Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی- مولکولی
دوره دوم، شماره هفتم، تابستان ۱۳۹۱

NCMBJ

short communication
گزارش کوتاه

ارزیابی ژنوتوکسیسیتی به روش القاء میکرونوکلئی با استفاده از لاروهای آمفی بین Xenopus laevis

معصومه اطهری نیا*[۱]، سید علی نجومی[۲]

[۱] مربی ، گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد ،کرج، ایران
[۲] استادیار، گروه میکروبیولوژی،انیستیتو پاستور ایران ،تهران ، ایران

چکیده

سابقه و هدف: مخاطرات ژنوتوکسیسیتی (سموم تاثیر گذار بر روی ژن ها) یکی از نگرانی‌های سازمان‌های محافظ محیط زیست می‌باشد. ژنوتوکسین ها موادی هستند که باعث بوجود آمدن تغییرات قابل توارث در ماده ژنتیکی سلول های جنینی، اسپرماتوسیت ها و اووسیت ها می شوند. با توجه به این که چنین مخاطراتی ممکن است از آب ناشی شود، برای ارزیابی آن‌ها انجام آزمون‌های آزمایشگاهی آب با استفاده از ارگانیسم‌هایی که در این محیط زندگی می‌کنند، ضروری می‌باشد. این مقاله اثرات ژنوتوکسیسیتی در محیط‌های آبی را روی لاروهای گونهٔ آمفی‌بین زنوپوس لاویس بررسی می‌کند.

مواد و روش ها: زنوپوس لاویس گونه ای از قورباغه آبزی آفریقای جنوبی از جنس زنوپوس است که دارای ۱۲ سانتی متر طول با سر و بدن مسطح بدون گوش و زبان خارجی می باشد. ارگانیسم‌های مورد آزمون در مدت ۱۲ روز در معرض محدوده‌ای از غلظت‌های نمونهٔ تحت آزمون قرار می‌گیرند. یک کنترل بدون نمونه (کنترل منفی) و یک کنترل با یک ماده مرجع ژنوتوکسیک (کنترل مثبت) در شرایط یکسان به‌طور موازی مورد آزمون قرار می‌گیرند.

یافته ها: با استفاده از کنترل مثبت، کیفیت معرف بیولوژیکی بررسی و آزمون تائید می‌شود. میزان گلبول‌های قرمز با میکرونوکلئی برای هر غلظت از نمونهٔ تحت آزمون و برای محلول‌های کنترل تعیین می‌شود. میزان گلبول‌های قرمز با میکرونوکلئی برای هر غلظت با نتیجه کنترل منفی به منظور تعیین غلظت‌هایی که ژنوتوکسیک مثبت را القاء می‌کند، مقایسه می‌شود.

نتیجه گیری: مثبت بودن یک آزمون می تواند براساس نتایج معنی دار آماری در حداقل یکی از غلظت ها نسبت به کنترل منفی باشد و حداکثر غلظت، که سمیت حاد ایجاد کند، آزمون شده باشد و نتیجه آزمون مثبت باشد.

کلمات کلیدی: ژنوتوکسیسیتی، میکرونوکلئی، زنوپوس لاویس

مقدمه

ژنوتوکسین ها موادی هستند که باعث تغییرات وراثتی در ماده ژنتیکی سلول های زایشی (اسپرماتوسیت ها و اووسیت ها) می شوند. اصطلاح موتاژن اشاره به موادی دارد که تغییرات قابل توارث را به ساختمان DNA وارد می کند و یک ژن یا گروهی از ژن ها را درگیر می نماید. آزمون های ژنوتوکسیستی می تواند برای ردیابی ترکیباتی که خسارت های ژنتیکی را بوسیله مکانیسم های متفاوت ایجاد می کنند، در محیط های *in vivo , in vitro* انجام شوند. (۱). آمفی بین ها گروهی از مهره داران هستند که به نام عمومی دوزیستان شهرت دارند (۵). زنوپوس لاویس قورباغه آبزی آفریقای جنوبی از جنس زنوپوس است که دارای ۱۲ سانتی متر طول با سر و بدن مسطح بدون گوش و زبان خارجی می باشد. این قورباغه دارای سه ناخن کوتاه روی هر یک از پاهای عقبی است که از آن برای پنهان شدن در لجن استفاده می کند (۴).

آدرس نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی، گروه میکروبیولوژی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد،تهران، ایران
Email:atharinia_m@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله: ۹۰/۱۱/۱۲
تاریخ پذیرش: ۹۱/۳/۷

www.SID.ir

Archive of SID

اساس آزمون

ارگانیسم‌های مورد آزمون در مدت ۱۲ روز در معرض محدوده‌ای از غلظت‌های نمونهٔ تحت آزمون قرار می‌گیرند (۷). یک کنترل بدون نمونه (کنترل منفی) و یک کنترل با یک ماده مرجع ژنوتوکسیک (کنترل مثبت) در شرایط یکسان به‌طور موازی مورد آزمون قرار می‌گیرند. با استفاده از کنترل مثبت، کیفیت معرف بیولوژیکی بررسی و آزمون تائید می‌شود (۶). در طی تقسیم سلولی، قطعات کروماتیدی بدون سانترومر نمی‌توانند به سوی هسته سلول‌های دختر حرکت کنند و داخل سیتوپلاسم باقی می‌مانند. برخی اختلالات کروموزومی که توسط مادهٔ مورد آزمون القاء می‌شود، منجر به ایجاد قطعات کروموزومی بدون سانترومر شده که نمی‌توانند وارد هستهٔ سلول‌های دختر شوند. علاوه بر این اختلالات دوک تقسیم ممکن است، کروموزوم‌هایی ایجاد کند که توانایی ورود به هسته را نداشته باشند. این‌ها هسته نیستند و به جای پلاسما در سیتوپلاسم سلول تشکیل شده‌اند. میزان گلبول‌های قرمز با میکرونوکلئی برای هر غلظت از نمونهٔ تحت آزمون و برای محلول‌های کنترل تعیین می‌شود. میزان گلبول‌های قرمز با میکرونوکلئی برای هر غلظت با نتیجه کنترل منفی به منظور تعیین غلظت‌هایی که ژنوتوکسیک مثبت را القاء می‌کند، مقایسه می‌شود (۶). میزان گلبول‌های قرمز دارای میکرونوکلئی بوسیله مشاهده یک اسمیر خون محیطی با میکروسکوپ در زمینه‌ای که دارای ۱۰۰۰ گلبول قرمز باشد، درجه‌بندی می‌شود و به عنوان گلبول‌های قرمزی که دارای یک یا بیشتر میکرونوکلئی هستند، گزارش می‌شود (۶).

شرایط محیطی آزمون

همهٔ آزمون‌ها و بررسی‌های انجام شده برای پرورش لاروها و انواع بالغ باید در اتاق عاری از هرگونه گرد و غبار و بخارات سمی انجام شود. آزمون باید تحت شرایط نوری (نور مصنوعی یا نور طبیعی بدون تابش مستقیم نور خورشید) مطابق با یک چرخه ۱۲ ساعت روشنایی / ۱۲ ساعت تاریکی در یک اتاقک با دمای کنترل شده برای نگهداری بطری‌ها در دمای ۱°C ± ۲۲ °C انجام شود (۶).

مواد و روش ها

معرف بیولوژیکی

معرف بیولوژیکی، زنوپوس لاویس می‌باشد که از این پس زنوپوس نامیده می شود (۹). آزمون لاروها باید در مرحله‌ای خاص از رشد مرحله ۵۰ نیوکوپ و فابر[1] آن ها شروع شود (۹). در این مرحله اندازهٔ لاروها ۲۰ mm تا ۲۷ mm می‌باشد و دارای یک انقباض در پایه پای عقبی هستند . لاروها باید برای یک دوره حداقل ۸ روزه پیش از شروع آزمون تحت شرایط دمایی و روشنایی ویژهٔ این آزمون در ظروف شیشه‌ای مانند بطری‌هایی با گنجایش ۵ لیتر با قابلیت بسته شدن کامل بدون نفوذ هوا یا فلاسک‌های مخروطی با درهای شیشه‌ای سمباده‌ای پوشیده شده با یک فیلم تترافلوروکربن[2] نگهداری شوند. لاروها باید عاری از هرگونه بیماری و ناهنجاری باشند. در یک آزمون، لاروهای استفاده شده برای نمونهٔ تحت آزمون و کنترل باید از یک فرآیند تخم‌گذاری بدست آمده باشند. هر سری از لاروها باید حداقل برای ۱۵ ظرف آزمون استفاده شود (۶).

آب

لارو و تخم گونه های مختلف، در آبی که ویژگی های آب آشامیدنی را دارد و فاقد کلراست، بهترین رشد را نشان می دهند. آب استفاده شده برای آزمون باید آب تصفیه شده با ذغال فعال برای حذف مقادیر جزئی کلر، آب زیر زمینی، آب معدنی یا آب رقیق شده مورد استفاده برای انجام آزمون‌های توکسیتی حاد روی ماهی باشد. اگر آبی غیر از آب محیط پرورش لاروها استفاده می‌شود، ارگانیسم‌ها باید حداقل ۸ روز پیش از شروع آزمون در این آب قرار داده شوند (۶).

غذا

معمولاً از غذای مورد استفاده ماهی‌های آکواریومی استفاده می‌شود (۳). غذا باید پیش از استفاده به صورت پودر در بیاید. ممکن است پودر شاهی آبی[3] خشک یا منجمد شده نیز استفاده شود. لاروهای زنوپوس توسط مواد غذایی صنعتی که معمولاً برای ماهی های آکواریومی تهیه شده و پیش از مصرف

1- Nieuwkoop and Faber
2- Tetrafluorocarbon
3 - Watercress

www.SID.ir

Archive of SID

خرد و پودر می شوند یا پودر شاهی آبی تغذیه می شوند (۶).

مادهٔ مرجع

سیکلوفسفامید، مونوهیدرات[1] ($C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P$,H_2O) با کیفیت تجزیه‌ای معین در غلظت ۲۰ mg/l است (۶).

حلال واسط

دی متیل سولفوکسید (DMSO)[2] به عنوان حلال واسط استفاده می شود. عدم ژنوتوکسیسیتی و سمیت کلی حلال مورد استفاده باید از پیش تعیین شده باشد (۶). از تری کاین متان سولفونات[3] به عنوان داروی بیهوشی استفاده می شود. محلول ۲۰۰ mg/l هپارین پودری در ۷ g/l محلول آبدار سدیم کلراید (برای هپارینه کردن میکروپیپت ها)، متانول CH_3OH با کیفیت تجزیه‌ای معین استفاده می شود. رنگ‌های مورد استفاده مسونز هماالوم[4] و گروآتس هماتوکسیلین[5] است (۲). اتاقک مورد استفاده با گنجایش مناسب و دمای ۱°C ± ۲۲°C برای نگهداری تمام بطری‌های مربوط به سری‌های مختلف یک آزمون کامل، آزمونه، مواد مرجع و کنترل منفی است. از آکواریوم با گنجایش ۲۵ l تا ۵۰ l ، ذره بین و میکروسکوپ با بزرگنمایی x ۱۵۰۰ نیز استفاده می شود (۶).

روش آزمون

مدت زمان بین جمع‌آوری نمونه و دریافت آن بوسیله آزمایشگاه نباید بیشتر از h ۲۴ باشد. نمونه‌های جامد (پسماند، خاک و لجن) باید پس از دریافت آن توسط آزمایشگاه در مدت یک ماه آزمون شوند. مواد تصفیه‌ای آبدار نباید پیش از آزمون صاف شوند. این مواد تا زمان انجام آزمون باید در تاریکی در دمای ۳°C ± ۴°C نگهداری شوند. نمونه‌های حاصل از تصفیه آبدار باید حداکثر h ۲۴ پس از مرحله شستشو، آزمون شوند (۶). نمونه‌های آب و فاضلاب باید تا زمان انجام آزمون در بطری‌های ساخته شده از مواد شیمیایی خنثی در تاریکی در دمای ۳°C ± ۴°C نگهداری شوند. نمونه‌های فاضلاب باید حداکثر h ۲۴ پس از دریافت نمونه توسط آزمایشگاه، آزمون شوند(۶). هنگام انجام آزمون، نمونه باید به خوبی همگن شود. لازم است دمای نمونه برای تکرارهای روزانه محیط آزمون که مخلوطی از آب آزمون نمونهٔ تحت آزمون و مواد مغذی است، پیش از استفاده به دمای ۱°C ± ۲۲°C رسانده شوند (۶). اگر pH نمونه بین ۶ تا ۸ نباشد pH آنرا با استفاده از هیدروکلریک اسید یا هیدروکسید سدیم به ۱± ۷ برسانید و سپس نمونه مورد آزمون (نمونهٔ تحت آزمون شامل انواع مختلف آب مانند: آب سطحی، آب زیرزمینی، فاضلاب، فاضلاب آبکی و پسماندهای صنعتی می‌باشد) را همگن کنید (۶).

آماده سازی محلول‌های ذخیره برای مواد مورد آزمون

با حل کردن مقدار معین از ماده در حجم معین آب آزمون محلول ذخیرهٔ مواد مورد آزمون را آماده کنید. این محلول را باید در زمان استفاده آماده کنید. اگر محلول ذخیره مواد در تاریکی و در دمای ۴°C پایدار است ، این محلول را می‌توان در حجم‌های لازم تهیه و تحت این شرایط ذخیره کرد (۶).

آماده سازی محلول‌های آزمون برای مواد مورد آزمون

محلول‌های آزمون را بلافاصله پیش از آزمون با رقیق کردن محلول ذخیره در آب آزمون برای بدست آوردن غلظت‌های مورد نیاز آماده کنید. در صورت وجود مقادیر کم مواد محلول و یا نامحلول در آب، ممکن است از یک حلال واسط محلول در آب استفاده شود. در این حالت غلظت حلال باید در هر ظرف یکسان باشد و نباید بیش از ۱۰۰ mg/l باشد. آب آزمون هنگام تهیهٔ محلول واسط باید تکان داده شود که باعث تشکیل یک میکروسوسپانسیون می‌شود. در صورت تشکیل رسوب، از ادامه آزمون خودداری کنید. اگر استفاده از محلول واسط اجتناب ناپذیر است، یک سری کنترل منفی دارای همان غلظت حلال باید در آزمون استفاده شود (۶).

انتخاب غلظت‌ها

آزمون باید با حداقل ۵ غلظت متوالی از نمونه مورد آزمون انجام شود. نسبت هر غلظت با غلظت بعدی آن نباید از ۲ بیشتر باشد. این غلظت‌ها، محلول‌های آزمون را تشکیل می‌دهند. مثالی از غلظت برای یک نمونه: ۱۰ mg/l، ۵ mg/l، ۱/۲۵ mg/l، ۰/۳۱ mg /l، ۰/۶۲ mg/l برای نمونه‌های آب، فاضلاب یا مواد حاصل از تصفیه، غلظت‌ها شامل: ۱۰۰۰ ml/l، ۵۰۰ ml/l،

1- Cyclophosphamide monohydrate
2- Dimethyl sulfoxide
3- Tricaine methane sulfonate
4- Masson`s haemalum
5- Groat`s haematoxylin

www.SID.ir

Archive of SID

۲۵۰ ml/l، ۱۲۵ ml/l، ۶۲/۵ ml/l می‌باشد (۶). این غلظت‌ها بوسیله رقیق کردن نمونه با آب آزمون آماده می‌شوند. هر آزمون باید شامل یک سری کنترل منفی نمونه مورد آزمون باشد (۶).

انجام آزمون

برای هر غلظت و برای سری کنترل منفی، داخل یک بطری l ۵ ، محلول آزمون به نسبت ml ۱۰۰ به ازاء هر لارو، ۱۵ تا ۲۰ لارو و غذا بریزید. به موازات هر آزمون یک کنترل مثبت با مواد مرجع را تهیه کنید. در بطری‌ها را بسته و در یک اتاقک با دمای کنترل شده قرار دهید. ظرف‌ها باید دارای مقدار غذای یکسانی باشند. تمام مقدار غذا باید مصرف شود، پس از چند ساعت بررسی کنید که آیا غذا با یک سرعت در همه بطری‌ها مصرف شده است. در غیر این‌صورت آن را در گزارش آزمون ثبت کنید. از لاروهای آزمون که تغذیه نداشته اند یک نتیجه منفی بدست می آید که معتبر نمی باشد. هر h ۲۴ به هر بطری، محلول آزمون و غذا را زیر یک هود شیمیایی بیافزائید. برای آب‌های با آلودگی بالا، ممکن است اکسیژن دهی محیط آزمون بوسیله ورود حباب هوا به داخل آن لازم باشد. در طی جریان آزمون غلظت اکسیژن محلول باید ٪۶۰ از مقدار اشباع باشد. بطور روزانه سرعت مرگ و میر، اختلالات رفتاری مانند غذا نخوردن، عدم رشد و فعالیت حرکتی غیر عادی لاروها را ثبت کنید (۶). آزمون را پس از ۱۲ روز متوقف کنید. حداقل سه غلظت بیشتری را که هیچ سمیت حادی نشان نداده‌اند را برای آزمون نگهداری کنید. در سه غلظت انتخاب شده، لاروها را با غوطه‌وری در g/l ۰/۲ محلول تری کاین متان سولفونات بیهوش کنید. با استفاده از ذره بین بوسیله میکروپیپت هپارینه شده (برای هپارینه کردن ، میکروپیپت‌ها را در محلول g/ml ۲۰۰ محلول هپارین قرار، داده آن را پر و خالی کنید) از هر لارو خون‌گیری از قلب را انجام دهید . برای هر لارو یک اسمیر خونی روی لام شیشه‌ای تهیه کنید (۶). پس از خشک کردن لام‌های آماده شده، آن ها را بوسیله متانول به مدت min ۳ تثبیت کنید. به این ترتیب اسمیرها را می‌توان نگهداری کرد (۶). خواندن لام‌های آماده شده اسمیرهای خونی را با هماتوم مسونز به مدت min ۷یا هماتوکسیلن گرواتس به مدت min ۱۵ رنگ آمیزی کنید. لام‌ها را به مدت min ۱۰ با آب جاری بشوئید سپس آن ها را خشک کنید. لام‌ها را بوسیله میکروسکوپ با روغن ایمرسیون بررسی کنید. برای هر لام نسبت گلبول‌های قرمز با میکرونوکلئی و ضریب میتوزی را روی پایه آزمون حداقل ۱۰۰۰ گلبول قرمز تعیین کنید. در صورت لزوم به عنوان اطلاعات اضافی، نسبت گلبول‌های قرمز با ۱ ، ۲ ، ۳ ، ۴ میکرونوکلئی یا بیشتر را ثبت کنید (۶).

یافته ها

برای هر سری آزمون و کنترل، نتایج حداقل ۱۲ اسمیر تهیه شده به روش صحیح را در یک جدول به صورت نسبت گلبول قرمز با میکرونوکلئی در ۱۰۰۰ گلبول، ثبت شد و بر اساس مقادیر صعودی مرتب شد. هر یک از اسمیرها باید از یک لارو تهیه شده باشد (۶). به طورکلی برای هر سری، توزیع مقادیر بدست آمده از توزیع نرمال پیروی نمی‌کند (توزیع لاپلاس – گوس)[1]. برای مقایسهٔ نتایج بدست آمده از سری‌های آزمون و کنترل از روش آماری مناسب استفاده شد. برای یک غلظت معین، نتیجه در صورتی مثبت در نظر گرفته می‌شود وقتی‌که نسبت گلبول قرمز با میکرونوکلئی در هزار بیشتر از مقدار آن در کنترل منفی بوده و اختلاف از نظر آماری معنی‌دار باشد. (به این معنی که در این غلظت، در نمونه مورد بررسی افزایش تشکیل میکرونوکلئی‌ها مشاهده می‌شود). برای هر غلظت نتیجه بصورت مثبت یا منفی مشخص کنید. داده‌های خام مربوط به نسبت گلبول‌های قرمز با میکرونوکلئی در ۱۰۰۰ گلبول در هر سری که به ترتیب صعودی طبقه‌بندی شده، ارائه شده است (۶). حدود اطمینان میانه‌های M_1 و M_3 همپوشانی ندارند، بنابراین اختلاف بین میانه‌های دو نمونه معنی‌دار است. نتیجه سری ۳ به صورت مثبت گزارش می‌شود. نمونه مورد آزمون ژنوتوکسیک است (۶). آزمون صحه گذاری شده است، نمونه سری ۲ مثبت به صورت مثبت گزارش می‌شود.

1- Laplace-Gauss distribution

www.SID.ir

Archive of SID

جدول داده‌های خام

امتیاز	سری ۱ کنترل منفی (n = ۱۵)	سری ۲ کنترل‌مثبت (n = ۱۵)	سری ۳ سری آزمون (n = ۱۴)
۱	۱	۲	۵
۲	۱	۵	۵
۳	۱	۵	۶
۴	۱	۶	۸
۵	۲	۷	۸
۶	۲	۹	۸
۷	۲	۱۰	۹
۸	۲	۱۲	۱۲
۹	۳	۱۳	۱۲
۱۰	۳	۱۴	۱۴
۱۱	۶	۱۴	۱۴
۱۲	۶	۱۴	۱۵
۱۳	۷	۱۵	۱۶
۱۴	۷	۱۵	۱۷
۱۵	۷	۱۷	

جدول محاسبه‌ها

	سری ۱		سری ۲		سری ۳	
	امتیاز	ارزش M۱	امتیاز	ارزش M۲	امتیاز	ارزش M۳
میانه	۸	۲	۸	۱۲	۷/۵	۱۰/۵
چارک پائینی	۴/۵	۱/۵	۴/۵	۶/۵	۴	۸
چارک بالایی	۱۱/۵	۶	۱۱/۵	۱۴	۱۱	۱۴

نتیجه گیری

آزمون مثبت

مثبت بودن یک آزمون می‌تواند بر اساس نتایج معنی‌دار آماری در حداقل یکی از غلظت‌ها نسبت به کنترل منفی باشد. (۶)

آزمون منفی

آزمون، منفی گزارش می‌شود اگر :

الف: در هیچ یک از غلظت‌های مورد آزمون نتایجی که نسبت به کنترل منفی از نظر آماری مثبت باشد، مشاهده نشود. ب :حداکثر غلظت که سمیت حاد ایجاد کند، آزمون شده باشد و نتیجه آزمون مثبت نباشد (۶).

بحث

صحه گذاری[1] روش آزمون

در صورت برقراری شرایط زیر، آزمون صحه گذاری شده است:

– سرعت مرگ و میر در سری‌های کنترل مثبت و منفی نباید از ٪ ۱۵تعداد کل لاروها، بیشتر باشد.

– یک پاسخ مثبت معنی‌دار بوسیله کنترل مثبت بدست آمده باشد .

– مقدار میکرونوکلئی در سری‌های کنترل نباید از ٪ ۱ برای زنوپوس لاویس بیشتر باشد.

– ضریب میتوزی در سری‌های آزمون شده صفر نبوده و با ضریب میتوزی درجه بندی شده [2] در سری‌های کنترل متفاوت نباشد (۶).

مثالی از کاربرد یک روش آماری برای بیان نتایج

روش آماری مک گیل[3] برای تجزیه نتایج روش آزمون توصیه شده است. این روش پردازش نتایج حاصل از تعداد کم نمونه‌ها ($n \geq ۷$) را که توزیع آن از توزیع نرمال پیروی نمی‌کند، امکان پذیر می‌سازد (۸). (توزیع لاپلاس – گاس) یک نمونه با تعداد n مربوط به تعداد اسمیرهای تهیه شده برای هر سری، آماده می‌شود میانه[4] و چارک‌ها [5] را مطابق فرمول‌های زیر تعیین کنید:

اگر نمونه، یک زوج عدد (۲ p) باشد، مقادیر فوق به شرح زیر می‌باشد:

1- Validation
2- Scored
3- Mac Gill
4- Median
5- Quartiles

www.SID.ir

Archive of SID

چارک پائین = $\frac{p+1}{2}$

جارک بالایی = $P+\frac{P+1}{2}$

اگر نمونه، یک عدد فرد (۲ p +۱) باشد، مقادیر فوق به شرح زیر می‌باشد :

میانه =p+۱

چارک پائین = $\frac{P}{2}+1$

چارک بالایی = $\frac{3P}{2}+1$

طبق این روش، مقادیر میانه، چارک پائینی و چارک بالایی از هر یک از سری‌ها بدست می‌آید. حدود اطمینان، با احتمال ۹۵٪ را برای میانهٔ هر نمونه مطابق با فرمول زیر تعیین کنید .

حدود اطمینان = $M \pm ۱/۵۷ \times \frac{I_{QR}}{\sqrt{n}}$

که در آن M میانهٔ مشاهده شده، n تعداد اسمیرها در سری، I_{QR} محدودهٔ بین دو چارک است یعنی تفاضل مقدار چارک بالایی از مقدار چارک پائینی. اختلاف بین میانه‌های دو نمونه در صورتی معنی‌دار است، که حدود اطمینان آن‌ها هم‌پوشانی نداشته باشد. در نمونه مثبت، گلبول‌های قرمز لاروهایی که از آن سری تهیه و آزمون شده‌اند، از نظر آماری، افزایش بیشتری در تشکیل میکرونوکلئی نسبت به سری کنترل که با آن مقایسه می‌شود دارند (۶).

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

(1) Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2008.
(2) Gabe M. Techniques Histologiques, 1968.
(3) Gallien L,et Durocher M. Table Chronologique du Developpement chezPleurodeles Waltl Michah. Bull Biol Fr Belg, 1957:91: 97-114.
(4) http://en.wikipedia.org/wiki/African_clawed_frog
(5) http://en.wikipedia.org/wiki/Amphibian
(6) ISO 21427-1. Water quality-Evaluation of Genotoxicity by Measurement of the Induction of Micronuclei- Part 1: Evaluation of Genotoxicity Using Amphibian Larvae.2006
(7) Jaylet A,Deparis P, Ferrier V, Grinfeld S, Siboulet R. A New Micronucleus Test Using Peripheral Blood Erythrocytes of the Newt Pleurodeles Waltl to Detect Mutagens in Fresh-water Pollution. Mutation Res. 1986: 164:,245-257
(8) Mac Gill R, Tuckey JW, Larsen WA. Variations of Box Plots. The American statist. 1987: 32:337-343
(9) Nieuwkoop PD, Faber J. Normal Table of Xenopus Leavis (Daudin) Amsterdam. 1956.

www.SID.ir