دراسة التأثير التطفيري للأشعة فوق البنفسجية على بعض المؤشرات الوراثية في الفأر الابيض

تاريخ الاستلام 2015/2/1 تاريخ القبول 2015/5/5

فرات عبد الحمزه الشباني

جامعة القادسية /كلية التربية/قسم علوم الحياة

foratalshebani@gmail.com

الخلاصة :

هدفت الدراسة الحالية الى دراسة التاثيرات التطفيرية للأشعة فوق البنفسجية Ultra violet في الفئران البيض باستخدام المؤشرات الوراثية الخلوية مثل مؤشر دليل الانقسام الخيطي (MI)بالإضافة الى الانحرافات الكروموسومية لخلايا نقي العظم بعد تشعيع الحيوانات بفترات تعريض للأشعة فوق البنفسجية Ultra violet لمدة 0 و 15 و30 و 45 دقيقة ،اظهرت النتائج عدم وجود فروق معنوية عالية بين دليل الانقسام للمعاملة T15 عند المقارنة مع مجموعة السيطرة الغير مشععة حيث بلغ دليل الانقسام 10.5بينما بلغ 10.7 في مجموعة السيطرة كما سببت المعاملاتT30 و T45انخفاضا معنوياً في دليل الانقسام حيث بلغ 8.3 و7.6 على التوالي مقارنة بالسيطرة كما حصل ارتفاع طفيف وغير معنوي في معدل الانحرافات الكروموسومية في المعاملة T15 بلغ 0,8 عند المقارنة مع مجموعة السيطرة الغير مشععة والتي بلغت 0.7 بينما اظهرت المعاملة T45 تفوقاً معنوياً على بقية المجاميع الأخرى في زيادة معدل الانحرافات الكروموسومية حيث بلغ 2.7 وازداد معدل الانحرافات بزيادة فترة التعريض .

Biology Classification QP$_1$ -981

كلمات مفتاحية : اشعة فوق بنفسجية ، تأثير تطفيري ، معامل انقسام

المقدمة

تعد الاشعة فوق البنفسجية احد انواع الاشعة غير المؤينة وهي جزء من الطيف الشمسي الكهرومغناطيسي حيث ينبعث جزء من الطاقة الصادرة عن الشمس بشكل امواج كهرومغناطيسية وبأطوال موجية عديدة ذات طاقات مختلفة تمتد من اشعة كاما القوية الطاقة مرورا بالاشعة تحت الحمراء الحرارية وصولا الى الترددات الراديوية وتكون الاشعة فوق البنفسجية بأطوال موجية اقل من 400 نانومتر تشكل الأشعة فوق البنفسجية 5% من الطاقة الشمسية ولكن تعد الجزء الأكثر ضررا على الكائنات الحية . [1]

وتقسم الاشعة فوق البنفسجية الى ثلاثة انواع :

أ- **الاشعة من نوع A**: الأكثر إنتشاراً فوق سطح الأرض على مدار السنة تتميز بقدرتها على اختراق أعماق الجلد البشري مؤذيةً بذلك خلايا النسيج الضّام مما يؤدي إلى الشيخوخة المبكرة, والتجاعيد العميقة، وخطورة الإصابة بالتحسس الضوئي، وأشكال مختلفة من سرطان الجلد.

ب- **الاشعة من نوع B**: تعتبر أقل غزارة, و اختراقها للجلد يكون أقل عُمقاً مقارنة مع **UVA** كما أنها مسؤولة عن احتراق الجلد.

ج- الاشعة من نوع C: تعتبر الأشد خطورة على الإنسان والحيوان والنبات من بين أنواع الأشعة الفوق بنفسجية, لاتنفذ الى سطح الارض بفضل طبقة الأوزون, ولكن نتيجة عوامل التلوث التي أدت إلى تلف طبقة الأوزون أصبحت هذه الأشعة تنفذ من خلال الغلاف الجوي وبالتالي مزيد من الأضرار والمخاطر على الأحياء فوق سطح الأرض. [2]

تعمل طبقة الأوزون (O_3) الجوي على منع وصول الأشعة فوق البنفسجية ذات التأثير الضار بالكائنات الحية إلى الأرض، إلا أن ازدياد التآكل في طبقة الأوزون في العقدين الأخيرين بسبب انطلاق المزيد من غازات الكلور و الفلور و الكاربون مما أدى إلى وصول المزيد من هذه الأشعة وظهور تأثيرها المدمر على العديد من الكائنات الحية على سطح الأرض[3]. وتعد المادة الوراثية احد الاهداف الرئيسية لهذه الاشعة رغم قيام الكائنات الحية بتطوير عدة ميكانيكيات لأصلاح المادة الوراثية لتلافي الضرر الحاصل في المادة الوراثية [4]تؤثر الأشعة فوق البنفسجية على البروتينات المكونة لجسم المغزل كما تؤثر على القواعد البيرميدينية وينتج عنها مزدوجات Dimers نتيجة ارتباط اثنين من قواعد الثايمين [5]كذلك تقوم أشعة UV بتكوين إضافات Adducts بين قاعدتي أدنين متجاورتين -8,8 adenine dehydrodimer او بين قاعدتي ادنين وثايمين متجاورتين , وكل تلك الاعطاب الضوئية قد تؤدي إلى نشوء الطفرة [6] . ان حوالي 75–90% من ثنائيات البيرميدين يتم إصلاحها عن طريق نظام التفاعل الضوئي Photoreactivation repair بفعل إنزيمات التفاعل الضوئي Photolyase , كما يلعب نظام الإصلاح بالقص Excision repair بأنواعة دورا مهما في إصلاح الاعطاب الضوئية التي تحدثها الأشعة فوق البنفسجية في جزيئة الـ DNA [7]. ويعتقد كثير من الباحثين ان التأثير الاولي لهذه الاشعة يظهر في تحطيم بعض البروتينات التركيبية للغشاء البلازمي مما يؤدي الى احداث خلل في نفاذية هذا الغشاء [8]وتموت الخلايا عندما تكون فترات التعرض لهذه الاشعة طويلة ويعزى الموت في هذه الحالة الى تحطم وتوقف عدد كبير من العمليات الحيوية بشكل متزامن [9]ونظرا لقلة الدراسات التي تناولت التأثيرات التطفيرية لهذا النوع من الاشعة على المستوى الخلوي لذا صممت هذه الدراسة لغرض الكشف عن تأثير الأشعة فوق البنفسجية على دليل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم في الفئران البيض بالاضافة الى الانحرافات الكروموسومية .

المواد وطرائق العمل :

الحيوانات المختبرية المستعملة :

استخدم في هذه التجربة ذكور الفئران المختبرية البيضاء من الضرب (Balb/C) وبمعدل عمر يتراوح بين(10-12) أسبوع وبوزن(25±2) غرام تم الحصول عليها من البيت الحيواني التابع لقسم علوم الحياة في كلية التربية /جامعة القادسية ووزعت في أقفاص بلاستيكية الى اربعة مجاميع وتم إعطاء الحيوانات الماء والعليقة المتكاملة ثم قسمت 20 فأر الى اربعة مجاميع تم تعريضها بشكل يومي ولمدة 7 أيام وبفترات مختلفة للتشعيع بـ UV (0 ، 15 ، 30 ، 45 دقيقة) ورمز للفترات اعلاه بالرموز (control و T15 و T30 و T45) باستعمال جهاز الأشعة فوق البنفسجية (Ultra violet source) نوع Philips هولندي الصنع ثم شرحت الحيوانات في اليوم الثامن .

تحضير الكروموسومات :

تم تحضير الكروموسومات من خلايا نقي العظم حسب طريقة Allen *et al.,* [10] وكما ياتي:

1-حقنت الفئران المختبرية بـ 0.1 مليلتر محلول الكولجيسين (0.5 ملغرام/مليلتر) عن طريق الحقن في غشاء الخلب(Intraperitoneal Injection) ثم تركت لمدة ساعتين .

2-قتلت الحيوانات بطريقة فصل الفقرات العنقية وشرحت مباشرة وقص الجلد فوق منطقة الفخذ وأزيلت العضلات حول عظم الفخذ(Femur) ثم قطع ارتباطه بمفصلي الحوض والركبة.

3-استخراج نقي العظم بوساطة محقنة نبيذة ، اذ حقن5 مليلتر من دارئ الفوسفات الفسيولوجي(PBS) الذي درجة حرارته 37 م° وذلك بحقنه بالعظم.

4-وضع نقي العظم بالأنابيب الخاصة بجهاز الطرد المركزي ومزجت جيداً ثم نبذت بسرعة 2000 دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق وتم تكرار هذه العملية مرتين.

5-أهمل الرائق واخذ الراسب واضيف له(5) مليلتر من محلول ناقص التوتر (كلوريد البوتاسيوم 0.075 مولاري) ذو الدرجة الحرارية 37 م° ثم مزجت محتويات الأنابيب جيداً وتركت في حمام مائي بدرجة 37 م° لمدة 20 دقيقة مع الرج بين مدة وأخرى.

6-نبذت الأنابيب بسرعة(2000) دورة في الدقيقة ولمدة 10 دقائق واخذ الراسب واهمل الرائق واضيف له المحلول المثبت (البارد والمحضر آنياً) وبالتدريج على شكل قطرات تنسال على الجدار الداخلي للانبوبه مع الرج المستمر الى ان اكمل حجم المحلول المثبت المضاف الى 5 مليلتر.

7-حضنت الأنابيب في الثلاجة بدرجة حرارة 4 م° لمدة نصف ساعة لغرض تثبيت الخلايا ، ثم نبذت الخلايا بسرعة 2000 دورة في الدقيقة لمدة 10 دقائق ، اخذ الراسب واهمل الرائق وتم تكرار هذه العملية مرتين ، وعلقت الخلايا في 2 مليلتر من المحلول المثبت.

8-مزجت محتويات الأنبوبة جيداً ومن ثم تم إسقاط بضع قطرات من محتويات الأنبوبة على شريحة زجاجية نظيفة وبمعدل 4-5 قطرات بصورة عمودية على الشريحة ومن ارتفاع مناسب 3 أقدام لإتاحة الفرصة للانوية والكروموسومات بالانتشار بشكل جيد ، ثم جففت الشرائح الزجاجية على صفيحة ساخنة 50 م°.

9-صبغت الشرائح بصبغة كمزا لمدة 15 دقيقة ثم غسلت بالماء المقطر وتركت بعد ذلك لتجف (حضرت لكل حيوان 4 شرائح) .

10-تم فحص الشرائح تحت المجهر الضوئي الاعتيادي ، إذ تم حساب 1000 خلية وحسبت الخلايا المنقسمة والخلايا غير المنقسمة منهما وتم استخراج دليل الانقسام (MI) حسب المعادلة آلاتية :

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

كما تم حساب الانحرافات الكروموسومية بعد ان فحصت على الاقل 100 خلية واضحة في الطور الاستوائي من الانقسام وباستعمال العدسة الزيتية وشملت الانحرافات الكروموسومية: الكسر الكروماتيدي والكروموسوم الحلقي [11] .

التحليل الإحصائي Statistical Analysis

تم تحليل النتائج باستخدام البرنامج الإحصائي الجاهز SPSS وقورنت الفروق المعنوية بين المتوسطات بأختبار أقل فرق معنوي (Least Signifcant (L.S.D Difference وثبتت القيم على شكل (المعدل ± الخطأ القياسي).

النتائج والمناقشة

دليل الانقسام الخيطي في خلايا نقي العظم

تمت دراسة انقسام خلايا نقي العظم في الطور الاستوائي وذلك لبيان مدى تاثير فترات التعريض للأشعة فوق البنفسجية في دليل الانقسام الخيطي (MI) يبين الجدول (1) عدم وجود فروق معنوية بين دليل الانقسام للمعاملة T15 عند المقارنة مع مجموعة السيطرة الغير مشععة حيث بلغ دليل الانقسام 10.5بينما بلغ 10.7 في مجموعة السيطرة كما وجد انخفاض معنوي في دليل الانقسام الخيطي عند مستوى الاحتمالية($P \leq 0.05$) لفترتي التعريض T30 و T45 حيث بلغ دليل الانقسام لهما 8.3 و 7.6 وكانت الفروق معنوية بالمقارنة مع معاملة السيطرة (الشكل 1) ، ويلاحظ ان زيادة في فترة التعريض قد ادت الى زيادة الانخفاض المعنوي في دليل الانقسام الخيطي للخلايا ،لقد ذكر [12] ان الاشعاع يسبب انخفاضا في معامل الانقسام الخيطي في خلايا نقي العظم وذلك عن طريق تاخير انقسام الخلايا في طور تخليق الـ DNA (طور S) من دورة حياة الخلية ويزداد الضرر بزيادة فترة التعريض وان عمليات الاصلاح التي تتم في جسم الكائن الحي لن تستطيع الرجوع بدليل الانقسام الى القيم الطبيعية اذ وجد [13] انه بعد زيادة التعرض للاشعاع المفاجئ سوف يتم توزيعه بشكل عشوائي على اعضاء الجسم المختلفة مع حدوث زيادة في الاضرار الناتجة .

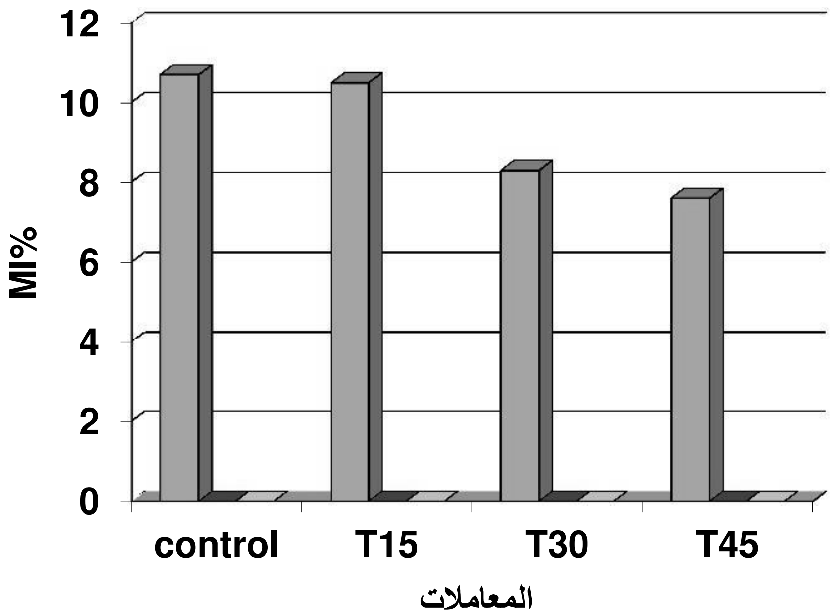
أن خلايا نقي العظم هي اكثر الخلايا الجسمية نشاطاً من ناحية الانقسامات لكون هذا النسيج هو الذي يعطي انواعاً كثيرة ومختلفة من خلايا الدم وفي مراحل مختلفة من دورة حياة الخلية ويتأثر معامل الانقسام الخلوي بالمواد الكيميائية والفيزيائية ومنها الاشعاع ويعتمد التأثير على الجرعة ومقدارها وطريقة التشعيع وعلى المرحلة التي تستلم فيها الخلية الاشعاع وفترة الفحص بعد التشعيع [14].

ان هذه النتائج تتفق مع ما توصل اليه عدد من الباحثين [15 و 16] في هذا المجال والتي افادت إلى ان معامل الانقسام الخيطي ينخفض عند زيادة الجرعة الإشعاعية لذا يستخدم معامل الانقسام لبيان التأثير السمي الوراثي للعوامل الفيزيائية .

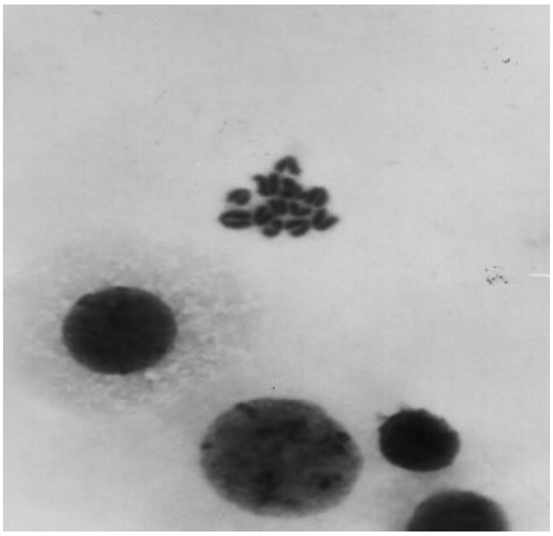
جدول (1) تأثير فترات التعريض للأشعة فوق البنفسجية في معامل الانقسام الخلوي لخلايا نقي العظم للفئران البيض .

المعاملة	معامل الانقسام	±	الخطأ القياسي
Control	10.7[a]	±	.081
T15	.5[a]10	±	.730
T30	8.3[b]	±	.481
T45	7.6[b]	±	.361

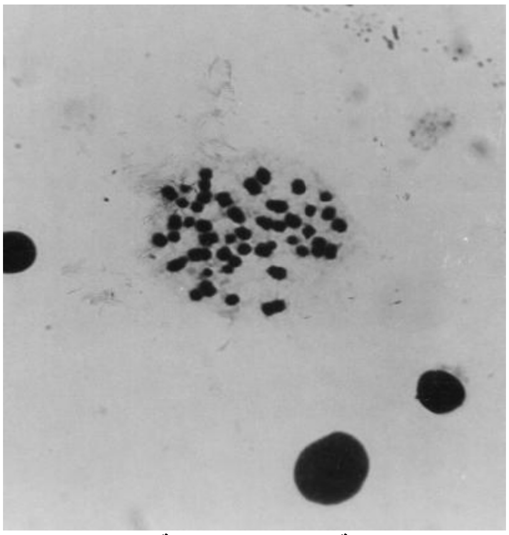
الحروف الإنگليزية المختلفة ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية تحت مستوى إحتمال (P< 0.05) .



شكل (1) تأثير التشعيع بالاشعة فوق البنفسجية على معامل انقسام خلايا نقي العظم للفئران البيض



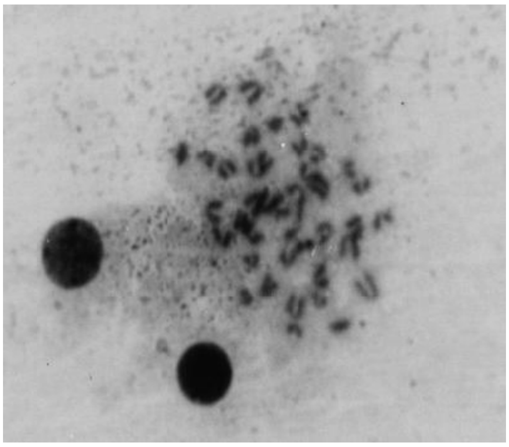
مصور (1) يوضح انوية منقسمة واخرى غيرمنقسمة



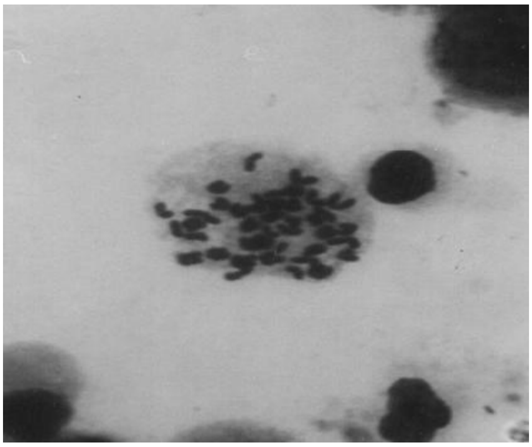
مصور(2) يوضح نواة منقسمة واخرى غير منقسمة

اختبار الإنحرافات الكرموسومية CA

شملت هذه الانحرافات الكسرالكروماتيدي والكروموسوم الحلقي اذ يوضح الجدول (2) وجود فروق طفيفة بين معدل الإنحرافات الكرموسومية عند استعمال فترات التعريض المختلفة للأ شعة فوق البنفسجية على خلايا نقي العظم إذ بلغت قيمة CA للمعاملتين T15 و T30 0.8 و 1.2 على التوالي ولم تشكل فرقا معنويا عند المقارنة بالسيطرة والبالغة قيمة CA لها 0.7 اما المعاملة T45 فقد سببت ارتفاع معنوي في قيمة (CA) حيث بلغت 2.7 ($P< 0.05$) وهذا يتفق مع ما توصلت اليه بعض الدراسات التي اشارت أن معظم المواد الفيزيائية والكيميائية تمتلك القدرة على استحثاث الإنحرافات الكرموسومية [15 ، 17 ،18] . إن هذه التأثيرات ناتجة عن إمتلاك الاشعة فوق البنفسجية فعالية احداث تأثيرات مختلفة للمادة الوراثية (DNA) ويعود سبب التأثيرات السمية والتطفيرية للأشعة الى قدرتهاعلى التداخل مع المادة الورثية الـDNA مما ينتج عنه اعتراض عملية اصلاح التلف التلقائي في جزيئة الـ DNA أضافة الى ذلك فانه يؤدي الى حدوث تلف في هذه الجزيئة مما يقود الى حدوث تغيرات كروموسومية [19] . او أن تأثير الاشعة قد يكون مباشراً في جزيئة الـ DNA باحداث كسور في شريطي الـ DNA عن طريق تأين الجزيئات وتكوين الايونات الحرة H^+, OH^- ويعد ايون الهيدروكسيل اكثر الايونات تأثيراً [12] .وقد يكون تأثير الاشعة عن طريق تدمير الاجسام الحالة وتحرر الانزيمات المحللة للمادة النووية وهذه الانزيمات لها القدرة في احداث كسور في الحوامض النووية [20] .



مصور(3)كروموسومات الفئران الطبيعية

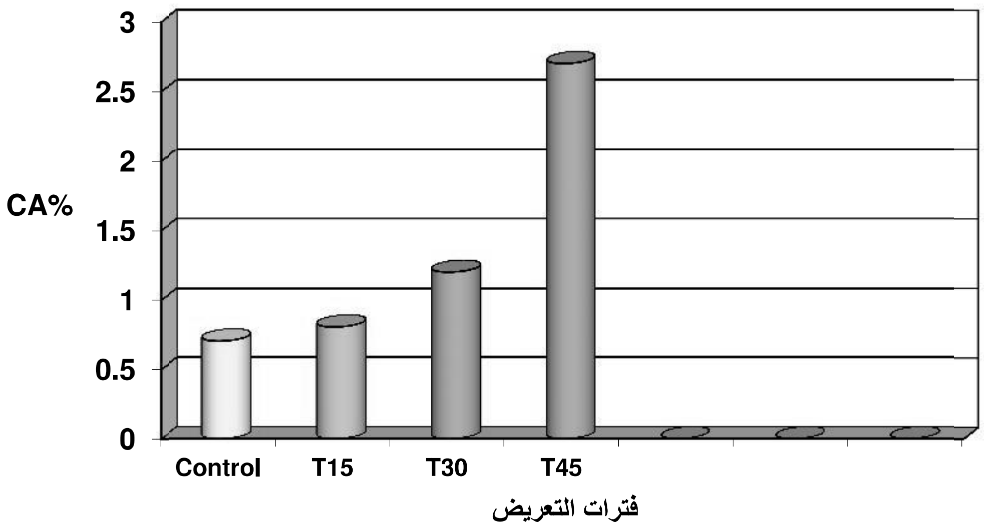


مصور(4)كروموسومات الفئران المشععة بالـ UV

جدول (2): معدل الإنحرافات الكروموسومية لخلايا نقي العظم في الفئران المشععة وحيوانات السيطرة

المجاميع	المعاملات	الانحرافات الكروموسومية	
		المعدل	الخطأ القياسي
الأولى	Control	0. 7 a	0.20 ±
الثانية	T15	0.8 a	0.04 ±
الثالثة	T30	1.2 a	0.09 ±
الرابعة	T45	2.7 b	0.34 ±

- الحروف الإنكليزية المختلفة ضمن العمود الواحد تعني وجود فروق معنوية تحت مستوى إحتمال (P< 0.05) .



شكل (2) تأثير فترات تعريض مختلفة من الاشعة فوق البنفسجية في الانحرافات الكرموسومية (CA) لخلايا نقي العظم للفئران البيض

References المصادر

1- الفكجي , تغريد حـــازم صابر عبد الله (2003). دراسة مجهرية مقارنة ، وتاثير بعض الاشعة الكهرومغناطيسية ، في التركيب النسيجي لشبكية العين في نوعين من الاسماك العظمية : السنك Chalcalburnus mossulensis و لخ انكورة Noemacheilus angora. رسالة ماجستير .كلية التربية. جامعة الموصل .

2- Otero, S. ; Nunez, E.; Martinez, J. ; Tomas ,R.; Arroniz ,M., N.(2006). Effect of radiation on the cadmium and enhanced UV physiology and the concentration of UV-absorbing compounds of the aquatic liverwort exsertifolia subsp. Cordifolia. Jungermannia 766-769. Photochem. Photobiol. Sci. 5:

3-Klisch ,M,Haeder,D,P.0(2001) Effects of UV radiation on phytoplankton). Trends in photochemistry& photobiology, Vol. 8, 137-143.

4-. Danon, A.; Rotari. V. I.; Gordon ,A.; Mailhac, N. and Gallois, P. (2004) Ultraviolet-C overexposure induces programmed cell death in Arabidopsis, which is mediated by caspase-like activities and which can be suppressed by caspase inhibitors, p35 and Defender against Apoptotic Death. J. Biol. Chem. 279: 779-787.

5- Caasi-Lit, M. ; Whitecross, M.I. ; Nayudu, M and Tanner, G.J. (1997). UV-B irradiation induced differential leaf damage, ultrastructural changes and accumulation of specific phenolic compounds in rice cultivars. Aust. J. Physiol. 24: 261-274.

6-Cadet J, Douki T, Sage E (2005) Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. Mutat Res 571:3–17

7-Kozmin S, Slezak G, Reynaud-Angelin A, Elie C, de Rycke Y, Boiteux S, Sage E. UVA radiation is highly mutagenic in cells that are unable to repair 7,8-dihydro-8-oxoguanine in Saccharomyces cerevisiae. Proc Natl Acad Sci U S A.2005 Sep 20;102(38): 13538-13543.

8- Tevini,m,termura,a,h.(1989)uv-b Effects on terrestrial plants photochem.photobiol,vol.50,487-497.

9-Van Laethem, A., Garmyn, M., Agostinis, P. (2009)Starting and propagating apoptotic signals in UVB irradiated keratinocytes. Photochem Photobiol Sci. ;9:299–308.

10-Allen, J., Shuler, C. F.; Mendes, R. W. and Latt. S. A. (1977) Asimplified techingue for in vivo analysis of sister chromatid exchanges using 5-bromo – deoxy uridine tablets. Cytogent Cell Genet. 18: 231-239.

11-Shubber, E. and Al-Allak, B.(1986). Spontaneous chromosomal aberration and SCE in human lymphocytes. 1-effects of culture conditions. Nucleus. 29: 92-98.

12-Cadet J, Douki T, Ravanat J-L (2010) Oxidatively generated base damage to cellular DNA. Free Radic Biol Med. 49:9–21

13- Yarmonenko, S. P. (1988) .Radiobiology of humans and animals. Mir publishers Moscow.p 138.

14-Durante, M., Gialanella, G., Grossi, G. F., Nappo, M., pugliese, M., Bettega, D., Calzolari, p., chiorda, G.N., ottolenghi, A. and (1994). Radiation Tallane. Lombardi, L. induced chromosomal aberration in mouse 10T ½ cells: Dependence on the cell cycle Radiat. stage at the time of irradiation. Int. J. Biol. 5 (4): 437-447.

15- الكبيسي ، روعة عدنان فرج عاشور.(2002) دراسة الفعالية التثبيطية لمستخلصات عرق السوس *Glycyrrhiza glabra* L في تأثير الاشعاع في الفئران المختبرية . رسالة ماجستير . معهد الهندسة الوراثية جامعة بغداد.

61- Moriwaki S, Takahashi Y. Photoaging and DNA repair. J Dermatol Sci. 2008Jun;50(3):169-76.

17 -الربيعي ، عباس حسين. (1999). تأثير مستخلصات الثوم في تثبيط الفعل التطفيري لفوسفيد الخارصين وأشعة كاما في الفئران البيضاء. رسالة دكتوراه. كلية العلوم . جامعة بابل.

-Kamae , N.,Narita,H.& Hibino, .(1997) . 81
Morphology and origin of micronuclei induced by mitotic inhibitors. Yokugaka zassh:.117:49-58.

19-Li ,G.M. (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. Cell Res.. 18(1):85-98.

20- Ryu, H.C., Kim, C., Kim, J.Y., Chung,
induces J.H., Kim, J.H.(2010).UVB radiation
apoptosis in keratinocytes by activating a
reactive oxygen pathway linked to BLT2-
species. J. Invest Dermatol. ;130:1095–1106.

Study The mutagenic effect of Ultra violet on some Genetic indices in albino mouse

Receved :1/2/2015 **Accepted :5/5/2015**

Forat Abd Alhamzah Alshebani
Al-Qadissya University/ Collage of Education
Biology Department
foratalshebani@gmail.com

Abstract

The present study aimed to study the mutagenic effect of ultra violet in albino mice by use some genetic indicators such as mitotic index(MI) and chromosome aberrations(CA) of bone marrow cells after exposure the animals to periods of Ultra violet irridation (0, 15,30,45)minute , The result showed non high significant difference in mitotic index of bone marrow cells in treatment T15 as compared with the control while the treatment T30 ,T45 caused a significant decreasing in mitotic index that reach to 8.3 , 7.6 as compared with the control. The treatment T15 caused non significant difference in chromosomal aberrations as compared with the control while the treatment T45 caused high significant difference as compared with the control and the other groups by increasing the rate of chromosomal aberrations that reach to 2.7 and the rate of aberration increase by increasing of exposure periods.

Key wordes : Ultraviolet , mutagenetic effect, mitotic index.