 mg/Kg B.wt) effects [before and after exposure] was tested.

The results revealed the following:-

Absence of toxicity and mutagenicity for all concentrations of honey at tested doses, the high inhibitory effects of methotrexate drug to cell division, induction of chromosomal aberration, micronucleus formation and sperm head abnormalities and the inhibitory efficiency of all concentration of honey against the toxicity and mutagenicity of methotrexate .

المقدمة

ان اغلبية الادوية المضادة للتسرطن Anticarcinogens هي مواد ذات تأثرات سمية وان العديد منها هي مواد مطفرة ومسرطنة (Harris, 1976، وحسن، 2002 والربيعي، 2006) ومنها الميثوتركسيت (MTX) Methotrexate والذي يستعمل لمعالجة الاورام السرطانية المبكرة وبشكل واسع، حيث ينتج تأثيره من خلال التأثير في عملية انقسام الخلية بتأثيره في تثبيط فعالية الانزيم Dihydrofolate والذي يعد مفتاح التضاعف في الخلية (Huennekens, 1994) وهذا التأثير يؤدي الى منع تحول الفوليت الى ثنائي هيدروفوليت ويمنع تحول ثنائي هيدروفوليت الى رباعي هيدروفوليت وهذا التوقف في تحول هذه المواد ينعكس على الكميات المتوفرة من حامض الثايميدليك Thymidylic acid وحامض الانوسنيك Inosinic وهذا الحامضان ضروريان لبناء الاحماض النووية (Carter and Livingston , 1982).

هذا من جانب ومن جانب اخر من فان عقار الميثوتركسيت (MTX) يسبب في استحثاث ظهور التغيرات الكروموسومية عندما استعملت خلايا نفي العظم وخلايا الدم المحيطي

(Jenson and Nyfors , 1979) فضلاً عن انه يؤثر في نظام اصلاح الـ DNA (DNA-Repair)، حيث اشار الباحث Borchers واخرون (1990) ان استعمال هذا العقار يثبط عمل انظمة اصلاح ال DNA مما يؤدي الى حدوث تلف في جزيئة الـ DNA كما اشار الى ان فعل هذا العقار يكون من خلال احداث الكسور في اشرطة الـ DNA المفردة داخل الخلية وتراكمها وقد اعزى السبب في ذلك الى تأثير العقار في تثبيط عمل انزيم بلمرة الـ DNA (DNA-Polymerase) الخاص بنظام الاصلاح عن طريق القص (Excision Repair) وقد تأكد الباحث Borchers وجماعته من هذا الفعل للعقار وذلك من خلال ملاحظة ان اضافة Thymidine و Hypoxanthine الى الخلايا المعاملة بالعقار قد ادى الى توقف عملية تراكم كسور الـ DNA في الخلية وقد قادت هذه الملاحظات الى الافتراض ان تأثير العقار ربما يكون من خلال نفاذ النيوكليوتيدات المتوفرة وبالتالي توقف عملية اصلاح التلف.

وفي دراسة اجريت من قبل الباحث Maskaleris واخرون (1998) داخل الجسم الى in vivo وفي الزجاج in Vitro لمعرفة التأثيرات السمية الوراثية للعقار حيث توصلت الدراسة الى انه يثبط مؤشر الانقسام ويثبط مؤشر التضاعف ويزيد من استحثاث تكوين النوى الصغيرة، كما يزيد من التبادل الكروماتيدي الشقيق SCE. وقد لوحظ ايضاً ان تأثير العقار يزداد اذا ما أُستعمل مع الـ Caffein. كما اشار حسن (2002) ان تجريع الفئران القار يؤدي الى احداث تأثيرات تطفيرية وسمية من خلال خفض معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية ورفع نسبة الزيغ الكروموسومي واستحثاث تكوين النوى الصغيرة وزيادة ظهور التشوهات في رؤوس الحيامن وأن هذه التأثيرات يمكن تثبيطها باستخدام المستخلصات المائية والكحولية للهيل ونومي بصره وحبة البركة.

هذا من جهة ومن جهة اخرى بات من الضروري البحث في مكونات الغذاء عن المواد المثبطة للتطفير والتسرطن حيث يعد الغذاء مصدراً للمواد المطفرة والمسرطنة وفي الوقت نفسه يحتوي الغذاء على العديد من المواد ذات القابلية التثبيطية للمطفرات والمسرطنات (Kada *et al* , 1978 ; الربيعي، 2001 ; الربيعي، 2006) ومن هذه المواد العسل Honey الذي يمتلك الخصائص الغذائية والطبية الشافية المتنوعة حيث ورد في القرآن الكريم في سورة النحل الاية 69 انه بسم الله الرحمن الرحيم ((ثُمَّ كُلِي مِن كُلِّ الثَّمَرَاتِ فَاسْلُكِي سُبُلَ رَبِّكِ ذُلُلاً يَخْرُجُ مِن بُطُونِهَا شَرَابٌ مُّخْتَلِفٌ أَلْوَانُهُ فِيهِ شِفَاء لِلنَّاسِ إِنَّ فِي ذَلِكَ لآيَةً لِّقَوْمٍ يَتَفَكَّرُونَ)) صدق الله العلي العظيم.

ان العسل خليط من الماء والسكريات والبروتينات والفيتامينات والانزيمات والمعادن وحبوب اللقاح وبقايا من الفطريات والطحالب والخمائر وقطع من الشمع (White , 1979) وقد أشار خشيم والشحروري (1994) ان بعض مكونات العسل تسهم في عملية التمثيل الغذائي والمحافظة على حجم كريات الدم وكمية الهيموغلوبين وزيادة مقاومة الجسم للمكروبات ومنع العدوى وفقر الدم ويستخدم العسل ايضاً لأغراض علاجية كثيرة منها معالجة المصابين بأمراض القلب ونظراً لاحتوائه على الفلافونيد Flavonoides فانه يحمي الشرايين والاوردة من الرواسب والمواد المضرة والسامة. وقد اشار الباشا (1983) الى ان الاطباء الذين يعالجون مرضاهم بالاشعة يستخدمون الحقن الوريدية لمحلول العسل في الوقاية من تأثيرات هذه الجرع الاشعاعية وفي نفس الاتجاه لاحظت البديري (2002) ان للعسل كفاءة تثبيطية عالية تجاه التأثيرات السمية الوراثية لأشعة كاما ذات الجرع (0.1 ، 1.0 ، 4.0) كَري.

كما أشار الربيعي (2006) ان للعسل كفاءة تثبيطية عالية تجاه التأثيرات التطفيرية والسمية لعقار المايتومايسين–سي– والمستخدم بجرعة مقدارها 2 ملغم/كغم وزن الجسم في الفئران البيضاء. وانطلاقاً من اهمية

العسل وخصائصهِ الطبية المتميزة ولقلة الدراسات المعمولة في القطر حول اهمية العسل في الوقاية من المواد المطفرة والمسرطنة جاءت الدراسة الحالية لبيان تأثير تراكيز مختلفة من العسل الطبيعي في تثبيط تأثير عقار Methotrexate الذي يُستعمل لعلاج بعض حالات السرطان وله تأثيرات مطفرة ومسرطنة (حسن، 2002).

المواد وطرق العمل

لقد تم تحضير اربعة تراكيز من العسل الطبيعي الخالص وهي (150، 030، 450، 600) ملغم/غم وزن الجسم. اما ما يتعلق بعقار MTX فقد استخدم بجرعة مقدارها (3.25) ملغم/كغم وزن الجسم.

استخدمت الفئران السويسرية البيضاء *Mus Musculus* وبعمر (8–12) اسبوع ووزن (27–32)غم. كما تم اتباع طريقة Allen (1977) في تحضير كروموسومات خلايا نقي العظم، في حين استخدمت طريقة Evans واخرون (1964) للحصول على كروموسومات الخلايا الجنسية للذكور، اما لحساب النسبة المئوية للتغيرات الكرسومية فقد استخدمت طريقة Au واخرون (1978) في (100) خلية في الطور الاستوائي وبصورة عشوائية ولغرض استخراج النطف وحساب النسبة المئوية للتشوهات في رؤوس الحيامن فقد استخدمت طريقة Wyrobeck و Bruce (1975) مع بعض التحويرات وفيها استخرجت الحيامن من البربخ وصبغت بالايوسين ثم فحصت تحت المجهر وبواقع (100) ضمن كل شريحة بعدها تقارن الاشكال الموجودة مع الشكل الطبيعي لرأس الحيمن وتؤخذ النسبة المئوية للتشوهات. ولغرض اجراء اختبار تكوين النوى الصغيرة فقد استخدمت طريقة Schmid (1975) وذلك باستخدام خلايا نقي العظم حيث تحسب من خلال مسح (1000) خلية من الخلايا الحمراء متعددة الكروماتين من خلال حيوان حيث تحسب الخلايا الحاوية على نوى صغيرة لكل (1000) خلية ثم تحول الى النسبة المئوية.

ولغرض حساب مؤشر الانقسام فقد استخدمت طريقة Shubber و Al-Allak (1986) في حين استخدمت طريقة Rawat واخرون (1977) لحساب نسبة الحماية التي يقوم بها العسل وحسب المعادلة التالية:–

$$\text{نسبة الحماية\%} = \frac{\text{أ- ج}}{\text{أ- ب}} \times 100$$

حيث ان (أ) يمثل السيطرة الموجبة (ب) يمثل السيطرة السالبة و (ج) يمثل قيمة التداخل.

لقد تضمنت الدراسة ثلاثة اقسام: ففي القسم الاول هيأت (5) مجموعات ضمن كل مجموعة (7) فئران، جرعت 4 مجموعات تراكيز العسل (150، 300، 450، 600) ملغم/كلغم وزن الجسم لمدة (7) ايام وشرحت في اليوم الثامن (4) فئران من كل مجموعة لاجراء التحليلات الوراثية الخلوية للكشف عن تأثيرات العسل ولم تجرع حيوانات المقارنة (سيطرة سالبة)، اما (3) فئران المتبقية من كل مجموعة فقد تركت تناول العليقة الاعتيادية لمدة (7) ايام اخرى وفي اليوم الثامن شرحت لاجراء اختبار التشوهات في رؤوس الحيامن.

اما في القسم الثاني (دراسة التداخل) فقد هيأت (6) مجموعات ضمت كل مجموعة (9) فئران، جرعت منها (4) مجموعات تراكيز العسل المذكورة ولمدة (7) ايام ولم تجرع حيوانات السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة. وفي اليوم الثامن جرعت الحيوانات عدا مجموعة السيطرة السالبة العقار MTX (3.25) ملغم/كغم وزن الجسم وفي اليوم الثاني شرحت (4) فئران من كل مجموعة لاجراء التحليلات الوراثية الخلوية. اما (3) فئران المتبقية من كل مجموعة فقد تركت تناول العليقة الاعتيادية لمدة (7) ايام اخرى وفي اليوم الثامن شرحت لاجراء اختبار التشوهات في رؤوس الحيامن.

اما في القسم الثالث (دراسة التداخل) فقد هيأت (6) مجموعات ضمت كل مجموعة (7) فئران، جرعت الحيوانات عدا حيوانات السيطرة السالبة العقار (MTX) ثم جرعت العسل وحسب التراكيز المعدة وفي اليوم التالي شرحت (4) فئران من كل مجموعة لاجراء التحليلات الوراثية الخلوية، اما (3) فئران المتبقية من كل مجموعة فقد تركت تتناول العليقة الاعتيادية وفي اليوم الثامن شرحت لاجراء اختبار التشوهات في رؤوس الحيامن.

كررت التجارب لمرتين ثم حللت النتائج احصائياً لايجاد اقل فرق معنوي .L.S.D بين معدلات المعاملات.

النتائج

1- تأثير العسل

أ- اختبار مؤشر الانقسام الخيطي

يلاحظ في الشكل رقم (1) ان قيم مؤشر الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم قد ازدادت معنوياً ($P<0.05$) حيث يلاحظ ان قيم مؤشر الانقسام قد اصبحت (18.58، 20.57، 19.80، 19.06)% عند المعاملة بالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وزن الجسم على التوالي في حين كانت قيمة مؤشر الانقسام لمعاملة السيطرة (15.45)%.

واما ما يتعلق بمؤشر الانقسام الخيطي للخلايا الجنسية فيلاحظ في الشكل رقم (1) ان قيمة مؤشر الانقسام قد ازدادت معنوياً ($P<0.05$) عند تجريع جميع التراكيز حيث كانت لمعاملة السيطرة (9.5)% واصبحت (14.2، 13.65، 13.60، 12.82)% عند المعاملة بالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كلغم وزن الجسم على التوالي ويلاحظ ان المعاملة بالتركيز (300) ملغم/كغم هي الافضل بالنسبة لخلايا نقي العظم والمعاملة بالتركيز (150) ملغم/كلغم هي الافضل بالنسبة للخلايا الجنسية.

ب- التغيرات الكروسومية:

يلاحظ في الشكل رقم (1) ان تجريع الفئران تراكيز العسل لم يظهر اية فروق معنوية في نسب التغيرات الكروموسومية (كسر كروماتيدي وكسر كروموسومي) وان جميع القيم كانت مقاربة لقيم التغيرات الكروموسومية لحيوانات السيطرة.

ج- اختبار تكوين النوى الصغيرة

اظهرت النتائج وكما يلاحظ في الشكل (1) ان تجريع الفئران تراكيز العسل قد ادى الى خفض التردد التلقائي لتكوين النوى الصغيرة حيث كانت لمعاملة السيطرة (3.06) واصبحت (2.6 ، 1.78 ، 1.82، 2.99) عند المعاملة بالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم على التوالي وبين التحليل الاحصائي ان مستوى الخفض كان معنوياً ($P<0.05$) عند المعاملة بالتركيزين (300 ، 450) ملغم/كغم فقط.

د- اختبار التشوهات في رؤوس الحيامن

تظهر النتائج الموضحة بالشكل رقم (1) ان اعطاء الفئران تراكيز العسل قد أدى الى خفض نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن الا ان الانخفاض لم يكن معنوياً ($P>0.05$) مقارنة بمعاملة السيطرة عدا المعاملة بالتركيز (150) ملغم/كغم حيث كانت النسبة مقاربة لمعاملة السيطرة. وقد كانت نسبة التشوهات في رؤوس

الحيامن لمعاملة السيطرة (2.98)% وقد اصبحت عند المعاملة بالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم (2.99 ، 2.78 ، 2.85 ، 2.90)% على التوالي.

2- تأثير استعمال العسل قبل MTX (تداخل)

أ- اختبار مؤشر الانقسام

يلاحظ في الشكل رقم (2) الى مؤشر الانقسام لخلايا نقي العظام قد انخفض معنوياً ($P<0.05$) عند اعطاء الفئران العقار (MTX) مقارنة بالحيوانات غير العاملة ، حيث يلاحظ ان قيمة مؤشر الانقسام لحيوانات السيطرة السالبة كانت (15.77)% وعند اعطاء العقار MTX (السيطرة الموجبة) فقد اصبحت قيمة مؤشر الانقسام (6.65)%. واما ما يتعلق بتأثير تجريع الفئران تراكيز العسل ولمدة (7) ايام قبل اعطاء العقار MTX فقد ادى الى رفع قيمة مؤشر الانقسام معنوياً ($P<0.05$) ولجميع التراكيز وان نسبة الحماية وكما يظهر من الجدول رقم (1) التي احدثها استعمال العسل قبل اعطاء العقار MTX (تداخل) فقد كانت (40، 29، 42، 71)% للتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم على التوالي ويلاحظ ان المعاملة بالتركيز (600) ملغم/كغم كانت افضل المعاملات. وكذا الحال بالنسبة لمؤشر الانقسام للخلايا الجنسية حيث يلاحظ في الشكل رقم (2) ان اعطاء العقار MTX لوحده قد خفض مؤشر الانقسام معنوياً ($P<0.05$) اذا ما قورن بالسيطرة السالبة حيث كانت قيمة مؤشر الانقسام للحيوانات غير المعاملة (9.98)% وعند اعطاء العقار MTX كانت قيمة مؤشر الانقسام للخلايا الجنسية (4.35)% وإما عند تجريع تراكيز العسل لمدة (7) ايام قبل اعطائها العقار MTX فقد ادى الى رفع قيمة مؤشر الانقسام معنوياً ($P<0.05$) ولجميع التراكيز المستعملة. وان نسب كانت (41، 41، 47، 50)% للتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم على التوالي وافضل المعاملات كانت المعاملة بالتركيزين (450، 600) ملغم/كغم.

ب- اختبار التغيرات الكروموسومية

يلاحظ في الشكل رقم (2) ان النسبة المئوية للتغيرات الكروموسومية قد ازدادت معنوياً ($P<0.05$) نتيجة اعطاء الفئران العقار MTX (السيطرة الموجبة) مقارنة مع الحيوانات التي لم تجرع (السيطرة السالبة). حيث كانت نسبة التغيرات الكروموسومية (0.23)% لمعاملة السيطرة السالبة وعند اعطاء الفئران العقار فقد اصبحت (10.02). واما عند تجريع الفئران العسل قبل اعطاء العقار MTX ولمدة (7) ايام فقد ادى الى زيادة النسبة المئوية للتغيرات الكروموسومية مقارنة بحيوانات السيطرة السالبة الا ان الزيادة هي اقل معنوياً ($P<0.05$) اذا ما قورنت بالزيادة الحاصلة بفعل اعطاء العقار MTX لوحدة (السيطرة الموجبة) ويلاحظ من الجدول رقم (1) ان نسب الحماية التي احدثها استعمال العسل كانت (56، 69، 62، 61)% للتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وكانت المعاملة بالتراكيز (300) ملغم/كغم كانت الافضل من بين العاملات.

ج- اختبار تكوين النوى الصغيرة

اظهرت النتائج وكما يلاحظ في الشكل رقم (2) ان التردد التلقائي لتكوين النوى الصغيرة قد ازداد نتيجة اعطاء الفئران العقار MTX اذا ما قورنت مع النسبة المئوية لتكوين النوى الصغيرة في حيوانات السيطرة السالبة حيث كانت (3.20)% واصبحت نتيجة اعطاء العقار MTX (21.50)% وان هذه الزيادة معنوية ($P<0.05$). واما ما يتعلق بتأثير اعطاء الفئران العسل ولمدة (7) ايام قبل اعطائها العقار فيلاحظ في الشكل رقم (2) ان

تجريع العسل قبل العقار قد احدث زيادة في النسبة المئوية لتكوين النوى الصغيره ولجميع تراكيز العسل ولكن هذه الزيادة كانت اقل معنوياً ($P<0.05$) عن الزيادة الحاصلة بفعل اعطاء العقار MTX لوحده (السيطرة الموجبة) وان نسب الحماية التي يحدثها استعمال العسل كانت (57 ، 63 ، 63 ، 61)% وللتراكيز (150 ، 300 ، 450 ، 600) ملغم/كغم على التوالي. وكانت المعاملة بالتركيزين (300 ، 450) ملغم/كغم هي افضل المعاملات وكما يظهر في الجدول رقم (1).

د- اختبار التشوهات في رؤوس الحيامن

تظهر النتائج والموضحة بالشكل رقم (2) ان اعطاء الفئران العقار MTX قد احدث زيادة معنوية في نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن اذا ما قورنت مع نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن لمعاملة السيطرة السالبة (غير المعاملة)، حيث يلاحظ أنها كانت (2.87)% لمعاملة السيطرة السالبة وقد اصبحت (7.52)% نتيجة اعطاء الفئران العقار MTX (السيطرة الموجبة). واما ما يتعلق بتأثير تجريع الفئران تراكيز العسل ولمدة (7) ايام قبل اعطائها العقار MTX فيلاحظ في الشكل رقم (2) انه قد ادى الى خفض نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن معنوياً ($P<0.05$) بالمقارنة مع نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن والحاصلة بفعل اعطاء العقار لوحده. ويلاحظ في الجدول رقم (1) ان نسب الحماية التي احدثها العسل في خفض نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن كانت (95، 98، 97، 93)% للتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم على التوالي وكانت المعاملة بالتركيزين (300، 450) ملغم/كغم هي افضل المعاملات.

3- تأثير استعمال العسل بعد العقار MTX (تداخل)

أ- أختبار مؤشر الانقسام

يلاحظ في الشكل رقم (3) ان مؤشر الانقسام لخلايا نقي العظم قد انخفض معنوياً ($P<0.05$) نتيجة اعطاء الفئران العقار MTX وان تجريع الفئران تراكيز العسل بعد اعطائها العقار قد احدث زيادة في مؤشر الانقسام مقارنة بقيمة مؤشر الانقسام في حيوانات السيطرة الموجبة (اعطاء العقار لوحده). وان نسب الحماية التي احدثها استعمال العسل فكانت (38، 33، 40، 45)% للتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم وكانت المعاملة بالتركيزين (450، 600) ملغم/كغم هي افضل المعاملات.

واما ما يتعلق بمؤشر الانقسام للخلايا الجنسية فيلاحظ في الشكل رقم (3) ان اعطاء الفئران العقار MTX (السيطرة الموجبة) قد خفض مؤشر الانقسام معنوياً ($P<0.05$) مقارنة مع معاملة السيطرة السالبة، حيث كان مؤشر الانقسام (9.98)% واصبح (4.35)% بعد اعطاء الفئران العقار واما عند تجريع الفئران العسل بعد اعطائها العقار MTX فقد ادى الى خفض تأثير العقار في تثبيط الانقسام وخفض مؤشر الانقسام للخلايا الجنسية حيث ازدادت قيم مؤشر الانقسام معنوياً ($P<0.05$) وعند المعاملة بجميع التراكيز ويظهر من الجدول رقم (1) ان نسب الحماية التي احدثها استعمال العسل كانت (41، 57، 75، 68)% عند المعاملة بالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم على التوالي وكانت المعاملة بالتركيزين (450، 600) ملغم/كغم هي افضل المعاملات.

ب- اختبار التغيرات الكروموسومية

يلاحظ في الشكل رقم (3) ان تجريع الفئران تراكيز العسل بعد اعطائها العقار MTX قد ادى الى خفض النسبة المئوية لظهور التغيرات الكروموسومية معنوياً ($P<0.05$) عند المقارنة بنسبة ظهورها عند اعطاء الفئران العقار MTX لوحدة (السيطرة الموجبة) حيث يلاحظ ان نسبة التغيرات الكروموسومية لحيوانات السيطرة

السالبة (غير المعاملة) كانت (0.30)% وقد اصبحت بعد اعطائها الفئران العقار MTX (10.21)% وعند استعمال تراكيز العسل (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم بعد اعطاء الفئران العقار MTX فقد اصبحت النسبة المئوية لظهور التغيرات الكروموسومية (7.00، 6.32، 5.95، 5.90)% على التوالي ويظهر من الجدول رقم (1) ان نسب الحماية التي احدثها العسل كانت (32، 39، 42، 43)% للتراكيز (150، 300، 450، 600)% على التوالي وكانت المعاملة بالتركيزين (450 ، 600) ملغم/كغم هي افضل المعاملات.

ج- اختبار تكوين النوى الصغيرة

اظهرت النتائج وكما يظهر في الشكل رقم (3) ان تجريع الفئران تراكيز العسل بعد اعطائها العقار MTX قد ادى الى خفض النسبة المئوية لتكوين النوى الصغيرة معنوياً ($P>0.05$) عدا المعاملة بالتركيز (150) ملغم/كغم حيث كان الانخفاض غير معنوياً ($P<0.05$). ويلاحظ ان نسبة تكوين النوى الصغيرة في حيوانات السيطرة السالبة كانت (3.25)% وعند اعطاء العقار MTX أصبحت (20.80)% وعند تجريعها العسل بعد اعطائها العقار وبالتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم فقد اصبحت (19.50، 16.82، 16.75، 10.72)% على التوالي وان نسب الحماية التي احدثها العسل للتراكيز اعلاه كانت (07، 22، 57، 57)% على التوالي وكانت المعاملة بالتركيزين (450، 600) ملغم/كغم هي افضل المعاملات.

د- اختبار التشوهات في رؤوس الحيامن

ان تجريع الفئران لعقار MTX وكما يظهر في الشكل رقم (3) قد ادى الى زيادة نسبة ظهور التشوهات في رؤوس الحيامن معنوياً ($P<0.05$) مقارنة بحيوانات السيطرة السالبة. واما ما يتعلق بالتداخل بين العسل وعقار MTX فقد ادى تجريع الفئران تراكيز العسل بعد اعطائها العقار MTX الى ارتفاع نسبة ظهور التشوهات في رؤوس الحيامن الا انها اقل معنوياً ($P<0.05$) اذا ما قورنت بالسيطرة الموجبة (اعطاء العقار لوحده). وان نسب الحماية التي احدثها العسل وكما يلاحظ في الجدول رقم (1) فقد كانت (15، 13، 40، 41)% لتراكيز (150، 300، 450، 600) ملغم/كغم على التوالي وان المعاملة بالتركيزين (450، 600) ملغم/كغم كانت افضل المعاملات.

المناقشة

اظهرت التحليلات الاحصائية لنتائج الدراسة الحالية انعدام التأثيرات السمية والتطفيرية للعسل وللتراكيز قيد الدراسة، حيث يلاحظ (شكل رقم 1) ان تجريع الفئران العسل وللتراكيز كافة لم يقلل قيم مؤشر الانقسام للخلايا الجنسية وخلايا نقي العظام، كما ولم يكون له تأثيراً معنوياً في استحثاث ظهور التغيرات الكروموسومية او في زيادة تكوين النوى الصغيرة ولم يؤد ايضاً الى زيادة نسبة التشوهات في رؤوس الحيامن وهذه النتائج تتفق مع ما وجده البديري (2002) وحسن (2002) والربيعي (2006) حيث ان العسل لايعد من المواد ذات الفعل المطفر او المسرطن وكما وجد ايضاً ان تجريع العسل وبالتراكيز كافة (شكل رقم 1) قد احدث زيادة معنوية في قيم مؤشر الانقسام للخلايا الجسمية والجنسية وقد ادى الى خفض التردد التلقائي لتكوين النوى الصغيرة وخفض نسبة ظهور التغيرات الكروموسومية ويمكن ان يعزى تأثير العسل في زيادة مؤشر الانقسام الى انه ربما يحتوي مواد محفزة (mitogens) للانقسام الخلوي او الى احتواء العسل على مستخلصات الرحيق الزهري (1993 ، White) والتي ربما يعزى لها التأثير في خفض نسبة تكوين النوى الصغيرة والتغيرات الكروموسومية (حسن، 2002) حيث وجد ان لنباتي حبة البركة ونومي بصرة تأثيراً مشابهاً في خفض النسبة المئوية لتكوين النوى الصغيرة والتغيرات الكروموسومية وكما وجد البديري (2002) ان مستخلصات التمر الزهدي لها نفس التأثير.

ويمكن ايضاً ان يعزى تأثير العسل في خفض نسبة تكوين النوى الصغيرة او في خفض نسبة استحثاث ظهور التغيرات الكروموسومية الى ان العسل ربما يحتوي على مركبات كيميائية تعمل على زيادة فعالية الانزيمات المزيلة للسمية حيث وجد الربيعي (2008) ان العسل يزيد من فعالية الانزيم Glutathione Reductase والذي يساعد في الاكسدة التحويلية وينشط انقسام ونمو الخلايا (Meister ، 1988) حيث يعمل هذا الانزيم على توليد الكلوتاثيون بشكلهِ الفعال من الشكل غير الفعال حيث يدخل الكلوتاثيون في تكوين الانزيمات Glutathione Peroxidase وانزيم Glutathione-S-transferase المضاد للاكسدة ويعمل الكلوتاثيون على تثبيط تكوين الجذور الحرة (Struznk *et al* , 2005).

كما يلاحظ ان اعطاء الفئران العقار MTX قد ادى الى خفض قيم مؤشر الانقسام ولخلايا نقي العظم والخلايا الجنسية معنوياً (شكل رقم 2،3) كما ادى الى احداث زيادة معنوية في معدل ظهور التغيرات الكروموسومية وزيادة في التردد التلقائي لتكوين النوى الصغيرة وفي زيادة استحثاث ظهور التشوهات في رؤوس الحيامن وهذه النتائج تتفق مع ماوجدهُ حسن (2002) و (Maskaleis *et al* , 1998) ويمكن ان يعزى تأثير العقار MTX الى قابلية العقار في التداخل مع المادة الوراثية حيث تكون السبب في ظهور التأثيرات السمية والتطفيرية وقد اشار الباحث Huennkens (1994) ان هذا العقار يؤدي الى نقص في انزيم (Dihydrofolate reductase) الذي يعد المفتاح الرئيس في عملية نمو انقسام الخلايا كما وأنه يؤدي الى نفاذ النيوكليوتيدات (Nucleotides) الداخلة في بناء الـ DNA وهذا ما ينتج عنه توقف او عرقلة عملية اصلاح التلف الحاصل في جزئية الـ DNA حيث اشار Johnston وآخرون (2005) ان الميثوتركسيت يؤثر في تثبيط عمل الانزيمات التي تتحكم في ايض البيورين مما يؤدي الى تراكم الادينوسين بالاضافة الى حدوث تلف في الجزيئة نفسها (Borchers *et al* , 1990) وهذا التلف سيعود بالنتيجة الى حدوث تغيرات كرموسومية وتكوين نوى صغيرة (Kasahara *et al* , 1992) او ربما للعقار القدرة في احداث طفرات في الجين المسؤول عن شكل رؤوس النطف وبالتالي الى انتاج نطف مشوهة.

اما ما يتعلق بين تراكيز العسل وللعقار MTX (شكل رقم 2) و (شكل رقم 3). ومن خلال ملاحظة قيم مؤشر الانقسام الخيطي للخلايا الجسمية والجنسية فيلاحظ ان هناك فروقاً معنوية ظهرت بين اعطاء العقار MTX لوحدة وبين تجريع الفئران تراكيز العسل قبل او بعد اعطاء العقار، وهذا ما يظهر جلياً من خلال الجدول (رقم 1) حيث نلاحظ نسب الحماية التي احدثها استعمال العسل من حماية الخلايا من حدوث التغيرات الكرموسومية ومن تكوين النوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس الحيامن التي يسببها اعطاء العقار ويظهران لتراكيز العسل دوراً مهماً في تثبيط الفعل السمي والتطفيري للعقار MTX ويمكن ان يعزى تأثير العسل هذا الى أنه يساعد في افراز مادة الكلوتاثيون Glutathione (الباشا ، 1983) او في زيادة فعالية الانزيم Glutathione Reductase (الربيعي ، 2008) المسؤول عن تكوين الكلوتاثيون بشكله الفعال وان الكلوتاثيون يعد من المكونات الخلوية التي تلعب دوراً مهماً في آلية الدفاع عن الخلية ضد المواد السامة ويكون عمل الكلوتاثيون من خلال تكوين اتحادات مع المركبات الغربية (Hayatsu *et al* , 1988) ويمكن للكلوتاثيون ان يعمل عمل المواد المحبة للنواة Nucleophils والتي تتنافس مع الـ DNA في التفاعل الكيميائي مع المطفرات المحبة للالكترونات Electrophils (Deflora and Ramel , 1988). وقد يعزى تأثير العسل الى احتواءه على العديد من المركبات السكرية والبروتينية والفيتامينات والانزيمات والمعادن وغيرها من المواد (White , 1979) وان هذه المواد تلعب دوراً فعالاً في تثبيط الطفرة الوراثية وتقليل دورها. ويمكن ان يعزى تأثير العسل الى احتواءه فيتامين (C) والمعروف ان فيتامين (C) يمتلك القدرة على تثبيط فعل عدد كبير من المطفرات الكيميائية

والفيزيائية (Deflora and Ramel , 1988) وقد بين Alokperov (1982) ان فيتامين (C) يعد مثبطاً عاماً للطفرات، حيث يعتقد انه يقوم بغلق المواقع الحساسة في الـ DNA عن طريق الالتصاق بها ومنع المطفر من الارتباط بها (Mita *et al* ,1982). او قد يزى السبب الى احتواء العسل على الفلافونيد Flavonoides حيث يمتلك خاصة تثبيطية تجاه بعض المطفرات الكيميائية وله القدرة على تقليل الكسور في اشرطة الـ DNA (Miski *et al* , 1983) كما ان للفلافونيد التأثير في زيادة فعالية الانزيم GST والذي يمتلك تأثيرات مثبطة للفعل السمي والمسرطن لبعض المواد.

يلاحظ من الشكل رقم (1) والشكل رقم (2) والجدول رقم (1) ان هنالك تبايناً في تأثير العسل في حالة اعطاءه قبل العقار MTX او بعده وقد تبين ان الكفاءة التثبيطية للعسل تجاه هذا العقار كانت اعلى كفاءة عند اعطاءه قبل العقار مقارنة بحالة اعطاءه بعد العقار كما ويختلف التركيز الامثل المؤثر في الحالتين وهذا يعزى الى ان عمل المواد المثبطة للمطفرات يعتمد على المرحلة التي تؤدي من خلالها هذه المواد عملها او فعلها (Alekperov , 1984 ; Alekperov , 1982) لذا يمكن ان يوصف العسل بانه عاملاً مضاداً لتطفير خارج الخلية Desmutagen بالمرتبة الاولى ويكون في المرتبة الثانية عاملاً مضاداً للتطفير داخل الخلية Bioantimutagen وهذا يتفق مع ما وجده البديري (2002) والربيعي (2006). حيث يمكن ان تكون ألية العسل بالدرجة الاولى اما منع التنشيط التأيضي (Metabolic activation) للعقار MTX او من خلال منع العقار او متأيضاته من الارتباط مع المواقع المستهدفة من الـ DNA او من خلال تنشيط الانزيمات المزيلة للسمية او من خلال تكوين معقدات مع العقار او متأيضاته ومنعه من دخول الخلية او تكون في الدرجة الثانية في تنشيط انظمة اصلاح الـ DNA.

الاستنتاجات

1- ليس لتراكيز العسل قيد الدراسة أي تأثيرات سمية او تطفيرية وفعالية العسل غير مرتبطة بزيادة التركيز.
2- يمتلك عقار MTX القدرة على تثبيط الانقسام وفي كلا النوعين من الخلايا وله القدرة في استحثاث ظهور التغيرات الكرموسومية والنوى الصغيرة واستحثاث ظهور التشوهات في رؤوس الحيامن.
3- تمتلك تراكيز العسل خصائص مضادة للتطفير من خلال تثبيط الفعل التطفيري للعقار MTX عند استعمالها قبل او بعد العقار.
4- يعد العسل من المثبطات التي تعمل خارج الخلية بالدرجة الاولى وداخل الخلية بالدرجة الثانية.

المصادر

الباشا، محمد خليل، (1983)، موسوعة في علم النحل، الطبقة الاولى مطبعة الدار العربية للموسوعات.

البديري، نضال عبد الحسين (2002)، دراسة قابلية العسل ومستخلصات التمر الزهدي في تثبيط التأثيرات الوراثية الخلوية والدموية لأشعة كاما في الفئران البيض، رسالة ماجستير، جامعة الكوفة.

الربيعي، عباس حسين مغير (2001)، تثبيط الاثر التطفيري للمايتومايسين- سي- باستخدام مستخلصات الثوم في الفأر الابيض *Mus Musculus*، مجلة جامعة بابل، المجلد (6)، العدد (3): 795-803.

الربيعي، عباس حسين مغير (2006)، تأثير العسل الطبيعي في تثبيط الأثر التطفيري لعقار المايتومايسين – سي- في الفئران البيض، مجلة جامعة بابل، المجلد (13) العدد (3): 500-510.

الربيعي، عباس حسينى مغير (2008)، تأثير العسل الطبيعي والمايتومايسين-سي- على فعالية انزيم الكلوتاثيون المختزل Glutathione Reductase في الفئران البيضاء *Mus Musculus*. مجلة جامعة بابل، المجلد (15) العدد (4): 1385-1391.

حسن، مفيد قائد احمد (2002)، تثبيط الأثر السمي الوراثي لبعض المسرطنات الكيميائية باستعمال مستخلصات نباتية، اطروحة دكتوراه، جامعة بابل.

خشيم، الصديق علي والشحروري، عبد الفتاح (1994)، نحل العسل الطبعة الاولى، الدار الجماهيرية للنشر والتوزيع، ليبيا.

Alekperov , V. (1984). Antimutagens: theoretical and Paracthcal aspect. Nauka , Moscow. 128 pp.

Alekperov, V. (1982), Antimutagens and the Problem of controlling the action of environment mutagens in: Sugimura, T. Kondo, S. and Takebe, H. (Eds) Environmental mutagens and Carcinogeng , Liss , New York , 361-368.

Allen , J.; Shuller, C. and Latt , S.A.C (1977). A simplified technique for in vivo analysis of SCE , using 5- Brdu tables. Cytogent. Cell Genet. 18 : 231-239.

Au, W.; Pathak , S.; Collie, C. and Hsu , T. (1978) Cytogenetic toxicity of gentian violet and crystal violet on mammalian Cell in vitro. Mutat. Res. 58 : 269-276.

Borcher, A.H.; Kennedy, K.A. and Straw, J.A. (1990). Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in Chinese hamster ovary Cell following exposure to ultra violet irradiation or ethyl methane sulfonate. Cancer Res. 50 : 1786-1789.

Carter, S.K. and Livingston, R.B. (1982). Drugs available to treat cancer. In : Carter, S.; Glatstein, R.B. (Eds). Principles of cancer treatment, McGraw-Hill, New York PP 111-145.

Deflora, S. and Ramal, G. (1988). Mechanism of inhbitor of mutagenesis and carcinogensis. Classificaton and overview. Mutat. Res. 202: 285-306.

Evans, E.P.; Breckon, G. and Ford, C.E. (164). An air drying method for meotic Preparation from mammalian testes. Cytogentics. 3: 284-294.

Harris, C.C (1976). The Carcinogenicty of anticancer drugs, Ahazan in mam. Cancer. 37: 1014-1032.

Hayatsu, H.; Arimito, S. and Negishi, T. (1988). Dietary inhibitors of mutagenesis and Carcinogenesis. Mutat. Res. 202: 429-446.

Huennekens, F.M. (1994). The methotrexate Story: a Paradigm For development of cancer chemotherapeutic agents. Adv. Enzyme. Regul. 34: 397-419.

Jensen, M.K. and Nyfors, A. (1979). Sytogenetic effect of methotrexate on human cells in vivo. Mutal. Res. 64: 339-343.

Johnston, A.; Gudjonsson, J.; Sigmundsdottir, H.; Ludviksson, B. and Valdimarsson, H. (2005). The anti-inflammatory action of MTX is not mediated by lymphocyte apoptosis, but the suppression of activation and adhesion molecules. Clin. Immunol. 114: 154-163.

Kada, T.; Sadaie, Y. and Hara, M. (1978). Analysis of mutagen- antimutagen reaction in food and food additives by rec-assay and reversion-assay and reversion-assay Procedures,. Mutat. Res. 53: 206-207.

Kasahara, Y.; Wakata, A. ; Nakai, Y. ; Yagi, K. ; Hirabayashi, K. and. Makita, T. (1992). Mechanism of induction of micronuclei and chromosome aberrations in mouse bone marrow by multiple treatment of methotrexate. Mutat. Res. 280: 117-128.

Maskaleris, T.; Lialiars, T. and Triantaphyllidis, C. (1998). Induction of Cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro and anti neoplastic effects in ehrlich

aseites tumor Cells in vivo treated by methotrexate, hyperthermia and/or Caffeine. Matat. Res, 422: 229-236.

Meister, A. (1988). Glutathione metabolism and it's Selective modification. J. Biol. Chem. 263 (33) : 17205-17208.

Miski, M. ; Ulubele, A. and Mabry, T. (1983) G-Hydroxy flavones from *Thymbra spicata*. Phytochemistry. 22: 2093-2094.

Mita, S.; Yamazo, Y.; Kamataki, T. and Kato, R. (1982) Effect of ascorbic acid and the nonenzymatic binding to DNA and the mutagenicity of N-hydroxylated metabolite to tryptophan phrolysis product. Biochem. Biophys. Res. Commun. 105: 1396-1401.

Rawat, A. ; Mehrotra, S. ; Tripothi, S. and Shome, V.(1997) Hepatoprotective actinity of *Boerhaavia diffusa.* roots. Apopular. Indian ethnomedicine. J. Ethno. 56: 61-66.

Schmid, W. (1975). The mieronuleus test. Mutat. Res. 31: 9-15.

Shubber, E.K. and Al-Allak, B.M. (1986). Spontaneou chromosomal aberrations and SCE, 1n human lymphocytes. Efects of culture Conditions. Nucleus. 29: 92-98.

Struznka, L.; Chalimoniuk, M. and Sulkowskti, G. (2005). The role of asteroglia in ph-exposed adul rat brain with respect to glutamate toxicity Toxicocology. 212 (2-3) : 185-194.

White, J.W. (1979). Composition of honey in (honey) A comprehensive Surey. Heinemann. London U.K. p.p: 157-206.

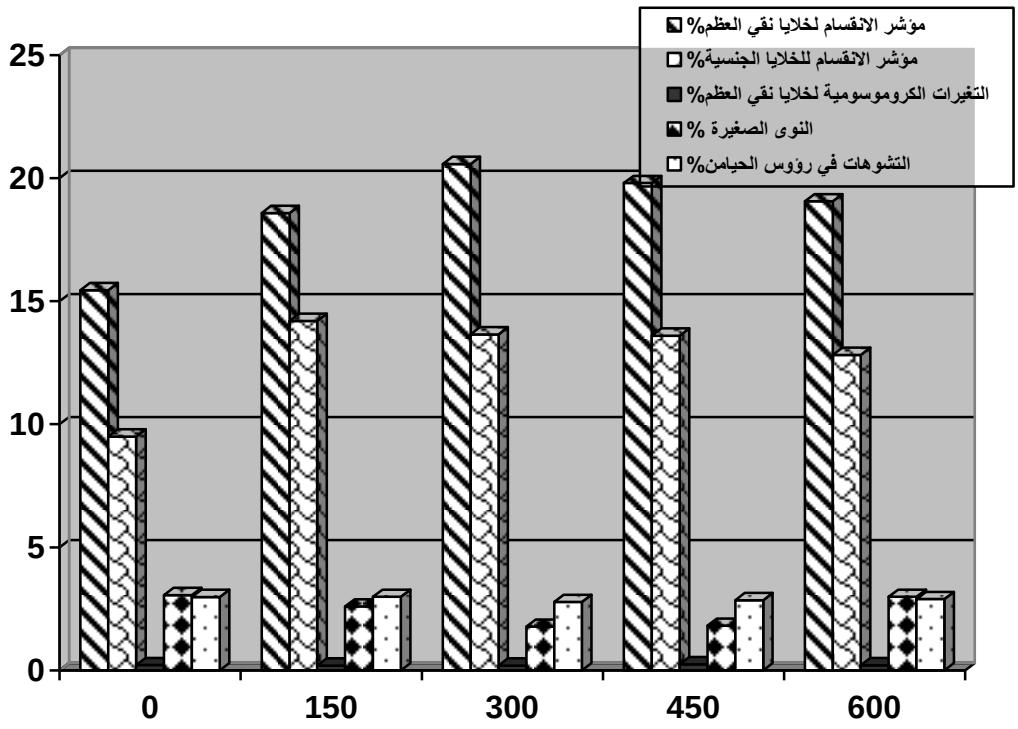
White, J.W. (1993). Honey. In the hive and honey bee Danat and sosinc. Hamilton. U.S.A. PP: 869-925.

Wyrobeck, A. and Bruce, W. (1975). Chemical induction of Sperm head abnormalities in mice. Proc. Nat. Acad. Sci. 72: 4425-4429.

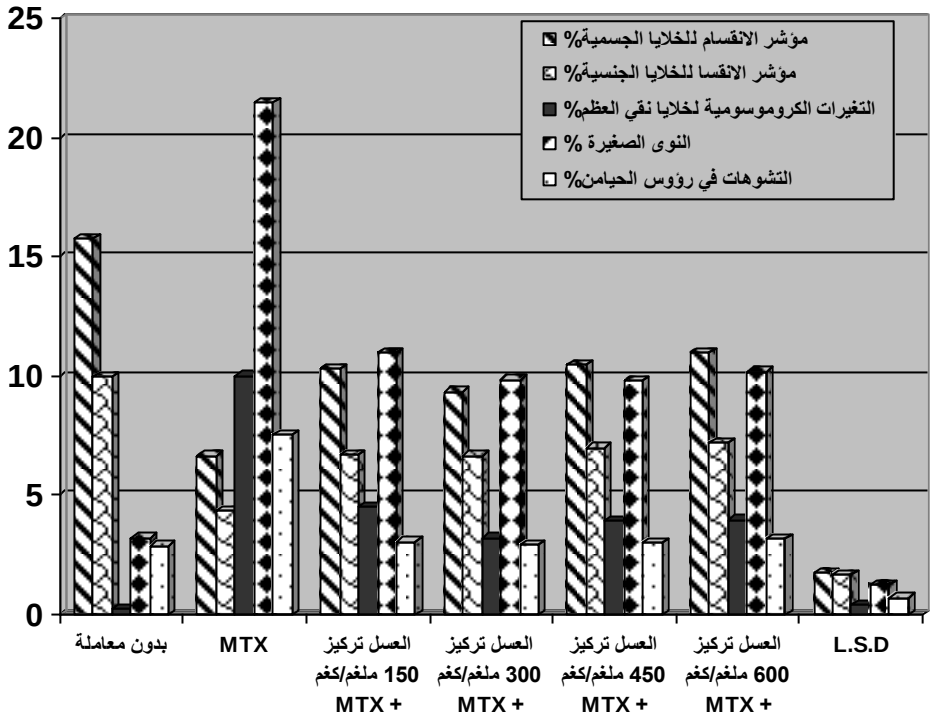
جدول رقم (1) يبين نسب الحماية التي يحدثها العسل عند استخدامه قبل وبعد الميثوتركسيت MTX

الاختبارات / المعاملة ملغم/كغم وزن الجسم		نسبة الحماية%				
		مؤشر الانقسام لخلايا نقي العظام	مؤشر الانقسام للخلايا الجنسية	التغيرات الكروموسومية	النوى الصغيرة	التشوهات في رؤوس الحيامن
العسل قبل الميثوتركسيت	150	40	41	56	57	95
	30	29	41	69	63	98
	450	42	47.0	62	63	97
	600	71	50.0	61	61	93

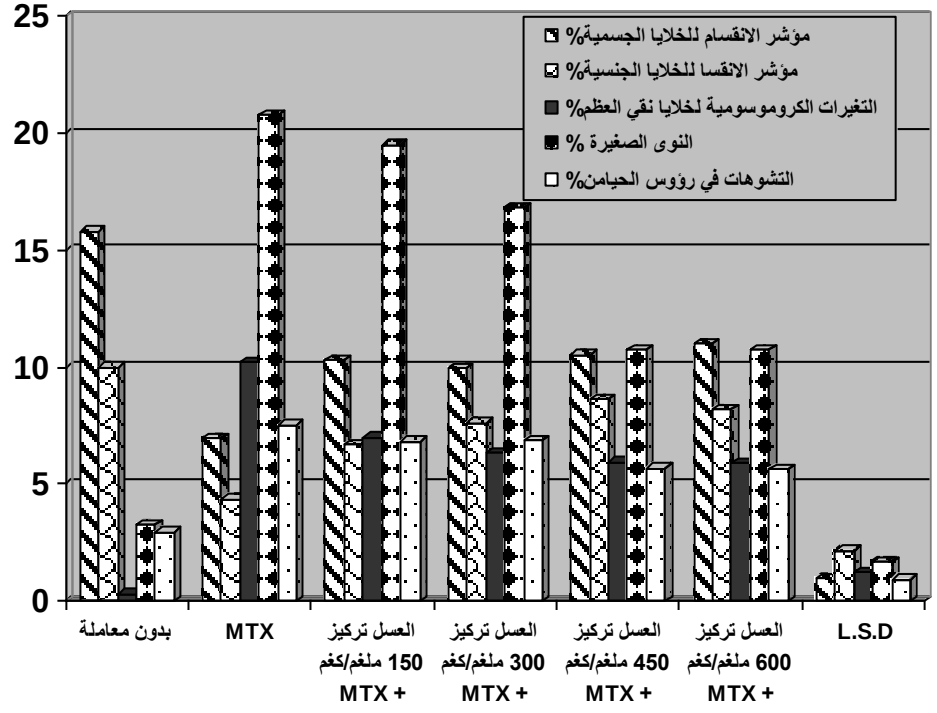
15	07	32	41	38	150	العسل بعد الميثوتركسيت
13	22	34	57	33	300	
40	57	42	75	40	450	
41	57	43	68	45	600	



شكل رقم (1) تأثير العسل الطبيعي على مؤشر الانقسام الخيطي والتغيرات الكروموسومية واستحثاث تكوين النوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس الحيامن للفئران البيض



شكل رقم (2) تأثير استعمال العسل الطبيعي قبل عقار الميثوتركسيت MTX على مؤشر الانقسام الخيطي والتغيرات الكروموسومية واستحثاث تكوين النوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس الحيامن للفئران البيض.



شكل رقم (3) تأثير استعمال العسل الطبيعي بعد عقار الميثوتركسيت MTX على مؤشر الانقسام الخيطي والتغيرات الكروموسومية واستحثاث تكوين النوى الصغيرة والتشوهات في رؤوس الحيامن للفئران البيض.