دراسة التغيرات الفسلجية والوراثية الخلوية للذكور المصابين بمرض السكري النوع الثاني باستخدام مؤشر دليل كتلة الجسم

كاظم جهيد الطائي و تيسير شمران الدريساوي

جامعة واسط / كلية العلوم / قسم علوم الحياة

Study of physiological and cytogenetic changes to males patients with diabetic mellitus type2 by used the body mass index.

Kadhum J. Gattia Tayseer Shamran Al-Deresawi

Department of Biology/ College of Science /University of Wasit

المستخلص

أجريت الدراسة على عشرين مريضاً من الذكور المصابين بمرض السكري (النوع الثاني) ,تراوحت اعمارهم من (30-75) سنة ثم تمت مقارنتهم مع مجموعة السيطرة التي شملت 12 شخصاً ,حيث تراوحت اعمارهم من (38-70) سنة. وتضمنت دراسة المعايير الكيموحيوية حيث شملت قياس مستويات كل من (الكوليسترول الكلي , الدهون الثلاثية , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة, البروتينات الدهنية عالية الكثافة , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً وقياس مستوى الهرمون الذكري التستوستيرون ,وتقدير الضرر الحاصل في الـ DNA , قياس النويات الدقيقة MN ودليل الانقسام الخلوي (MI) وتحليل المذنب Comet Assay في الخلايا اللمفاوية للمرضى والاصحاء , اظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاع معنوي $P< 0.05$ في مستوى كل من (الكوليسترول, الدهون الثلاثية, البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً) وانخفاض معنوي $P< 0.05$ بمستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة وهرمون التستوستيرون عند المقارنة مع الاصحاء ,وارتفاع معنوي $P< 0.05$ في كل من (MI , MN), وانخفاض غير معنوي في(NDI).وارتفاع معنوي $P<0.05$ في المعايير المستخدمة لقياس وتقدير نسبة الضرر الحاصل في جزيئة DNA بفحص المذنب لدى المرضى عند المقارنة بالأصحاء.

كلمات مفتاحية : مرض السكري , دليل الانقسام الخلوي , النويات الدقيقة , السمنة ,اللبتين ,تحليل المذنب .

Abstract

The study included 20 patients and have ranged in age from (30-75 years), compared with a control groups which included 12 individual, with ages have ranged from (38-70) years. The study investigate biochemical parameters included measuring the levels of each of (Total Cholesterol , Triglyceride , low-density lipoproteins, high density lipoproteins , lipoproteins very low density, and measuring hormone levels Testosterone, and estimate the damage in DNA and measuring the Micronucleus and Mitotic index and analysis of Comet Assay in lymphocytes for patients and control: The results of our study showed a high change ($P< 0.05$) in the level of each of (cholesterol, triglycerides , low-density lipoproteins , lipoproteins very low density , and the low significant ($P< 0.05$) level of high density lipoproteins and of the Testosterone hormone .The results showed a high significant ($P< 0.05$) in the Mitotic index and Micronucleus , appearance of numbers low in the

number the Nuclear division index, where results showed a high significant (P< 0.05) in damage to the DNA molecule by comet assay when compared with control group.

Key words: Diabetic mellitus, Mitotic index, Micronucleus, Obesity, leptin, Comet assay.

المقدمة

يعرف مرض السكري بأنه اضطراب في عملية أيض السكر Glucose metabolism الذي يؤدي الى ارتفاع مستوى سكر الكلوكوز في الدم بشكل غير طبيعي للأسباب مختلفة قد تكون نفسية او عضوية او بسبب الافراط في تناول السكريات او بسبب عوامل وراثية , يحدث نتيجة لوجود خلل في افراز هرمون الانسولين من البنكرياس(1), فقد تكون كمية الانسولين التي يفرزها اقل من المطلوب او يكون هنالك توقف تام عن انتاجه ويطلق على هذه الحالة بـ قصور الانسولين Insufficiency of Insulin او ان الكمية المفرزة كبيرة في بعض الحالات كالأفراد المصابين بالسمنة Obesity حيث تكون هناك مقاومة من انسجة وخلايا الجسم التي تعيق وظيفة الأنسولين ويطلق على هذه الحالة بـ مقاومة الأنسولين Insulin Resistance وفي الحالتين يكون سكر الكلوكوز غير قادر على دخول الخلايا مما يؤدي الى تراكمه في الدم وامكانية ظهوره في الادرار , مع مرور الوقت. ومع ازدياد تراكم الكلوكوز في الدم بدلاً من دخوله الى خلايا الجسم فانه يؤدي الى مضاعفات مزمنة وخطيره وتشمل أضراراً على المدى الطويل مثل العجز او الفشل في مختلف أجهزة الجسم (2),وكثيراً ما ترتبط مقاومة الانسولين باضطرابات الدهون والسمنة , تشير التجارب على الحيوانات وكذلك البيانات الوبائية إلى أن وجود البدانة وقلة النشاط البدني يمكن أن تسهم في مقاومة الأنسولين. يعتقد أن السمنة هي السبب الرئيس لمرض السكري النوع الثاني لدى الأشخاص الذين لديهم استعداد وراثي لهذا المرض (3). يسبب مرض السكري الكثير من التغيرات الفسلجية والهرمونية في جسم المريض ومنها اختلال نسبة الدهون الذي يعرف بـ Dyslipidemia مقروناً بارتفاع مستوى الكوليسترول والدهون الثلاثية Triglycerides مما يؤدي الى حدوث تغيرات في الاوعية الدموية (4). مرض السكري النوع الثاني هو اضطرابات ناتجة عن التفاعلات الوراثية والتأثيرات البيئية,وتلعب الوراثة دوراً مهماً في الإصابة بهذا المرض خصوصاً أولئك الذين لديهم أقارب يعانون من الدرجة الأولى ويزداد احتمال إصابتهم بالمرض بازدياد عدد الأقارب المصابين والتي تم ربطها في تطور مرض السكري النوع الثاني، لم يتم اكتشاف الطفرات المسببة للمرض (5) , الكثير من التقدم الذي أحرز مؤخراً في فهم الظواهر الجينية يعزى للتقنيات التي تسمح للباحثين لتحديد ضرر DNA وتسلسل الحمض النووي يسمح الكثير من هذه التقنيات لتطبيقها على كامل الجينوم . وتستخدم تقنية المذنب Comet assay لتحديد الضرر في جزيئة DNA في الخلايا اللمفاوية Lymphocytes اذا انها طريقة معقدة وحساسة للغاية تم استخدامها على نطاق واسع للكشف عن السمية الوراثية الكيميائية سواء في التجارب المختبرية او الحية (6).

المواد وطرائق العمل

تم أجراء هذا البحث في كلية العلوم /جامعة واسط بالتعاون مع مختبرات مستشفى الكرامة التعليمي, حيث تم جمع عينات الدم الوريدي من المرضى المشخصين والمسجلين في مركز السكري والغدد الصماء التابع الى مستشفى الزهراء التعليمي في محافظة واسط .

الاختبارات الكيموحيوية

يتم قياس المعاييرالكيموحيوية والتي تشمل الكوليسترول الكلي Total cholesterol,الدهون الثلاثية Triglyceride , HDL ,LDL بأستخدام جهاز محلّلِ الكيمياءِ الآليِ (Flexor XL) المجهز من قبل شركة Vital Scientific N.Vأوربية المنشأ. وثم تستخرج قيمة VLDL حسب معادلةِ { VLDL = TAG / 5 (mg/dL) } (7).

الاختبارات الهورمونية

تم تحديد مستوى هرمون Testosterone باستخدام جهاز mini Vietric Immuno Diagnostic Assay System ومختصره (Minividas) المجهز من قبل شركة Biomerieux الفرنسية المنشأ .

الفحوصات الوراثية الخلوية Cytogenetic Test (دليل الانقسام الخلويMitotic index , حساب النويات الدقيقة Micronucleus)

تم اختبار النويات الدقيقة حسب ماجاء به Fenech (8). اما في ما يخص دليل الانقسام الخلوي حسب ما عمل به Block(9).

زرع الدم Blood Culture

دليل الانقسام الخلوي Mitotic Index

نضيف الى الميديا Quantum PBL (6) قطرات (مايقارب 0,8 مل) من الدم المعامل بالهيبارين ,حيث يتم تحفيز الخلايا الليمفاوية بواسطة محفز الانقسام PHAللدخول في انقسام من تضاعف الحمض النووي DNA, وبعد 70 ساعة نضيف مادة مثبطة للانقسام وهي (محلول كولسيمايد Colcemid solution) للوسط الزرعي Culture وتسمى هذه المرحلة بـ توقف الانقسام Stop Mitosis في الطور الاستوائي Metaphase Stage .وبعدها يضاف محلول واطئ التوتر Hypotonic Solution (كلوريد البوتاسيوم KCL) ,ويضاف محلول مثبت Fixative solution وبعدها تصبغ بصبغة كمزاGiemsa stain, ثم ملاحظة الكروموسومات وتقيم الضرر .

تجربة النويات الدقيقة Micronucleus Experiment

استخدمت تجربة الانقسام السايتوبلازمي للنويات الدقيقة Cytokinesis Block Micronucleus Assay (CBMA) في خلايا الدمِّ اللمفاوية الخارجيةِ ,ان تجربة النويات الدقيقة خارج الجسم (vitro micronucleus in assay), حسب ماجاء به Fenech (8). الغرض من فحص النويات الدقيقة هو الكشف عن تلك العوامل التي تؤدي الى تحوير في تركيب الكروموسوم وتفريقها بطريقة تؤدي الى تشكيل النويات Micronuclei في الخلايا عند مرحلة الطور البيني Interphase phase.

ان مبدأ الاختبار يكون باضافة المحلول المثبط لحركة الخلايا Cytochalasin B الى الخلايا المستزرعة لمنع الانقسام السايتوبلازمي Cytokinesis في الخلايا المستزرعة , سوف يمكن Cytochalasin B الخلايا ان تنمو لفترة معقولة من الزمن وبالتالي سوف يسمح هذا للكروموسومات المتضرره من تشكيل النويات في الخلايا الثنائية او متعددة النوى في مرحلة الطور البيني .ثم يتم حصد الخلايا وتلوينها وفحصها مجهرياً للكشف عن النويات micronuclei . ويتم حصد الخلايا Cell harvest بناءاً على ماجاء به Micale (10), بعد انتهاء مدة حضن الانابيب يتم حصاد الخلايا بطرد انابيب الزرع مركزياً بواسطة Centrifuge بسرعة (4000) دورة/ دقيقة ولمدة 10 دقائق , يزال الرائق ويضاف محلول واطئ التوتر (KCl) البارد وبعدها تحضن انابيب لمدة 35 دقيقة بدرجة 37مْ . تطرد أنابيب الزرع مركزياً ويزال الرائق تم يضاف 5مل من محلول المثبّت Fixative solution البارد والمحضر أنياً , يتم تقطير (7-8) قطرات من عالق الخلايا لكل شريحة زجاجية , وكان التقطير من ارتفاع (165سم) تقريباً ليتم تثبيت الخلايا والتصاقها بالشريحة بشكل جيد ثم صبغت الشرائح بصبغة كمزا Giemsa stain.

فحص الشرائح

في تجربة دليل الانقسام الخلوي (MI) Mitotic index فُحِصتْ الشرائح بالمجهرِ الخفيفِ بالتكبيرِ (40 X)، و(100 X) وتم حساب الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة وحساب النسبة المئويةَ (خلايا طور الاستوائي Metaphase) طبقاً للمعادلة(11)ادناه:-

$$\text{دليل الانقسام (MI)} = \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{عدد الخلايا المنقسمة وغير المنقسمة(١٠٠٠ خلية)}} \times ١٠٠$$

وتم حساب النويات الدقيقة MN ودليل الانقسام الخلوي NDI طبقاً للمعادلات ادناه وفقاً لماجاء به Lamberti واخرون (12).

$$NDI= \{1(M1\%) +2(M2\%) +3(M3\%) +4(M4\%)\} / N$$

$$MN= \{1(MN1) +2(MN2) +3(MN3) +4(MN4)\} / N$$

NDI = معدل الانقسام النووي ، **M**، 1، 2، 3، 4 = عدد نويات الخلايا , **MN** ، 1، 2، 3، 4 = عدد النواة الصغرى في الخلايا , **N** = العدد الكلي للخلايا

تقنية تحليل المذنب

تجربة مذنبِ قلويةِ

اجري فحص الترحيل الكهربائي الهلامي (فحص المذنب) DNA gel electrophoresis(comet assay) للعينات المدروسة حسب طريقة Klaude واخرون (13).وهو يشتمل على تغليف الخلايا بمادة LMAgarose ذات درجة ذوبان منخفضة ومن ثم تحلل الخلايا في ظروف قاعدية (pH>13) و بعدها اجراء الترحيل الكهربائي . ثم يحلل DNA المصبغ لتحديد الضررDNA .وهذا يمكن ان يحسب يدويا أو اوتوماتيكيا بواسطة برنامج على الحاسوب . تجربة المذنب تحسب أبعاد الخلية والمعايير او المؤشرات تلقائياً .وتتضمن المجهر المتفلور Fluorescence Microscope ،الكاميرا وحزمة تحليل الكمبيوتر. في هذة التجربة تم تحديد معدل طول الذيل Mean Tail length ومعدل حركة الذيل Mean Tail Moment والنسبة المئوية لذيل الحمض النووي (%) Tail in DNA في الخلايا اللمفاوية لمرضى السكري النوع الثاني بواسطة برنامج تحليل الصورCometScore

التحليل الاحصائي

تم تحليل النتائج احصائياً باستخدام البرنامج SPSS 13 (Statistical Package for Social) لغرض معرفة الفروق المعنوية بين المرضى والاصحاء لمختلف فئات الاعمار والاوزان باستعمال اختبار (LSD) Least significant difference, أقل فرق معنوي بين المتوسطات المدروسة بمستوى احتمال 0,05 (P< 0,05) (14).

النتائج

بينت النتائج (جدول 1) ارتفاع معنوي P<0.05 لجميع المعايير (الكوليسترول , الدهون الثلاثية T.G , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً VLDL) لجميع فئات كتلة الجسم (BMI) , باستثناء انخفاض الكوليسترول وLDL في فئــة كتلة الجسم الثالثــة (27-29.9) حيث بلغ مستوى الكولسترول (151.60±14.62 ملغم/دسم و 172.40±16.55 ملغم/دسم) و مستوى LDL (93.70±10.14 ملغم/دسم و 103.60±6.80 ملغم/دسم) , وانخفاض LDL في فئة كتلة جسم الاولى (اصغر من 25) حيث بلغت (101.62±10.66 ملغم/دسم و 113.60±4.22 ملغم/دسم) المرضى والاصحاء على التوالي, في حين ظهر انخفاض معنوي ورقمي للبروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL (الكوليسترول المفيد) لجميع المرضى ولجميع فئات دليل كتلة الجسم المختلفة مقارنة بالأصحاء. وعند مقارنة فئات دليل كتلة الجسم المختلفة والمصنفة عالمياً , تبين ان الفئة العمرية الثانية (25-26.9) والفئة الرابعة (اكبر او تساوي 30) تزداد معنوياً P<0.05 ورقمياً عن الفئة الاولى (اصغر من 25) ,اما فئة كتلة الجسم الثالثة (27-29.9) تبين انها تقل رقمياً عن فئة كتلة الجسم الاولى (اصغر من 25) لجميع المعايير المدروسة للمصابين بمرض السكري النوع الثاني .اما في الاصحاء تبين انه لا توجد اختلافات معنوية بين مختلف فئات دليل كتلة الجسم (BMI) لجميع المعايير المدروسة .

جدول (1): معدل التغيرات الكيميوحيوية في دم الذكور المصابين بالسكري النوع الثاني موزعه حسب دليل كتلة الجسم BMI .

BMI / Parameters		الفئة الاولى (اصغر من25)	الفئة الثانية (25-26.9)	الفئة الثالثة (27-29.9)	الفئة الرابعة (اكبر او تساوي 30)	اقل فرق معنوي LSD
Cholesterol (mean±SD)	Patients	A,a 168.00±12.08	B,a 203.60±6.11	C,a 151.60±14.62	D,a 219.40±13.46	13.25
	Control	A,b 136.40±29.81	A,b 142.00±24.54	AB,b 172.40±16.55	A,b 157.60±23.09	26.36
T.G. (mean±SD)	Patients	AB,a 222.00±31.60	A,a 256.80±32.00	B,a 217.00±12.19	C,a 169.20±14.46	26.84
	Control	A,b 81.80±11.69	A,b 78.80±12.40	A,b 89.00±3.94	AB,b 73.40±11.41	11.48
HDL (mean±SD)	Patients	A,a 32.320±6.771	A,a 29.480±6.971	A,a 29.760±5.993	A,a 31.880±9.735	8.25
	Control	A,a 32.460±8.199	AB,b 43.000±8.155	A,a 36.440±3.958	AB,b 40.300±6.014	7.49
LDL (mean±SD)	Patients	AB,a 101.62±10.66	A,a 128.20±24.95	B,a 93.70±10.14	A,a 128.02±17.09	18.51
	Control	A,a 113.60±4.22	BC,b 93.20±7.63	B,a 103.60±6.80	C,b 87.80±6.83	7.14
VLDL (mean±SD)	Patients	A,a 43.640±8.425	A,a 48.680±8.654	A,a 43.160±8.805	A,a 39.920±11.947	10.52
	Control	A,b 16.340±2.319	A,b 15.760±2.480	A,b 16.980±1.443	A,b 14.540±2.197	2.36

* المتوسطات التي تحمل الحروف الكبيرة المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي P<0.05 بين فئات كتلة الجسم المختلفة .

* المتوسطات التي تحمل الحروف الصغيرة المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي P<0.05 بين المرضى والاصحاء (عمودياً) لكل معيار.

بينت النتائج ان لكتلة الجسم تاثير واضح وكبير على تركيز هذا الهرمون الذكري حيث كانت نتائج التحليل الاحصائي تشير الى وجود فرق معنوي P<0.05 واضح لجميع فئات كتلة الجسم وهي : الاولى (اقل من 25) والثانية

(25-26.9) والثالثة (27-29.9) والرابعة (اكبر او تساوي 30) للذكور المصابين بمرض السكري النوع الثاني مقارنة بالأصحاء , بينما يتلاشى هذا الفرق المعنوي في حالة مقارنة فئات دليل كتلة الجسم (BMI) المختلفة فيما بينهما ولا يوجد لكتلة الجسم اي تاثير على تركيز الهرمون الذكري Testosterone سواء كـان في المرضى او الاصحاء (جدول 2) .

جدول (2): معدل تركيز الهرمون الذكري Testosterone في الذكور المصابين بالسكري النوع الثاني مقارنة مع الاصحاء موزعين حسب دليل كتلة الجسم BMI.

Testosterone (ng/ml) (mean±SD)		Parameters / BMI
Patients	Controls	
A,a 5.3060±1.1843	A,b 9.460±0.627	الفئة الاولى (اصغر من 25)
A,a 3.4220±0.4088	A,b 9.500±0.908	الفئة الثانية 25-26.9
A,a 4.0800±0.7791	A,b 9.220±0.550	الفئة الثالثة 27-29.9
A,a 6.1200±0.7463	A,b 8.760±0.532	الفئة الرابعة (اكبر او تساوي30)
0.909	0.739	اقل فرق معنوي (LSD)

* المتوسطات التي تحمل حروف كبيره مختلفة تشير الى وجود فرق معنوي $P<0.05$ عمودياً .

* المتوسطات التي تحمل حروف صغيره مختلفة تشير الى وجود فرق معنوي $P<0.05$ افقياً .

عند استعراض نتائج دليل كتلة الجسم (BMI) وتأثيرها على ظهور الصفات الوراثية المدروسة (جدول 3) تبين ان لدليل كتلة الجسم تاثير واضح بين المـرضى والاصحاء فـي صفة دليل الانقسام الخلـوي Mitotic index (MI) و وتردد النويات الدقيقة Micronucleus (MN) وكان الفرق معنوي $P<0.05$واضح وجلي لجميع فئات كتلة الجسم المختلفة باستثناء الفئة الاخيرة (الرابعة) لكتلة الجسم (اكبر او تساوي 30) في صفة تردد النويات الدقيقة MN ,وظهر انخفاض رقمي في صفة دليل الانقسام النووي Nuclear division index (NDI) بين المرضى والاصحاء ,وعند مقارنة فئات دليل كتلة الجسم (BMI) الاربعة المختلفة فيما بينهما في نفس الجدول اعلاه تبين انه لا يوجد اختلاف معنوي في المرضى الذكور المصابين بالسكري النوع الثاني مصنفين حسب دليل كتلة الجسم المختلفة لجميع الصفات المدروسة (MI, NDI , MN) .

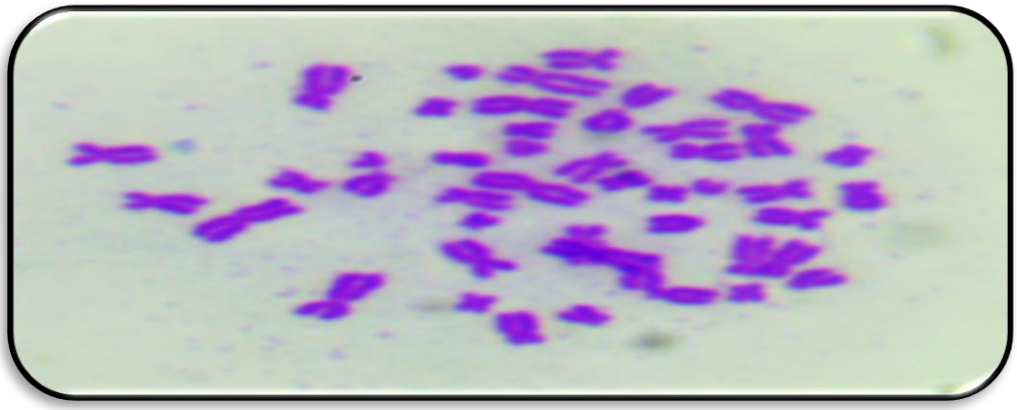
جدول (3): معدل التغيرات الخلوية الوراثية في الذكور المصابين بالسكري النوع الثاني مقارنة مع الاصحاء موزعين حسب دليل كتلة الجسم BMI.

MI (mean±SD)	NDI (mean±SD)	MN (mean±SD)	Parameters

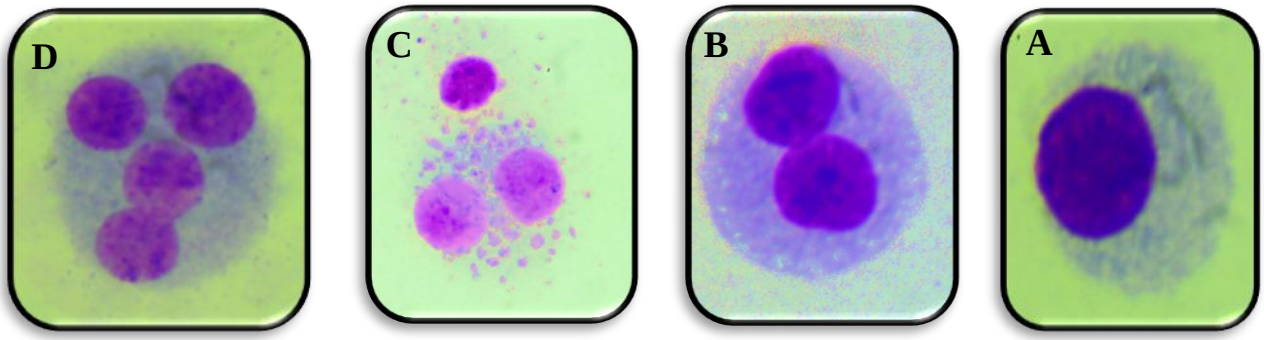
Patients	Control	Patients	Control	Patients	Control	
A,a 13.040+1.422	AB,b 1.460+0.181	A,a 2.149+0.482	A,a 2.274+0.389	A,a 0.294+0.053	A,b 0.163+0.044	الفئة الاولى (اصغر من 25)
A,a 12.720+0.763	A,b 1.500+0.158	A,a 2.069+0.495	A,b 2.610+0.438	A,a 0.308+0.086	A,b 0.162+0.074	الفئة الثانية 26.9-25
A,a 13.240+1.006	B,b 1.136+0.198	A,a 1.782+0.292	AB,a 1.894+0.322	A,a 0.300+0.041	A,b 0.159+0.086	الفئة الثالثة 29.9-27
A,a 12.400+0.566	A,b 1.620+0.238	AB,a 2.344+0.579	A,a 2.533+0.648	AB,a 0.240+0.050	B,a 0.235+0.063	الفئة الرابعة (اكبر او تساوي30)
1.09	0.216	0.522	0.644	0.066	0.034	اقل فرق معنوي LSD

* المتوسطات التي تحمل الحروف الكبيرة المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالي $P<0.05$ عمودياً

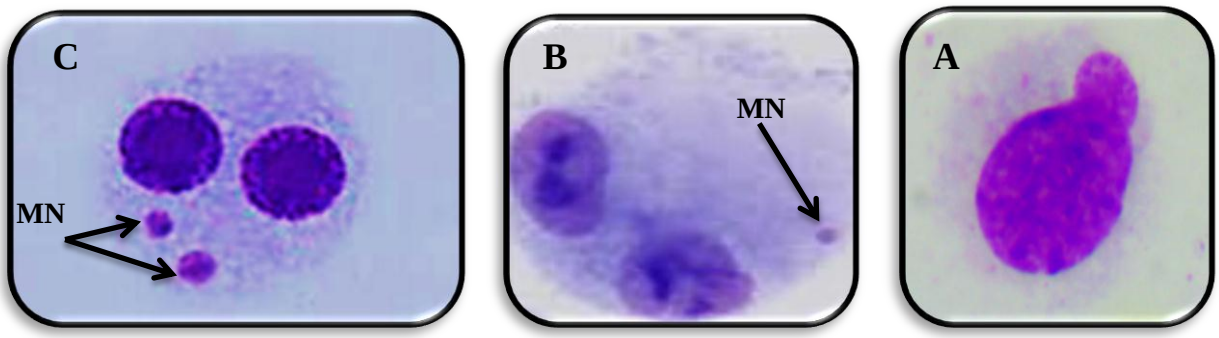
* المتوسطات التي تحمل الحروف الصغيرة المختلفة تشير الى وجود فرق معنوي عند مستوى احتمالي $P<0.05$ بين المرضى والاصحاء لنفس الصفة.



شكل (1): الهيئة الكروموسومية في خلايا الدم اللمفاوية في المصابين بمرض السكري النوع الثاني DMT2 ملونة بصبغة كمزا Giemsa Stain تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير (X100).



شكل (2): دليل الانقسام النووي (NDI) في خلايا الدم اللمفاوية لمرضى السكري النوع الثاني DMT2 ملونة بصبغة كمزا Giemsa Stain, تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير (X100). (A) : خلية لمفاوية احادية النواة mononucleated , (B) : خلية لمفاوية ثنائية النواة binucleated, (C) : خلية لمفاوية ثلاثية النواة trinucleated , (D) : خلية لمفاوية رباعية النواة tetranucleated .



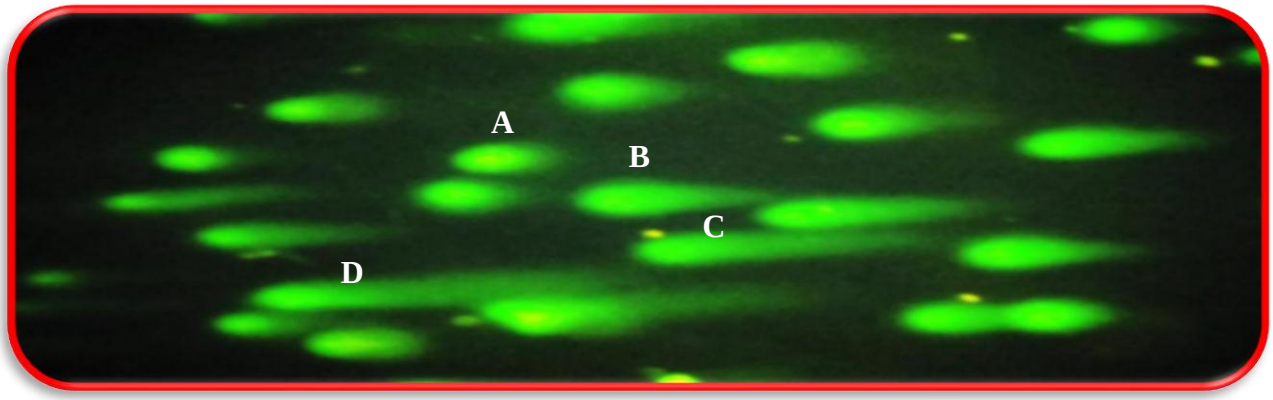
شكل (3): النويات الدقيقة (MN) في خلايا الدم اللمفاوية لمرضى السكري النوع الثاني DMT2 ملونة بصبغة كمزا Giemsa Stain, تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير (X100).وتشير الاسهم الى النويات الدقيقة Micronucleus (MN) . (A): خلية لمفاوية بدون (MN) . (B) : نوية دقيقة (MN) في الخلية اللمفاوية . (C) : نويتين صغيرتين (MN) في خلية الدم اللمفاوية .

أشارت النتائج في (جدول 4) الى وجود ارتفاع معنوي $P<0.05$ في المعايير المستخدمة لقياس وتقدير نسبة الضرر الحاصل في جزيئة DNA في خلايا الدم اللمفاوية لمرضى السكري النوع الثاني وهي (معدل حركة الذيل Tail Mean Moment والنسبة المئوية لذيل الحامض النووي (%) Tail in DNA وطول الذيل (Tail Length (Px) ، واظهرت النتائج في نفس الجدول ارتفاع معنوي $P<0.05$ بحجم الضرر الحاصل لجزيئة DNA عند تحليل النتائج وفق اسلوب يدوي بحساب حجم الضرر في الخلية بتسجيل المذنبات وتقسيمها الى فئات(عديمة الضررNo Damage و قليلة الضرر Low Damage ومتوسطة الضرر Medium Damage و عالية الضرر High Damage) عند المقارنة مع الاصحاء .

جدول (4): معدل التغيرات الحاصلة في الـ DNA للمرضى المصابين بالسكري النوع الثاني في اختبار قياس المذنب Comet assay مقارنة مع الاصحاء.

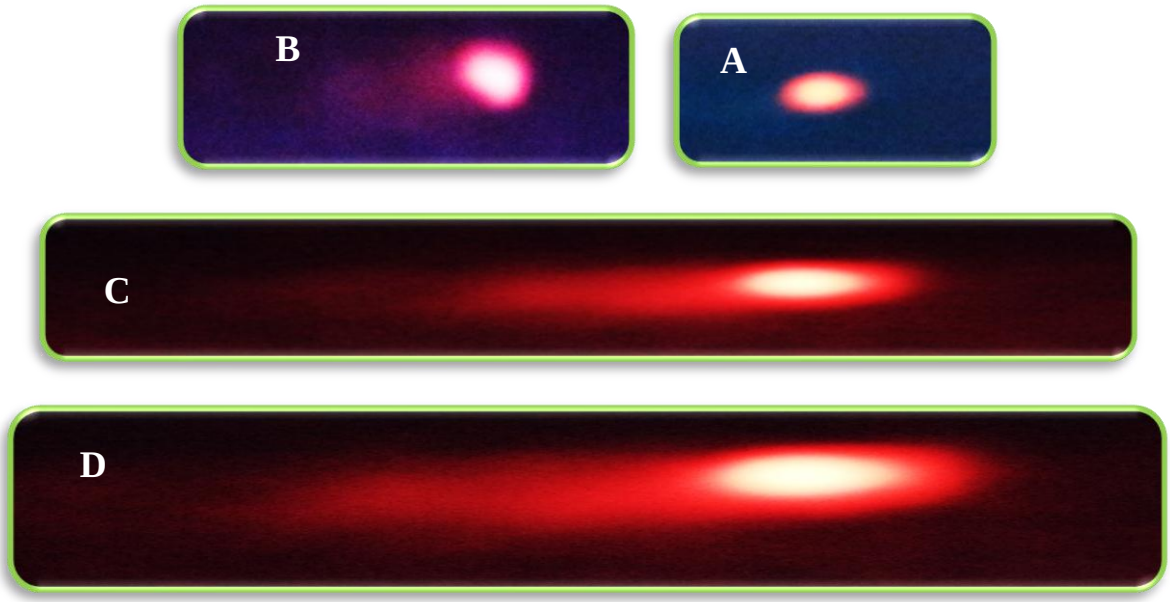
Comet assay test		Treatments / Parameter
Control	Patients	
B 7.64+1.75	A 25.36+3.27	Tail Mean Moment(mean+SD)
B 3.27+0.86	A 10.74+1.35	(%) DNA in Tail (mean+SD)
B 12.42+0.08	A 246.52+24.37	Tail Length(Px) (mean+SD)
B 92.63±5.62	A 48.66±5.83	No Damage (mean+SD)
B 6.22±1.24	A 28.62±3.26	Low Damage(mean+SD)
B 1.20±0.083	A 12.40±2.51	Medium Damage (mean+SD)
B 0.00±0.00	A 10.34±2.04	High Damage (mean+SD)

*** المتوسطات التي تحمل حروف كبيره مختلفة تشير الى وجود فرق معنوي $P<0.05$.**



شكل (4):صورة للمذنب Comet assay في خلايا اللمفاوية لدم مرضى السكري النوع الثاني DMT2 ملونة بصبغة SYBR Green stain تحت المجهر المتفلور Fluorescent microscope بقوة تكبير (X100) .

(A): عديمة الضرر No Damage (ND) (Normal) , (B) : قليلة الضرر Low Damage (LD) , (C) : متوسطة الضرر Medium Damage (MD) , (D) : عالية الضرر High Damage (HD) .



شكل (5):صورة للمذنب Comet assay في خلايا اللمفاوية لدم مرضى السكري النوع الثاني DMT2 ملونة بصبغة Ethidium Bromide (EtBr) تحت المجهر المتفلور Fluorescent microscope بقوة تكبير (X100) .

(A): عديمة الضرر No Damage (ND) (Normal) , (B) : قليلة الضرر Low Damage (LD) , (C) : متوسطة الضرر Medium Damage (MD) , (D) : عالية الضرر High Damage (HD) .

المناقشة

اشارت النتائج في (جدول 1) الى ارتفاع معنوي $P<0.05$ في الكوليسترول لفئات دليل كتلة الجسم (BMI) , باستثناء انخفاض الكوليسترول في الفئة الثالثة (27-29.9) , ويعزى السبب الى الزيادة في امتصاص الكوليسترول في الامعاء

بفعل زيادة نشاط انزيم (Cholesterol Acyl Transferase) الذي يزداد افرازه عند نقص اوخلل في عمل الانسولين ,او نتيجة لزيادة استخدام الدهون في عملية الاكسدة وتحرير الطاقة (15). وتتفق هذه النتائج مع ماتوصل اليه كل منMaghrani واخرون (16) و Al-Khalidy (17) و Al-Tu'ma واخرون (18). ونلاحظ في **(جدول 1)** ارتفاع معنوي P<0.05 لمعايير (الدهون الثلاثية T.G , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة LDL , البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة جداً VLDL) لجميع فئات دليل كتلة الجسم (BMI), باستثناء انخفاض LDL في فئة كتلة الجسم الفئة الثالثة (27-29.9) و الفئة الاولى (اصغر من 25) , يفسر ارتفاع الدهون الثلاثية (T.G) في مصل الدم الذكور المصابين بمرض السكري النوع الثاني الى مقاومة الانسولين اوخلل بعمل الأنسولين مؤدياً الى تثبيط نشاط إنزيم Lipoprotien Lipase (LPL) الذي له أثر مهم في تحويل الدهون الثلاثية (T.G) الى احماض دهنية وكوليسترول حيث يتم امتصاصها من قبل الخلايا الدهنية , كما تسبب مقاومة الانسولين الى تنشيط عمل انزيم لاييز الحساس للهرمونات (Hormones sensitive lipase) في الخلايا الدهنية مؤدياً الى زيادة عمليات تحلل الدهون الى أحماض دهنية وكوليسترول التي تنتقل الى الكبد حيث تستخدم في اعادة صنع الدهون الثلاثية (T.G) وهذا يتسبب في ارتفاع مستواها في مصل الدم لكونها مصدر بديل للطاقة (19). ويفسر ارتفاع LDL و VLDL المحتوية على نسبة مرتفعة من الكوليسترول الى مقاومة الانسجة للانسولين مما يؤدي الى رفع مستوى السكر في الدم مؤدياً الى تقليل و تثبط من فعالية انزيم Lipoprotien Lipase (LPL) ويعمل هذا الانزيم على إزالة هذه البروتينات الدهنية من مجرى الدم ، ولارتفاع مستوى الكوليسترول دور في زيادة نسبة هذه البروتينات الدهنية LDL و VLDL من خلال تثبيط عملية بناء المستقبلات الخاصة لهذه البروتينات على أغشية الخلايا ومن ثم تقليل فعاليتها وعند فشل عملية الازالة الناتجة عن قلة المستقبلات وهذا سوف يعطي فرصة للأنزيمات بالعمل على أكسدة البروتينات الدهنية حيث تقوم بتحويلها الى بروتينات دهنية مؤكسدة وخاصة عندما تكون مقترنة مع التراكيز المرتفعة للدهون الثلاثية (T.G) حيث يعمل انزيم Lipoprotien Lipase (LPL) على تجزئة الـ (T.G) لحوامض شحمية حيث يتم امتصاصها من قبل الخلايا الدهنية (20) , واوضحت نتائج في (جدول 1) انخفاض معنوي ورقمي للبروتينات الدهنية عالية الكثافة HDL (الكوليسترول المفيد) لجميع المرضى ولجميع فئات دليل كتلة الجسم المختلفة مقارنة بالاصحاء , ويعزى سبب الانخفاض الى الدور المحتمل لحالة الشد أو الجهد التأكسدي (Oxidative Stress)التي يعاني منها مرضى السكري بصوره مستمرة , بسبب الارتفاع المزمن بمستوى الكلوكوز في الدم مما يؤدي الى تطور المرض وحصول مضاعفاتة (21) ,حيث تؤدي الشدة التأكسدية الناتجة من ارتفاع مستوى الكلوكوز في الدم الى تغيرات في نوعية جزيئة HDL حيث تتسبب بزيادة معدل عملية هدم البروتينات الداخلة في تركيب جزيئة Apolipoproteins (HDL) (Apo A-1) متسببة بانخفاضHDL , مما يؤدي الى تعطل او تاخير في عملية نقل الكوليسترول من الدم الى الكبد ,ان انخفاض HDL يلعب دور مباشر في تعجيل عملية تصلب الشرايين عند مرضى السكري النوع الثاني اذا يعمل على نقل الكولسترول الضار من جدران الشرايين الى الكبد لغرض التخلص منه وطرحه خارجاً (22) . نستنتج من النتائج اعلاه ان السمنة (Obesity) تساهم في رفع مستوى الكوليسترول الكلي وان انقاص الوزن ربما يساعد في خفض مستوى البروتينات الدهنية منخفضة الكثافة (LDL) , وايظاً يساعد في خفض مستوى الدهون الثلاثية (T.G) ورفع مستوى البروتينات الدهنية عالية الكثافة (HDL). والنشاط الحركي ربما يخفض من مستوى (LDL) ويرفع مستوى(HDL) ، نلاحظ في (جدول 1) وجود اختلافات معنوية بين الاشخاص المصابين بمختلف فئات دليل كتلة الجسم (BMI) لجميع المعايير المدروسة ، ويعزى السبب في ذلك ان الدهون تجعل خلايا الجسم اكثر مقاومة للانسولين Insulin resistance حيث تقل عدد المستقبلات للانسولين على خلايا الهدف Target cells , مما يحصل انخفاض بكمية الكلوكوز المستخدم من

قبل الخلايا وفي نفس الوقت تحصل زيادة في إنتاج الكلوكوز في الكبد بعملية تحلل الكلايكوجين Glycogenolysis مؤدياً الى ارتفاع الكلوكوز في الدم , حيث تنشط الدهون هرمونياً وتفرز مجموعة من الهرمونات التي تقلل من فاعلية الأنسولين التي لها دور كبير في تحويل الشخص البدين الى مريض سكري من النوع الثاني (23) . لهذا تعتبر للسمنة دور رئيس في تطوير مرض السكري , ان ارتفاع نسبة الدهون في اجسام الاشخاص ذوو السمنة وخاصة ذو السمنة المفرطة منهم الذين يكثر في اجسامهم طبقات من الدهون المخزونة تحت الجلد او حول اعضاء مختلفة من الجسم ,يلاحظ على هذه الشريحة انهم يعانون من التعب والاجهاد العضلي الشديد اثناء ادائهم للأعمال التي تكاد تكون يومية على الرغم من انها حركة قليلة , وان زيادة نسبة الدهون بكميات عالية في اجسامهم يجعل تلك الشريحة عرضة لعوامل الاكسدة بسهولة (18). بينت النتائج في (جدول 2) انخفاض معنوي $P<0.05$ في الهرمون الذكري Testosteroneعند الذكور المصابين بمرض السكري النوع الثاني في جميع فئات كتلة الجسم (BMI), حيث اظهرت هذه الدراسة العلاقة بين المرضى وهرمون Testosterone , أن المرضى الذين يعانون من السمنة المفرطة ظهر لديهم انخفاض بمستوى Testosterone عند مقارنتهم مع الاصحاء. وتتفق هذه النتائج مع Svartbergواخرون (24) وAtlantis واخرون(25).ويعزى ذلك الى وظائف الخلية الدهنية بوصفها كخلية الغدد الصماء التي تنتج وتفرز جزيئات مع الإمكانية التنظيمية وهذا وما يدعى السيتوكينات Cytokines / Adipokines ، ومنها هرمون الليبتين leptin وقد يكون له دور مهم في العلاقة بين السمنة Obesity وانخفاض مستويات الهرمون الذكري Testosterone , يبدو أن هناك ارتباط بين مؤشر كتلة الجسم (BMI) ومستوى الليبتين leptin ,حيث ان مستقبلات الليبتين leptin موجودة على خلايا ليدج Leydig's cells وتثبط هرمون Testosterone الذي تم تكوينة بواسطة الغدد التناسلية gonadotropin ربما هذا يحفر أقل فعالية من انتاج هرمون Testosterone بواسطة luteinizing (LH) hormone عند انتشار مستويات اللبتين المرتفعة كما هو الحال في السمنة Obesity, ربما يعود انخفاض Testosterone الى الخلل في افراز الانسولين او مقاومة الانسولين التي تسبب تغيرات في الخصية ووظيفة الغدد الجنسية الملحق (26) ,ان السمنة الحشوية Visceral obesity مع فرط الأنسولين hyperinsulinism المرتبط به تكبح تخليق (SHBG) ومستويات Testosterone في البلازما , وبالتالي هناك أسباب وجيهة لاستنتاج أن السمنة تلعب دوراً رئيساً في خفض مستوى هرمون Testosterone (27), و يتضح من النتائج اعلاه ان السمنة ومرض السكري يؤثران على مستويات الكلوبيولين المرتبط بالهرمونات الجنسية (SHBG) وعلى وجه التحديد هرمون التستوستيرون الأمر الذي يعيق نشاطهم البيولوجي باعتباره الناقل لهذه الهرمونات لان ارتفاع مستويات الانسولين تمنع تخليق (SHBG) في الكبد وهذا متفق مع ما ذكرته Cavaliereواخرون (28) ,من ناحية أخرى ان انخفاض Testosteroneقد يكون الحد من إزالة الكولسترول حيث يقوم باعاقة عملية تشكيل HDL الذي يعتبر المصدر الرئيسي لاستهلاك الكوليسترول من خلايا الجسم (29).وجاءت هذه النتائج متفقة مع كل : Al-Aridhi و Al-Ahmed(30) وHasan واخرون (31) .وبينت النتائج في (جدول 3) ارتفاع معنوي$P<0.05$ في (MI) ولمختلف فئات دليل كتلة الجسم (BMI) عند المقارنة مع الاصحاء , وقد يعزى سبب ذلك الى مقاومة الانسولين Insulin Resistance في الخلايا مما يسبب ارتفاع بمستوى السكر في الدم , وتكوين الجذور الحرة Free radicals حيث تعمل على مهاجمة وتدمير مكونات الخلايا لتحدث بها أضراراً بالغة في مادتها الوراثية ووظائفها الخلوية المختلفة , مما يؤدي الى حدوث خلل او تلف في خيوط المعزل Spindle Microtubules خلال الانقسام الخلوي , وهذا قد يؤدي الى اعاقة تشكيل او تركيب جزيئة DNA او جزيئة RNA مسبباً خلل في ايصال الشفره الوراثية للخلية لتحفيزها على الانقسام الخلوي كما هو واضح في (شكل 1), ان معظم هذه الإضرار لحسن الحظ تقوم الخلية بإصلاحها بواسطة اليات

خاصة من أنظمة اصلاح الـ DNA التي تتمثل بنظام الإصلاح عن طريق التنشيط الضوئي ونظـام الاصلاح بالاستئصال او قص والاصلاح بالاتحـادات الجديـدة , وهذا ما يجعل العامل الوراثي احد عوامل خطوره الاصابة بمرض السكري بصورة عامة على الرغم بانه' لم يحدد الجين المسؤول عن انتقال المرض لحد الان . ونتائج هذه الدراسة تتفق مع كل من Farghaly وHassan (32) و Hleem و Haleem (33) و Al-Joubori واخرون (34) . اظهرت النتائج في (جدول 3) ارتفـاع معنوي P<0.05 في النويات الدقيقة (MN),وانخفاض رقمي في (NDI) ولمختلف الفئات دليل كتلة الجسم (BMI) عند المقارنة مع الاصحاء , وهذا يفسر العلاقة التي توجد بين النويات الدقيقة (MN) المتكونة في خلايا الدم اللمفاوية Lymphocytes الناتجة عن معاملة الخلايا ببعض المواد الكيميائية او تطور المرض , وعليه فان زيادة نسبة النويات الدقيقة في خلايا الدم اللمفاوية يعد دليلاً على التشوهات التركيبية او العددية في الكروموسومات والتي تشير الى تاثير المرض على المادة النووية , ويتفق هذا مع ذكره Bonassi واخرون (35) ,حيث تم استخدام اضطراب الكروموسومات الروتينية واستحثاث انقسام خلايا الدم البيض في خلايا الدم اللمفاوية وتكوين النويات الدقيقة (MN) في النظام المكون للدم , وذلك لكون الخلايا الليمفاوية هي الخلايا الأكثر شيوعاً التي تتأثر بالضرر الجيني ,ويتضح من نتائج الدراسة الوراثية الخلوية اعلاه ارتفاع معنوي بتردد النويات الدقيقة (MN) حيث وجدت معظم الخلايا احادية النوى الدقيقة وبصورة اقل التي تحتوي على نواتين او متعددة النويات , كما يتضح في (شكل 3) حيث تتشكل النويات الدقيقة من شظايا الكروموسوم او فقدان الكروموسومات للجسيم المركزي لذلك تفشل بالارتباط بخيوط المغزل مما يجعلها لا تندمج مع انوية الخلايا الناتجة بعد الانقسام الخلوي ,حيث يؤدي انهيار الكروموسومات في النويات إلى تشكيل شظايا كروموسوم دائرية صغيرة , حيث ان بعض الامراض تؤثر على الفعالية الأنزيمية للخلايا وهذا التأثير يؤدي الى تأخير الانقسام الخيطي مسبباً تشوهات كروموسومية مما تؤدي الى تكوين القطع الكروموسومية التي تظهر على شكل نويات دقيقة (36), وان هذا الاختيار يسمح لنا بتحديد العوامل المهنية والوراثية والغذائية والتي يكون لها تاثير كبير في استقرار الكروموسومات . لمرض السكري تاثير ضعيف في انخفاض مستوى دليل الانقسام النووي (NDI) تم استخدامه من قبل العديد من الباحثين لتقييم التغيرات الكروموسومية في الخلايا متعرضة للأشعة او العوامل الفيزيائية او الامراض التي يمكن أن تؤثر على الوقت اللازم لانقسام الخلايا بالمقارنة بخلايا طبيعية ويستخدم كمؤشر للدلالة على تأثير المرض على الخلايا الطبيعية (37),وكانت معظم الخلايا ثنائية النواة binucleated وبدرجة اقل احادية النواة mononucleated, ثلاثية النواة trinucleated و رباعية النواة tetranucleated كما هو مبين في (شكل 2) . وتتفق النتائج اعلاه مع Bonassi واخرون(38) و-Martínez Pérez واخرون (39). وبينت النتائج في (جدول 4) ارتفاع معنوي P<0.05 في جميع المعايير المستخدمة لقياس نسبة الضرر الحاصل في جزيئة DNA في خلايا الدم اللمفاوية لمرضى السكري النوع الثاني عند المقارنة مع الاصحاء ,وتتفق هذه النتائج اعلاه مع نتائج كل من -Martínez Pérez واخرون (39) و Blasiak واخرون (40) .اظهرت النتائج اختلافات كبيرة بين المرضى والاصحاء وان حصول الضرر(التحطم) في الحمض النووي (DNA) للمرضى من حيث ازدياد الخلايا المتضررة وهذا يظهر من هجرة الحمض النووي (DNA) في الفحص المذنب القلوي Alkaline Comet Assay ,حيث كانت الهجرة أكبر في المرضى بالمقارنة مع الاصحاء ،ويفسر سبب الارتفاع في تحطم الحمض النووي (DNA) الى مقاومة الانسولين والتحكم الضعيف في نسبة السكر في الدم , وهذا قد يساعد في تفسير العلاقة القوية بين ارتفاع تركيزات الكلوكوز في مصل الدم والتلف في الحمض النووي , مما ينتج عنه زيادة في عدد الخلايا التي تحتوي على الكروموسومات المتضررة في مرضى السكري (41) . ويعزى سبب التحطم الى زيادة الضرر التأكسدي الذي يحصل بشكل دوري في الخلايا لمرضى السكري بفعل ارتفاع نسبة السكر في الدم الناتج عن مقاومة الانسولين او ضعف في عمل الانسولين , حيث تعمل

الجذور الحرة Free Radicals على زيادة التأكسد في الخلايا مما يؤثر على المادة النووية (DNA) ,ونستنتج ان الخلايا تتعامل مع الجذور الحرة Free Radicals كمادة سامة ,حيث تعد المواد ذات تأثيرات سمية وذات فعل مطفر والتي يمكن ان تسبب تحطم المادة النووية (DNA) في خلايا الجسم المختلفة عن طريق زيادة الفعالية الايضية للمركبات وانتاج الجذور الحرة (40) . وهذا الضرر الحاصل لـ DNA هو داخلي المنشأ يتم تقديره بواسطة فحص المذنب القلوي Alkaline Comet Assay حيث تتناسب شدة الضرر (DNA) طردياً مع طول الذيل اي (حسب طول المذنب تكون درجة تحطم الحمض النووي (DNA)) وهذا وضح في (شكل 4 و5) حيث يتدرج الطول المذنب مع شدة المرض او خطورته .على الرغم من أن الإضرار بالحمض النووي (DNA) لا تزال بحاجة إلى مزيد من التأكيد في نماذج في الجسم الحي أو بالحالة البشرية والتحقيق فيها وان المستويات المرضية في جسم مريض السكري النوع الثاني (DMT2) من مقاومة الأنسولين (وهذا سوف يؤدي الى ارتفاع هرمون الانسولين في الدم) بالإضافة الى ارتفاع سكر الدم , وهذا كله ممكن أن يسبب الأكسدة والإجهاد المؤكسد Oxidative Stress والتلف في الحمض النووي (DNA) .

References

1-Attalah, S.(2007). Markers for side complications among diabetic mellitus patients .Ph.D.Thesis. Mentouri University Constantine , Department of Natural Sciences and Life, Faculty of Natural Sciences and Life . Algeria.

2-World Health Organization.(1999). Definition,diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications .department of non-communicable disease surveillance , Geneva .

3-Sayed,M.;Iman, M. and Dawlat A. (2011). Biochemical changes in experimental diabetes before and after treatment with mangifera indica and psidium guava extracts. Int .J. Pharm. Biomed .Sci., 2(2) : 29-41.

4-Davila, N.,(2010). Physical activity in puerto rican adults with type2 diabetes mellitus.Ph.D.Thesis.GraduaeCollege, University of Arizona .

5-Unger, J. (2007). Diabetes management in the primary care. 1st ed. Lippincott Williams & Wilkins. California, USA. Pp: 122-605.

6-Curry, J.; Larissa, K.G. and Glickman, B.W. (1999). Influence of sex, smoking and age on human hprt mutation frequenciesand spectra. Genetics .,152: 1065-1077.

7-Friedewald,W.T.; Levy, R.I.and Fredrickson, D.S. (1972). Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem 18:499-502.

8-Fenech,M.(2000). The *in vitro* micronucleus technique. Mutation Res., 455: 81-95.

9-Block, A. W. (1999). Cancer cytogenetics, in The Principles of Clinical Cytogenetics, (Gersen, S. L. and Keagle, M., B. eds.), Humana Press, Totowa, NJ, Pp. 345–420.

10-Micale,A. M. (2010). Classical and molecular cytogenetic analysis of

17-Al-Khalidy, N. T. T.(2010). Between Insulin Resistance, obesity and lipid profile in diabetic women with polycystic ovarian syndromes (POS). Iraqi .J. Comm. Med., 4 (1): 247 – 250.

18-Al-Tu'ma ,F .J. ; Yassin , A. G. and Al-Kayatt ,T . H.(2011). Effects of type-2 diabetes mellitus on serum leptin, insulin, interlukin-8, and lipid profile. Karbala .J. Med., 4(1): 1011-1018.

19-Hameed,I.K.; Rashid ,N.F. and Abed , B. A. (2013). Homestasis model assessment–adiponectin ratio and adiponectin –resistin index as markers of insulin resistance in type 2diabetes mellitus.J.FacMed Baghdad. , 55 (2): 175 -178.

20-Turk, Z. ; Sesto, M. ; Skodlar, J. and Ferencak , G. (2002). Soluble LDL immune complexes in type 2 diabetes and vascular disease. Horm. Metab. Res., 34(1): 196 - 201.

21-Bury, J. E.; Stroup, J. S.; Stephens, J. R. and Baker, D. L.(2007). Achieving american diabetes association goals in hiv- seropositive patients with diabetes mellitus . Proc. Bayl. Univ. Med .Cent., 20(1) :118-123.

22-AL-Zorri,S. G.(2009). Some physiological and Histological Effect of Alcoholic Extract Tribulus terrestris in diabetic female rabbits. MSc. Thesis, College of Science, Baghdad University, Iraq.

hematolymphoid disorders. in genomic mechanisms of neoplastic disease. (Crisan, D. ed.)., Pp : 39-78.

11-Shubber, E. K. and Al-Alak , B. M. A. (1986). Spontaneous chromosomal aberrations and SCEs in human lymphocytes effects of culture conditions . Nucl ., 29:92-98.

12-Lamberti, L.; Ponzetto, P. B. and Ardito, G. (1983). Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. Mutation Res., 120: 193-199.

13-Klaude ,M.; Eriksson, S.; Nygren, J.and Ahnstrom , G . (1996) . The Comet assay: mechanism and technical considerations. Mutat. Res., 363(1) : 89-96.

14-Steel , R . G . D . and Torrie , J . H . (1980). Principles and procedures of statistics, Second Edition , New York: MC GRAW –Hill

15-Hori, M . ; Satoh , M . ; Furukawa, K. and Sakamoto, Y. (2004). Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase -2 (ACAT-2) is responsible for elevated intestinal ACAT activity in diabetic rats. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 24(9):95-1689.

16-Maghrani, M.; Lemhadri, A.; Zeggwagh, N.A. and Eddouks, M. (2004). Effect of retama raetam on lipid metabolism in normal and recentonset diabetic rates.J. Ethnopharmacology., 5(90): 323-329.

23-Arora, M.; Koley, S.; Gupta, S. and Sandhu, J.S. (2007). A study on lipid profile and body fat in patients with diabetes mellitus. Anthropologist., 9 (4) : 295- 298.

24-Svartberg,J.;VonMühlen ,D.; Sundsfjord , J. and Jorde, R. (2004). Waist circumference and testosterone levels in community dwelling men. European Journal of Epidemiology., 19(7) : 657–663 .

25-Atlantis, E.; Martin, S.A.; Haren, M.T. and Wittert, G.A. (2009). Demographic, physical and lifestyle factors associated with androgen status: the Florey Adelaide Male Ageing Study (FAMAS). Clinical Endocrinology., 71(2):72-261.

26-Chandrashekar, V. and Bartke, A.(2005). The impact of altered insulin-like growth factor-I secretion on the neuroendocrine and testicular functions. Minerva Ginecol., 57(1): 87-97.

27-Armin, H., (2008). Testosterone, the metabolic syndrome and diabetes mellitus., WPMH GmbH. Elsevier Ireland Ltd ., vol. 5S: S11–S17.

28-Cavaliere, L.N.; Knobel, H and Halpern , M.(2000). Decreased androgen levels in massively obese men may be associated with impaired function of the gonadostat. Int . J. Obes. Relat. Metab. Disord., 24(1): 1433–1437.

29-Abed, H. H. and Al-Ezzi , M. I.(2010). Evaluation of testosterone and HDL-cholesterol relation in iraqi sever hypertensive patients. Al- Mustansiriya .J. Sci.21(3):13-20.

30- Al-Aridhi , D. T. N. and Al-Ahmed, H. I.(2015). Study the relationship between obesity and fertility in diabetic Iraqi men. J. Biotechnology Research Center, 9(2):81-88.

31- Hasan,B.F. ; Al- karawi ,I. N.and Abd Jassim,N.(2013). Determination of testosterone level as predictor for insulin resistance in young men with family history of type2 diabetes and hypertension. J. Baghdad for Sci. 10(3):945-953.

32-Farghaly,A.A. and Hassan,Z.M. (2012). Methanolic extract of Lupinus Termis ameliorates DNA damage in alloxan-induced diabetic mice. European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 16(3): 126-132.

33-Hleem, A. M. and Haleem , S. M.(2013). Cytogenetic and immunogenic study of type -2 diabetes mellitus patients. International Journal of Diabetes Research. 2(4): 76 - 80.

34-Al-Joubori ,M.A.; Zaidan ,H.K. and Al Saadi, A.H.(2014). Evaluation of chromosome aberrations and mitotic index in alloxan-induced diabetic male rats treated with the mixture of plants extracts mixture. Journal of Babylon University, Pure and Applied Sciences, 22(5): 1545-1555.

35-Bonassi, S.; El-Zein, R.; Bolognesi,C. and Fenech,M.(2011). Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk:evidence from human studies. Mutagenesis, 26(1):10-93.

36-El-Zein,R. ; Vral, A and Etzel , C . J .(2011) . Cytokinesis - blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. Mutag ., 26 (1) :101-106.

37-Al-Samarrae, S.H.; Al-Bayaati, A. J.and Al-Anbar, S. A.(2009). The study of chromosomal aberrations in mice infested with radiated and non-radiated protoscolices of *Echinococcus granulosus* . Diala , Jour . , 36 (1) :1-9.

38-Bonassi, S.; Znaor, A.; Ceppi, M.and Lando, C.(2007). An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. Carcinogenesis, 28(3):62.

39-Martínez-Pérez ,L. M.; Cerda-Flores, R. M.; Ibarra-Costilla, E.and Cortés-Gutiérrez ,E. I.(2007). Frequency of micronuclei in mexicans with type 2 diabetes mellitus. Prague Medical Report.,108(3):248-255.

40-Blasiak ,J.; Arabski, M.; Krupa R. and Wozniak, M. Z.(2004). DNA Damage and repair in type 2 diabetes mellitus. Mutat. Res., 554(1): 297–304.

41- Collins, A. R.; Dusinska, M.; Gedik, C. M. R. and Stetina, R.(1996). Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker. Environ. Health. Perspect ., 104(1) : 465–946.