

تأثير العلاج الكيميائي للسرطان على معاملة انقسام الخلايا الجسمية في الفأر الأبيض

فرات عبد الحمزه هادي قبس نذير لطيف د. علاوي لعيبي داغر
أستاذ مساعد - كلية الطب البيطري مدرس مساعد - كلية التربية مساعد باحث - كلية
الطب
جامعة القادسية جامعة القادسية جامعة القادسية

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية للكشف عن تأثير عقار السايكلوفوسفاميد وهو من العقاقير المستخدمة في علاج الأورام السرطانية على معاملة انقسام خلايا نقي العظم حيث أُختبرت ثلاث تراكيز من العقار تمثل الجرعة العلاجية للإنسان وجرعتان أعلى وهي (50، 100 و 150) ملغم /كغم وأعطيت هذه التراكيز للفأر الأبيض *Mus musculus* بطريقة الحقن ولمدة 5 أيام وتم حساب معاملة انقسام خلايا نقي العظم . وقد توصلت الدراسة الى النتائج الآتية:

- 1- أظهر التراكيز 50 ملغم/كغم تأثيرات سلبية تمثلت بانخفاض معاملة انقسام خلايا نقي العظم عند المقارنة مع السيطرة .
- 2- أظهرت التراكيز 100 و 150 ملغم/كغم تفوقاً معنوياً عند المقارنة مع السيطرة والتراكيز الأول في خفض معاملة انقسام خلايا نقي العظم وازداد هذا الانخفاض بزيادة التراكيز .

المقدمة

Introduction

"الوقاية خير من العلاج" هذه العبارة دفعت الكثير من الباحثين والعلماء لإيجاد السبل الكفيلة للقضاء على الأمراض المزمنة والخطيرة كالسرطان وأمراض القلب أو العمل على تأخير ظهورها لاسيما بعد الانفجار المعرفي والتقني الهائل في صناعة الأدوية والمستحضرات الكيميائية والتي سرعان ما أظهرت عدم قدرتها في الوقاية من تلك الأمراض الخطرة حيث أصبحت تأثيراتها الجانبية ضارة للجنس البشري لأنها قد تستهدف مادته الوراثية مسببة بذلك حدوث طفرة يمكن أن تنتقلها الأجيال، وهذا مما حدا بالعلماء للتوقف لالقاء نظرة تمعن في تلك المواد الكيميائية التي استخدمت لعلاج بعض الأمراض لاسيما السرطانية منها في المرضى الخاضعين للعلاج الكيميائي (Internet, 2003). ومن أهم العقاقير المستخدمة في علاج الأورام السرطانية عقار السايكلوفوسفاميد Cyclophosphamide وهو من العقاقير المستخدمة في مجال علاج الأمراض السرطانية وبعض أمراض المناعة المكتسبة. حيث أظهرت الدراسات نجاح هذا العقار في اختزال العديد من الأورام الخبيثة خاصة عند استعماله بجرعات عالية (Ad'hiah et al., 2004). في ضوء ما تقدم انجزت الدراسة الحالية لكي تسلط الضوء على تأثير هذا العقار على معاملة انقسام الخلايا الجسمية والمتمثلة بخلايا نقي العظم .

إستعراض المراجع Review of Literature

العقار سايكلو فوسفاميد Cyclophosphamide

يستخدم العقار Cyclophosphamide في علم المداواة الكيميائي بصورة شائعة وكعامل محصن للعديد من الطرائق العلاجية ضد امراض الاورام الخبيثة وبعض امراض المناعة المكتسبة . ويعود تصنيف هذا العقار الى مجموعة Alkylating حسب جدول تصنيف الادوية المضادة للسرطان (Anderson , 2002).

ويتطلب عقار السايكلوفوسفاميد تنشيطاً أيضاً في الكبد لغرض احداث فعله . أما اهم متأثيراته فهي (PAM) Phosphoramid mustard , Acrolein و (ALP) Aldophosphamide تعمل هذه المتأثيرات على تثبيط انقسام الخلايا الورمية وخلايا نقي العظم والخلايا اللمفاوية ، وذلك عن طريق التداخل مع الية انقسام الخلايا ، أو مع (DNA) الخلايا المنقسمة (Kown *et al*; 1987) وقد عُرف التأثير السمي الخلوي للعقار من خلال مختلف الفحوصات التي اجريت داخل جسم الكائن الحي وخارجه . ويعد عقار السايكلوفوسفاميد من المواد ذات التأثير المطفر و المسرطن فضلاً عن ذلك فإنه يُعد مسبباً للتشوهات الخلقية إذ أنه يرتبط بالحامض النووي DNA فقد توصل (Pieper *et al* 1989) الى أن هذا العقار له القابلية على الارتباط التساهمي مع مجموعة N7 الخاصة بقاعدة الكوانين وبالتالي ايقاف الاستنساخ في هذه المواقع بتأثير القنوات المتكونه بين العقار وشريط DNA .

ويؤدي العقار الى كسر وربط أشرطة ال DNA في الخلايا اللمفاوية لأشخاص مصابين باللويميا المزمنة وكذلك في خلايا نقي العظم للفئران الطبيعية (Deneve *et al* ,1989) .

وقد أشار Wilmer وجماعته (1986) الى دور متأثيرات العقار (4-OH-CP) و (PAM) في زيادة التبادل الكروماتيدي الشقيقي في الخلايا اللمفاوية للأنسان في الوسط الزرعى . وفي دراسة أُجريت داخل الجسم الحي بينت تأثير العقار في إحداث التبادل الكروماتيدي الشقيقي لخلايا كبد الجرذ حيث يحدث التلف نتيجة أخذ المطفر بالغذاء كما يحدث إنخفاض في معامل الإنقسام الخلوي وهو مرتبط بالتأثير السمي للعقار (Eckl *et al* ,1987) . كما تؤدي متأثيرات هذا العقار الى إحداث الطفرة النقطية (Mutation Point) في الأحياء المجهرية وزيادة التغيرات الكروموسومية وتبادل الكروماتيدات الشقيقة (SCE) لخلايا اللبائن خارج جسم الكائن الحي (*in vitro*) (جمعه ، ٢٠٠٤) .

وجد ان مادة Cyclophosphamide العلاجية تحطم الجريبة البدائية في المبيض ونتيجة لاستعمال الجرعات العالية التي تسبب عواقب تكاثيرية عكسية ومنها الانقطاع الطمثي السابق لوانه والعقم ايضا (Apperley & Reddy ,1995) .

وتشير الدراسات الى ان مادة Cyclophosphamide تزيد من حالات التشوهات الجنينية (Meirow *et al* , 1999) وتزايد ملحوظ في تغير الخلايا الجرثومية يكون الدواء اكثر سمية للانسان خلال الاشهر الثلاثة الاولى من الحمل وتحدث التشوهات الخلوية بعد الحقن (Meirow *et al* , 2001).

تعطى Cyclophosphamide بصورة أنموذجية عن طريق الفم بحبوب صغيرة بيضاء تحوي 50 mg او عن طريق الحقن داخل الوريد تمزج الجرعة مع ماء معقم مقطر او محلول ملحي فسيولوجي Normal saline ولكن هناك اثار جانبية عديدة وقد يتسبب في زيادة التسرطن في موقع ما من الجسم (Thomson , 2002). واثبتت التجارب بالاعتماد على وقت الحقن وموقعه بان المعالجة ب Cyclophosphamide يؤثر في القدرة المناعية للمضيف فضلا عن امتلاكه تاثيرا مباشرا على الورم (Yu *et al* , 1980).

اختبار معامل الانقسام الخلوي Mitotic index test :

معامل الانقسام هو دليل يتم حسابه كنسبه بين عدد الخلايا المنقسمة في المراحل الانقسامية المختلفة الى العدد الكلي للخلايا في عينة تضم (1000) خلية (Shubber and Al-Allak, 1986) ويستخدم معامل الانقسام الخلوي للكشف عن التأثير السمي الوراثي للعوامل الفيزيائية والكيميائية في الخلايا. حيث أن المواد المطفرة والمسرطنة غالباً ما تؤثر في عدد الانقسامات ومعامل الانقسام (MI) (Ford *et al*, 2002). أن هذا العامل يتأثر سلبياً بالمواد المطفرة والمسرطنة اذ أن معظمها يسبب انخفاضاً في معامل الانقسام سواء كان داخل الجسم أو خارج الجسم مثلما هو الحال في الاشعة المؤينة وعقاري (CP, MMC) (Shubber and Salih, 1988).

المواد وطرق العمل

Materials & Methods

الحيوانات المختبرية Laboratory Animals

لقد استخدمت ذكور الفئران البيض (Mus musculus) من الضرب (Balb/C) وبمعدل عمر يتراوح بين (٩-١٢) اسبوع وقد بلغ عدد حيوانات التجربة (١٢) فأر وزعت في اقفاص لدائنية بهيئة أربعة مجاميع كل مجموعة تضم ٣ فئران حسب حاجة التجربة .

المحاليل المستعملة :

تم تحضيرها حسب (Allen et al., 1977) :

1- دارئ الفوسفات الفسيولوجي (Phosphate Buffer Saline (PBS) .

2- محلول الكولجسين (10 ملغرام / كغم من وزن الجسم) Cholchicine_Solution .

3- محلول دارئ سورنسن Sorenson's Buffer

حضر المحلول بإذابة (7.08 غم) من مادة (Na_2HPO_4) و (6.74 غم) من مادة (KH_2PO_4) في (50 مل) من الماء المقطر ثم اكمل الحجم إلى (100 مل) بالماء مقطر وعقم بالموصدة وحفظ في الثلاجة (4 °م) .

4- محلول ناقص التوتر (Hypotonic Solution (0.075 M KCl) :

تم تحضير هذا المحلول بإذابة (2.85) غرام من كلوريد البوتاسيوم (KCl) في (٧٥) مل من الماء المقطر وكم اكمل الحجم إلى (500) مليلتر وحفظ في الثلاجة بدرجة (4) م° وسخن المحلول إلى (37) م° قبل البدء بالاستعمال .

5- محلول التثبيت Fixative Solution :

مزجت ثلاثة حجوم من الكحول المثلي المطلق (CH_3OH) مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي (CH_3COOH) وتم تحضيره أنياً وبرد في الثلاجة (4) م° قبل الاستعمال.

6- محلول صبغة كمزا Giemsa Stain Solution :

خلط 2 غم من مسحوق الصبغة مع 100 مل من الميثانول المطلق (Absolute Methanol) ، ثم سخن المزيج لمدة (١٠) دقائق على صفيحة ساخنة ورشح بواسطة ورق الترشيح، وحفظت في مكان مظلم، وهذا هو المحلول الاساس (Stock Solution)، وعند الاستعمال خلط حجم واحد من محلول الصبغة الاساس مع أربعة حجوم من المحلول المنظم (Sorenson's buffer (pH 6.8 للحصول على محلول الصبغة النهائي.

7- المحلول الخزين لعقار السايكلوفوسفاميد Cyclophosphamide

Solution
حضرت ثلاث تراكيز من عقار السايكلوفوسفاميد (150, 100, 50 ملغم/كغم) بالإعتماد على الجرعة المستعملة للإنسان (٥٠ ملغم/كغم) حيث اذيب 100 ملغم من مسحوق عقار السايكلوفوسفاميد (Germany) في ١٠ مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في الثلاجة (4 م°) ويعد هذا المحلول الأصل الذي تحضر منه بقية التخافيف .

وتم اعطاء العقار عن طريق حقن الفئران بـ ٠.١ مل من كل تركيز بالإضافة إلى فئران السيطرة

التي حقنت بمحلول داريء الفوسفات الفسيولوجي .

طريقة العمل :

قسمت حيوانات التجربة الى أربعة مجاميع:-

- 1- المجموعة الاولى:- حقنت حيوانات هذه المجموعة بمحلول داريء الفوسفات الفسيولوجي (سيطرة) .
- 2- المجموعة الثانية:- حقنت حيوانات هذه المجموعة بعقار السايكلوفوسفاميد (CP) بتركيز ٥٠ ملغم/كغم .
- 3- المجموعة الثالثة:- حقنت حيوانات هذه المجموعة بالعقار CP بتركيز ١٠٠ ملغم/كغم .
- 4- المجموعة الرابعة:- حقنت حيوانات هذه المجموعة بالعقار CP بتركيز ١٥٠ ملغم/كغم .

حقنت جميع حيوانات هذه المجاميع عن طريق البريتون وكان الحقن يوميا ولمدة ٥ أيام ، حيث شرحت الحيوانات في اليوم السادس وخصص ثلاث فئران لكل مجموعة .

وتم تحضير الشرائح من خلايا نقي العظم حسب طريقة (Allen et al., 1977) .

وتم استخراج معامل الانقسام (MI) حسب المعادلة الآتية :

عدد الخلايا المنقسمة

$$\text{معامل الانقسام (MI)} = 100 \times \frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{العدد الكلي للخلايا}}$$

العدد الكلي للخلايا

(Shubber & Al-Allak, 1986)

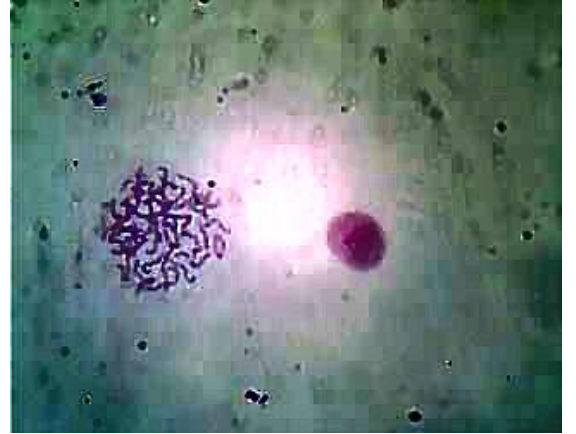
التحليل الإحصائي :

تم تحليل النتائج احصائيا باستخدام التصميم العشوائي CRD وثبتت القيم على شكل (المعدل $\pm$ الخطأ القياسي) ولمعرفة وجود فروق معنوية بين الجرعات المختلفة تم استخدام اختبار دنكن .

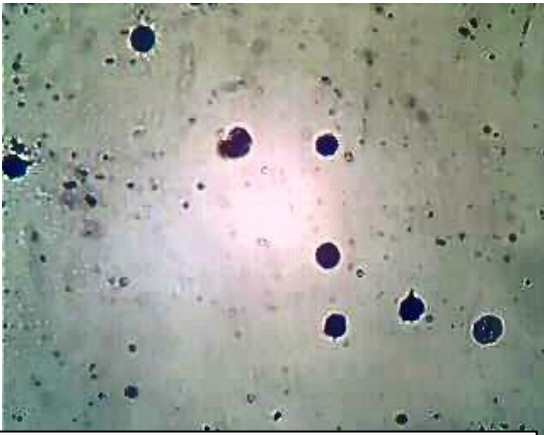
النتائج



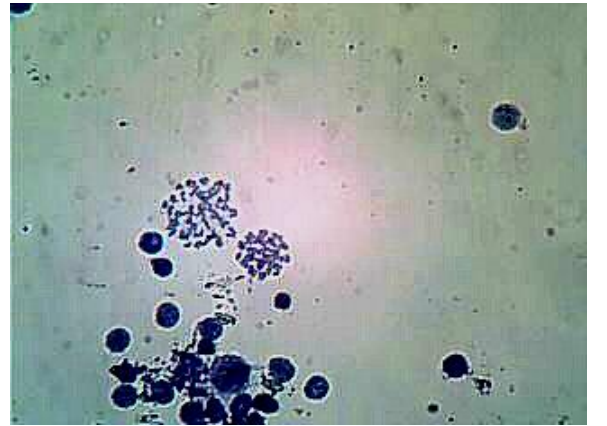
شكل (٢) يوضح نواة منقسمة وانوية



شكل (١) كروموسومات الفئران
غير منقسمة

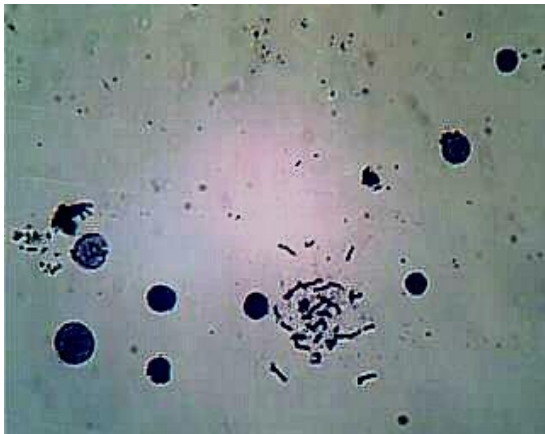


شكل (٤) انوية غير منقسمة



شكل (٣)

انوية منقسمة وغير منقسمة



شكل (٦) انوية غير منقسمة



شكل (٥) نواة منقسمة واخرى غير منقسمة

النتائج Results

معامل انقسام خلايا نقي العظم

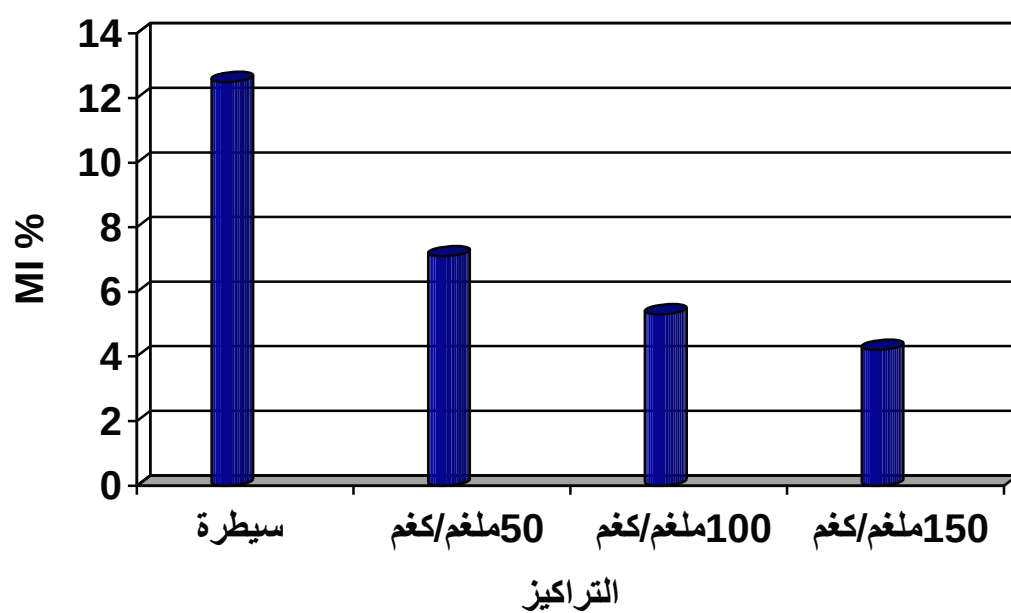
يبين الجدول رقم (١) بأن النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم في الفئران المعاملة بعقار Cyclophosphamide بدأت بالانخفاض بدءاً من التركيز (50 ملغم/كغم) حيث بلغت (٧.1%) في حين بلغت هذه النسبة (١٢.٥%) لمجموعة فئران السيطرة بحيث كان الفرق عالي المعنوية ($P < 0.01$).

أما المعاملة بالتركيزين (١٠٠ و ١٥٠) ملغم / كغم من وزن الجسم على التوالي فقد حدثت انخفاضاً عالياً في معدل معامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم حيث بلغ (٥.٣) و (٤.٢) على التوالي وشكل هذا الانخفاض فرقاً عالي المعنوية عند المقارنة بالتركيز ٥٠ ملغم/كغم ومع مجموعة السيطرة كما يلاحظ زيادة معدل الانخفاض بزيادة التركيز .

جدول (١) يبين النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم في الفئران المعاملة بالعقار CP وفئران السيطرة

المعاملة	معامل الانقسام $\pm$ الخطأ القياسي
السيطرة	0.30 ± 12.5 a
٥٠ ملغم/ كغم وزن الجسم	0.25 ± 7.1 b
١٠٠ ملغم/كغم وزن الجسم	0.74 ± 5.3 c
١٥٠ ملغم/ كغم وزن الجسم	0.23 ± 4.2 d

- الأرقام تمثل المعدل $\pm$ الخطأ القياسي .
- الحروف المختلفة تدل على وجود اختلافات معنوية بين المعاملات .



شكل (١) يبين النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم في الفرن المعاملة بالعقار CP وفرن السيطرة

المناقشة Discussion

لقد اظهرت النتائج بأن النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم بدأت بالإنخفاض بدءاً من التركيز (50 ملغم/كغم) وقد شكل هذا الإنخفاض فروقاً معنوية عالية بالمقارنة بالسيطرة وقد إستمر هذا الإنخفاض في معامل الانقسام في التراكيز (150,100 ملغم/كغم) مسجلاً فروقاً معنوية عالية بالمقارنة بالسيطرة وهذا الإنخفاض تناسب طردياً مع ازدياد التركيز مما يدل إن للعقار تأثير كبير على عرقلة سير عملية الانقسام الخلوي . وعند مقارنة هذه النتائج مع السيطرة نلاحظ بوضوح التأثيرات السمية الوراثية في الخلايا الجسمية للعقار (CP) من خلال قدرته على خفض معامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم حيث يعتقد انه يؤثر على عملية تكوين خيوط المغزل وهذا يتفق مع ما توصلت اليه دراسات كل من (الريعي، 2000؛ السعدي، ١٩٩٧) . إن هذه التأثيرات ناتجة عن إمتلاك متأيضات هذا العقار فعالية احداث تأثيرات مختلفة للمادة الوراثية (DNA) فهو يُعد عامل ألكله (Alkalyting agent) بينما يمتلك المتأيض (Acrolein) فعالية تثبيط انقسام الخلايا هذا فضلاً عن قدرته على زيادة نسبة الإنحرافات الكروموسومية بنسبة أعلى من المتأيضات الأخرى للعقار (Au et al;1985) كما أشارت بعض الدراسات أن لهذا العقار تأثيرات على كروموسومات الخلية محدثاً فيها تبادلاً كروماتيدياً شقيقياً يتناسب تردده والجرعة المتعرض لها الحيوان المختبري (Shubber& Salih, 1989) كذلك فقد شخّصت فعالية هذا العقار لاستحثاث الطفرة الجينية (Gene mutation) وتغيرات كروموسومية مختلفة للخلايا الجنسية الذكرية في مرحلة تكوين أرومات النطف (Spermatid) والنطف (Spermatozoa) (Jenkinson and Anderson , 1990). إضافة لذلك فإن العقار معروف بتسببيه للتشوهات الخلقية في البشر عند اعطائه بجرع عالية عن طريق الوريد للامهات الحوامل (حمدان، ٢٠٠٢) وأشارت العديد من الدراسات الى ان السايكلوفوسفاميد والعديد من العوامل العلاجية الكيماوية تسبب طفرات جينية وكسور كروموسومية واعادة ترتيبات Aneuploidy في الخلايا الجسدية فضلاً عن زيادة تردد الاورام الثانوية المرتبطة بالمعالجة في الناس المصابين بالسرطان (Sandoval et al , 1993) .

المصادر العربية

- الربيعي ، فرحة عبد علي (2000) دراسة القابلية التطفيرية والمضادة للتطفير لبعض النباتات الطبية العراقية في الفئران البيض . كلية التربية / ابن الهيثم ، جامعة بغداد ، رسالة ماجستير .
- السعدي ، محمد حمود محيسن (1997) . تثبيط تأثير التطفير الوراثي لبعض المسرطنات الكيميائية باستخدام مستخلص تمر الزهدي ، كلية التربية / ابن الهيثم.جامعة بغداد ، رسالة ماجستير .
- جمعة ، حمد جنداري ، ٢٠٠٤ . دراسة بعض التأثيرات المرضية لعقار Cyclophosphamide . المؤتمر الثالث للعلوم الطبية والحياتية / جامعة الزرقاء / الاردن.
- حمدان ، فؤاد قاسم ، ٢٠٠٢ . تأثير بعض العقاقير على عملية التعصبين واحداث تشوهات في جنين الفأر الابيض Mus musculus . اطروحة دكتوراه ، جامعة بغداد .

المصادر الأجنبية :

- Ad'hiah , A.H. ; Sayhood , Y.D,& Shubber, E.K.(2004) Inhibiting the haematologic and cytogenetic effects of tamoxifen by alcoholic extract of garlic (*Allium sativum*) . Nucleus , 47:10-16.
- Allen J.W. ; Shuler , C.F. ; Mendes , R.W.& Latt, S.A. (1977) A simplified Technique for in vivo analysis of sister chromatid exchanges using bromo- deoxy uridine tablets . Vytogent . Cell Genet . , 18:231-37
- Anderson, S.(200٤) . Alkylating agents.
[http://www.weber.edu/ewalker/Medicinalchemistry/topics/Anti-cancer/anti-c-1.htm#alkylating agents](http://www.weber.edu/ewalker/Medicinalchemistry/topics/Anti-cancer/anti-c-1.htm#alkylating%20agents) .
- Apperley, J. F. and Reddy, N. (1995). Mechanism and management of treatment – related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. Blood Rev., 9: 93-116.
- Au ,W., Sokova ,O.I., Kopnin ,B. and Arrlgh ,F.E. (1985) .Cytogenetic toxicity of Cyclophosphamide and its metabolites in Vitro .Cytogenetic .Cell Genet ., 26:108-116.
- Deneve ,W. ,Valeriotte , F.Edelstein ,M., Everett , C. and Bischoff ,M.(1989).In vivo DNA cross linking by cyclophmaide: comparision of human chronic lymphatic Leukemia cells. Cancer Res.,20:165-274.

- Eckl, P., Strom, S., Michalopoulos, C. and Jirte, R.(1987).
Induction of sister chromatid exchange
in cultured adult rat hepatocytes by
acting mutagens carcinogens. *Carcinogenesis*, 8(8): 1077-
1083.
- Ford, M.D., Delaney, K.A. and Ling, L.J. (2002). *Clinical Toxicology*.
Saunders Company, Philadelphia : 455-456.
- Internet, (2003), Flaxseed, by National center for Agri-Food Research
in medicine
Web. www.Sbrc.ca/ncarm/. July/10/2003.
- Jenkinson, P. and Anderson, D.(1990). Malformed fetuses and
karyotype abnormalities offspring of Cyclophosphamide
and allyl alcohol- treated male rats. *Mutation Res.*, 229:
173- 84.
- Kown, C., Maddison, K., Lacastro, L. and Broch, R. (1987) .
Accelerated decomposition of 4- hydroxy Cyclophosphamide by human
serum albumin . *Cancer Res.* , 47(6) : 1505-1508.
- Meirow, D., Lewis, H., Nugent, D. and Epstein, M. (1999). Subclinical
depletion of primordial follicular reserve in mice treated with
cyclophosphamide : clinical importance and proposed investigative
tool. *Hum. Reprod.*, 14: 1903-1907.
- Meirow, D., Epstein, M., Lewis, H., Nugent, D. and Gosden, R.G. (2001).
Administration of cyclophosphamide at different stages of follicular
maturation in mice : effects on reproductive performance and fetal
malformations. *Hum. Reprod.*, 16(4): 632-637.
- Pieper, R., Fustcher, B. and Erickson, L.(1989) . Transcription terminating
lesions induced by bifunctional alkylating agents in Vitro.
Carcinogenesis ., 19(7) :1307-1314 .
- Sandoval, C., Pui, C.H. and Bowman, L.C. (1993). Secondary acute
myeloid leukemia in children previously treated
agents, intercalating topoisomerase II with alkylating
inhibitors, and irradiation. *J. Clin. Oncol.*, 11: 1039-1045 .
- Shubber, E. and Al-Allak, B.(1986). Spontaneous chromosomal aberration
and SCE in human lymphocytes. 1-effects of culture conditions. *Nucleus*. 29:
92-98.

- Shubber, E. and Salih, H.(1988). Cytogenetic detection for interaction between drug and radiation .Nucleus. 31: 24-30.
- Thomson, H.C. (2002). Drug Information For The Health Care Professional. 22nd ed. (1), U.S. Pharmacopel Convention : 1102.
- Yu, S., Lannin, D.R., Tsui-Collins, A.L. and Mckhann, C.F. (1980). Effect of cyclophosphamide on mice bearing methylcholan threne-induced fibrosarcomas. Cancer Research., 40(8): 2756-2761.
- Wilmer , J., Exexon , G.and kligerman , A.(1986) .Attenation of cytotenetic by 2-marcapto ethansulfonate in culture human lymphocytes exposed to cyclophosphamide and its reactive metablites .Cancer Res .,46(1):203-210.

The effect of the chemotherapy of cancer on the mitotic index of the somatic cells in albino mouse

SUMMARY

This study has been designed to reveal the effect of the drug Cyclophosphomide ,which is used as chemotherapy for the treatment of the cancers tumer on mitotic index of bone marrow . By tested three different concentrations of drug which is (50 , 100 , 150) mg/kg , it was given to the albino mouse (*Mus musculus*) by injection for 5 days and count mitotic index of bone marrow cells .

The results of this study were summarized as the following :

1-The dose 50 Mg/Kg shows negative effects by decrease the rate of mitotic index of bone marrow cells in compared with the control .

2- The doses 100 and 150 Mg/Kg showed that a significant superior in compared with the control and the other groups by decreasing the mitotic index and this decrease by increasing the concentration .