تأثير الإطعام طويل الأمد بجذور الجزر (*Daucus carota*) في بعض المؤشرات الوراثة الخلوية في الفئران البيض

الهام عبد الهادي خلف زهرة محمود الخفاجي *
معهد الهندسة الوراثية والتقنية الحيوية للدراسات العليا / جامعة بغداد / العراق
* العنوان الحالي : قسم علوم الأغذية / كلية الزراعة / جامعة الموصل / العراق .

الخلاصة

تم دراسة تاثير الاطعام الطويل الامد بالجزر (مدة شهرين) على بعض المؤشرات الوراثية الخلوية لخلايا نقي عظام الفخذ في الفئران البيض ومنها قياس معامل الانقسام وحث تكون النوى الصغيرة وقياس التشوهات الكروموسومية ، وكذلك التاثير على الخلايا التكاثرية (النطف) من حيث اعداد النطف المشوهة وانواع التشوه ، ومقارنة ذلك بما يستحث بالعقار Cyclophosphamide (Cp) من اضطرابات على هذه المؤشرات . أوضحت النتائج ان العقار يؤدي الى خفض معامل الانقسام بنسبة ٤٤ % من القيم الطبيعية (٦.٨٤) ، اما الاطعام المتزامن للعقار والجزر (Ca+Cp) لمدة شهرين فادى الى استرجاع ٩٢.٤ % من القيمة الطبيعية ، في حين ان اعطاء الجزر قبل العقار (Ca/Cp) أدى الى العودة بقيم المعامل الى ٧٤ % من القيمة الطبيعية ، واعطاء العقار لمدة شهر ثم اعطاء الجزر لمدة شهر (Cp/Ca) فقد ادى الى استرجاع ٨٨.٩ % من القيم الطبيعية . وأدى العقار الى حث النوى الصغيرة بمعدل ١٧ مرة بقدر القيم الطبيعية (١.٠٦) ، وادت المعاملات المذكورة آنفا الى إنقاص عدد النوى الصغيرة بنسب تراوحت بين ٣.٨ – ٦.٧ مرة وكانت أفضلها المعاملة (Ca/Cp) . كما ادى استعمال العقار لمدة طويلة الى زيادة عدد الكروموسومات المشوهة الى (١٠) أضعاف القيم الطبيعية (١.٦٢) في حين انخفضت القيم الى ٢٤.٥ – ٢٩.٨ % من قيمة السيطرة الموجبة (١٧) عند استعمال المعاملات المختلفة ، وانسحب التاثير على أنواع التشوهات ، وبقيت الكروموسومات ثنائية المركز عالية القيم ولكنها اقل من السيطرة الموجبة وبفروق معنوية (P<0.01). اما تاثير العقار لمدة شهرين فقد زادت تشوهات رؤوس النطف الى (١٨) ضعف القيم الطبيعية (١.١٥) وقد أدت المعاملات المختلفة الى تقليل عدد التشوهات ولكنها لم تصل بها الى القيم الطبيعية وبقيت ذات فروق معنوية (P<0.01) ، ولكنها فرقت عن السيطرة الموجبة معنويا ، وانسحب هذا التأثير على أنواع تشوهات رؤوس النطف المستحثة بالعقار .

المقدمــة

يعد التلوث من اهم اسباب السرطان خاصة التلوث الذي تحدثه الحروب المتطورة والتطور الصناعي ، واستمرار التعرض للملوثات التي تكون بمستويات غير سامة يؤدي بالنتيجة الى اضرار كبيرة وربما فقدان بعض الانواع الحية من البيئات الملوثة (Murty ، ١٩٨٨) . وفي بعض الاحيان يكون من غير الممكن تجنب الملوثات والمطفرات كما هو الحال مع المطفرات والمسرطنات الغذائية مثل الأمينات متباينة الحلقات Heterocyclic amines التي تنتج من طبخ الأغذية البروتينية (Kassie واخرون ، ٢٠٠٣) وكذلك استعمال بعض العقاقير مثل Cyclophosphamide (Cp) الذي يستعمل في علاج بعض السرطانات ولكنه من المواد التي تسبب التسمم الوراثي Genotoxic (Ghaskadbi واخرون ، ١٩٩٢) خاصة بعد ان يتعرض لعمليات الايض داخل الجسم والتي تنتج مسرطنات نهائية (Stoltz ، ١٩٨١) .

ومن جهة ثانية تشير الدراسات الوبائية الموسعة الى ان للعديد من الاغذية تاثير ايجابي في الحد من التطفير والتسرطن (Knudsen ، ١٩٨٦) اذ انها تزود الجسم وخاصة الطازجة منها بالعديد من الكيمياويات النباتية مثل الفيتامينات والكاروتينات والصبغات التي تشارك في العمليات الخلوية التي تضاد التاثير ، ولكن تحدث عمليات التسرطن عندما لا يكون هناك توازنا بين المسرطنات مثل الامينات الحلقية والهيدروكاربونات متعددة الحلقات ومضاداتها (Goldman و Shields ، ٢٠٠٣) . ومن الاغذية المعروفة بتاثيرها المضاد للتطفير والتسرطن هو الجزر *Daucus carota* (الجذور) الــــذي يعـــود الـــى

تاريخ تسلم البحث ٢٠٠٨/١/٢ وقبوله ٢٠٠٨/٦/١٩

العائلة الخيمية Umbelliferae ، ويحوي على العديد من المركبات الفعالة مثل الفلافونات والكلايكوسيدات والكومارينات والتربينات ، اضافة الى ان زيت الجذور يحوي على حوامض دهنية مهمة (الزركاني ، ١٩٩٩ و Evans ، ٢٠٠٢) . وتدرس التاثيرات الضارة للمواد بدراسة بعض المؤشرات في خلايا الكائن الحي واغلبها تنضوي تحت الدراسة الوراثية الخلوية Cytogenetics لأنها تمثل المقياس العام للتاثيرات التي تحدث على جينوم الخلايا وهي طريقة ملائمة للدراسة (Legator و Rinkus ، ١٩٨١) ، ومنها تسجيل معامل الانقسام الخلوي Mitotic index (MI) الذي يتاثر سلبا بالمطفرات والمسرطنات (Shubber و Al-Allak ، ١٩٨٦) لذلك يستعمل العقار Cyclophosphamide لمعالجة بعض السرطانات وهو من Cytostatic drugs اذ يتداخل مع آلية الانقسام الخلوي (Belisario واخرون ، ١٩٨٥) . ومن المؤشرات الاخرى استعمال فحص تكون النوى الصغيرة والتي تكون ناتجة عن تكسر الكروموسومات او من اضطراب جهاز الانقسام المغزلي Mitotic spindle apparatus (Heddle واخرون ، ١٩٨٣) ، والمؤشر المهم الاخر هو تسجيل التشوهات الكروموسومية Chromosomal aberrations الذي يعد من الاختبارات الوراثية المهمة التي تكشف عن حدوث خلل في الكروموسومات ويمكن ان يحدث تلقائيا (Hsu واخرون ، ١٩٨١) او بتأثير المواد المطفرة (Thompson واخرون ، ١٩٩١) . واختبار تشوهات رؤوس النطف يعد ايضا من الاختبارات المهمة خاصة عندما تكون تراكيز المواد اقل من التراكيز التي تؤدي الى التسمم (Whorton واخرون ، ١٩٧٧ و Sandifer واخرون ، ١٩٧٩) وذلك لان النطف تكون ذات طبيعة خاصة وتحوي على مواد وراثية بشكل أساسي وتخلو من معظم مقومات الخلية الاخرى (Phillips ، ١٩٧٤) .

واستهدفت الدراسة الحالية ، دراسة تاثير الاطعام طويل الامد لكل من المطفرات المتمثلة بالعقار Cp وتاثير الاطعام الطويل الامد بالجزر على عدد من المؤشرات المذكورة اعلاه والمتمثلة بقياس معامل الانقسام وتكون النوى الصغيرة واعداد التشوهات الكروموسومية وانواعها وكذلك اعداد وانوا تشوه رؤوس النطف .

مواد البحث وطرائقه

حيوانات التجربة : استخدمت ذكور الفئران السويسرية البيض *Mus musculus* الضرب Balb/C بمعدل عمر بين ٨ – ١٢أسبو وبوزن ٢٥ ± ٢ غرام جهزت من قبل كلية العلوم / جامعة بغداد . وزعت الحيوانات في أقفاص بلاستيكية بهيئة مجاميع وحسب حاجة التجربة في غرفة تراوحت درجة حرارتها ٢٣ – ٢٥° م وأعطيت العليقة الكاملة الخاصة بها والمحضرة محليا .

العليقة المستعملة : وهي محضرة محليا على شكل حبيبات Pellets وتتكون من :

المادة	مجروش الحنطة	مجروش الشعير	مجروش الذرة الصفراء	فول الصويا	بروتين حيواني	ملح الطعام	حجر الكلس
%	٣٠	٢٤.٥	٢٢.٥	١٥.٢	٧.١٥	٠.٤٥	٠.٢

جذور الجزر : مشتراة من اسواق بغداد المحلية .

عقار Cp : من شركة Asta / Germany حضر محلول خزين منه وحضرت منه التراكيز المطلوبة لتجريع الحيوانات .

محلول كلوريد البوتاسيوم : حضر بإذابة ٥.٧٥ غرام من ملح كلوريد البوتاسيوم KCl في ١٠٠٠ مللتر من الماء المقطر ليعطي محلول ناقص التوتر Hypotonic solution ذو تركيز ٠.٠٧٥ مولاري . حفظ في الثلاجة بدرجة ٤ مْ (Atlas واخرون ، ١٩٩٥)استعمل في تحضير الكروموسومات من خلايا نقي العظام .

محلول الكولجيسين Colchicine : حضر محلول خزين منه في الماء المقطر وحقن كل حيوان بـ ٠.٢٥ مللتر في غشاء الخلب Intraperitoneal (بتركيز نهائي ١٠ ملغم / كغم من وزن جسم الحيوان) قبل التشريح بمدة ٢ – ٣ ساعة واستخدم المحلول انيا بعد تحضيره

محلول الملح الفسلجي : حضر باذابة ٠.٨٥ غرام من ملح كلوريد الصوديوم في ١٠٠ مللتر من الماء المقطر ، استعمل في تحضير النطف .

محلول التثبيت : حضر من مزج ٣ حجوم من الكحول المثيلي المطلق مع حجم واحد من حامض الخليك الثلجي (Glacial acetic acid) ، يحضر آنيا ويبرد في الثلاجة (٤ ْ م) ويستعمل في تثبيت خلايا نقي العظم (Bone marrow) .

محلول صبغة كمزا Giemsa stain solution : حضر واستعمل في تصبيغ الشرائح المعدة لدراسة الكروموسومات والنوى الصغيرة (Metcalf واخرون ، ١٩٨٦) .

محلول صبغة الايوسين : حضر بإذابة ١ غم من صبغة الايوسين الصفراء (Eosin yellow stain / England , BDH) في ١٠٠ مللتر من الماء المقطر واستعملت في تحضير وصبغ نطف الفئران (Wyrobek و Bruce ، ١٩٧٥) .

تحضير الخلايا للفحص المجهري : اتبعت طريقة Allen واخرون (١٩٧٧) مع بعض التحوير ، اذ حقن كل فار بالكولجسين بتركيز ١٠ ملغم / كغم وزن الحيوان تحت غشاء الخلب ، وبعد مرور ٢ – ٣ ساعة قتلت الحيوانات بفصل الفقرات العنقية وشرحت لاستخراج نقي عظام الفخذ باستعمال ٥ مللتر من محلول الملح الفسلجي الدافئ (٣٧ ْ م) التي مزجت جيدا ثم فصلت الخلايا بالطرد المركزي بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة ، ازيل الرائق واضيف الى الراسب ٥ مللتر من محلول كلوريد البوتاسيوم (٠.٠٧٥) الدافيء (٣٧ ْ م) مع المزج الجيد وحضنت في حمام مائي مهزوز بدرجة حرارة ٣٧ ْ م لمدة ٣٠ دقيقة ، ثم فصلت الخلايا بالطرد المركزي ، وازيل الرائق واضيف الى الراسب (الخلايا) المحلول المثبت (البارد والمحضر انيا) بالتدريج وعلى شكل قطرات تنساب على الجدران الداخلية للأنبوبة ثم اكمل الحجم الى ٥ مللتر ومزجت محتويات الأنبوبة جيدا ، وضعت الأنابيب في الثلاجة (٤ ْ م) لمدة نصف ساعة لغرض تثبيت الخلايا ثم فصلت بالطرد المركزي وأعيدت عملية التثبيت ثلاث مرات ثم علقت الخلايا في (١ - ٢) مللتر من المحلول المثبت وحفظت الخلايا في الثلاجة لحين الاستعمال .

عند الاستعمال تمزج محتويات الانبوبة جيدا ثم يتم إسقاط قطرات منها على شريحة زجاجية نظيفة بمعدل ٦ – ٨قطرات بصورة عمودية وعلى ارتفا مناسب (١ متر) لإتاحة الفرصة للانوية والكروموسومات بالانتشار الجيد ، جففت الشرائح لمدة دقيقة واحدة على صفيحة ساخنة (٥٠ ْ م) . صبغت الشرائح بصبغة كمزا لمدة (٢٠) دقيقة ، ثم غسلت بالماء المقطر وتركت تجف ، حضرت (٤) شرائح لكل حيوان واستخدمت للفحوص .

حساب معامل الانقسام الخيطي Mitotic index assay (MI) : فحصت الشرائح بالمجهر الضوئي باستعمال قوة التكبير 640X ، وتم حساب ١٠٠٠ خلية منقسمة وغير منقسمة وحسبت النسبة المئوية لمعامل الانقسام (Shubber و Al-Allak ، ١٩٨٦)

معامل الانقسام = [عدد الخلايا المنقسمة / عدد الخلايا الكلي] × ١٠٠

حساب التشوهات الكروموسومية Chromosomal aberrations : تم حساب النسبة المئوية للتشوهات باستعمال قوة تكبير 1600X (باستخدام العدسة الزيتية) وتم فحص ١٠٠ خلية في الطور الاستوائي Metaphase من الانقسام الخيطي .

فحص النواة الصغيرة : اعتمد طريقة Schmid (١٩٧٦) مع بعض التحوير ، اذ اخذ عظم الفخذ واستخرج النقي باستخدام (١) مللتر من المصل البشري المثبط بالحرارة (٥٦ ْ م لمدة نصف ساعة) ، فصلت الخلايا من المحلول بالطرد المركزي (٣٠٠٠ دورة / دقيقة) لمدة ٥ دقائق . أخذت قطرة من الراسب ووضعت على طرف شريحة زجاجية نظيفة وفرشت عليها بمساعدة شريحة وبالسحب بزاوية ٤٥ ْ ، تركت المسحات تجف بدرجة حرارة الغرفة الى اليوم التالي ثم صبغت بصبغة كمزا لمدة (١٠) دقائق ، غسلت الشرائح وجففت وفحصت بالمجهر الضوئي وباستعمال العدسة الزيتية (قوة تكبير نهائية 1600X) وتم حساب النسبة المئوية للخلايا الحاوية على النوى الصغيرة في ٥٠٠ خلية للخلايا سوابق كريات الدم الحمر Polychromatic erythrocytes .

فحص تشوهات رؤوس النطف : بعد تشريح الحيوانات تم استخراج النطف من البربخ Epididymis باستخدام طريقة Wyrobek (١٩٨١) وكالاتي :

وضع البربخ في طبق بتري حاوي على ٥ مللتر من محلول الملح الفسلجي ، وباستخدام شفرة حادة وملقط دقيق تم تقطيع البربخ الى قطع صغيرة جدا ، وضع النموذج الناتج في أنبوبة اختبار نظيفة . فرشت قطرة من النموذج الحاوي على النطف وجففت على صفيحة ساخنة (٥٠ ْ م) . صبغت الشرائح بصبغة الايوسين الصفراء لمدة (٢ – ٣) دقائق وأزيلت الصبغة الزائدة بالغسل بالماء المقطر وتركت

لتجف . فحصت الشرائح بالمجهر الضوئي وباستخدام قوة تكبير 400X وتم حساب النسبة المئوية لتشوهات رؤوس النطف وذلك بفحص ١٠٠٠ نطفة ومقارنة أشكال تلك النطف مع الشكل الطبيعي لرأس نطفة الفار من الضرب Balb/C .

معاملة الحيوانات : خصص للتجربة ٢٠ فار ، واستمرت التجربة لمدة ٦٠ يوم ، وأجريت لها المعاملات الاتية :

السيطرة السالبة : تركت الحيوانات تأكل العليقة العادية وتشرب الماء العادي لمدة شهرين ، وخصص لها ٤ فئران .

السيطرة الموجبة :تركت الحيوانات تأكل العليقة العادية وتشرب الماء العادي ولكن كانت تجرع بالعقار Cp يوميا بكمية من المحلول الخزين (٢٥ ملغم / كغم وزن الحيوان) وخصص للمعاملة ٤ فئران .

المعاملة بالنبات قبل المطفر (Ca/Cp) : أطعمت الفئران العليقة الطبيعية لها مع النبات بنسبة (١ : ١) لمدة (٣٠) يوم ، ثم اعطيت عليقة طبيعة لوحدها لمدة ٣٠ يوم اخرى مع تجريعها بالعقار Cp لمدة (٣٠) يوم .

المعاملة العقار مع النبات (Ca+Cp) : خصص للتجربة ٤ فئران واعطيت العليقة العادية مع النبات بنسبة (١:١) لمدة (٦٠)يوم وكانت تجر بالعقار يوميا ولمدة (٦٠) يوم .

المعاملة بالنبات بعد المطفر (Cp/Ca) : خصص للمعاملة (٤) فئران وأعطيت العليقة الكاملة مع التجريع بالمطفر لمدة (٣٠) يوم ، ثم اعطيت العليقة الكاملة مع النبات بنسبة (١ : ١) لمدة شهر .

بعد شهرين تم قتل الحيوانات واستخراج نقي العظام من عظم الفخذ ، وكذلك تم استخراج النطف من البربخ لإجراء الدراسات عليها .

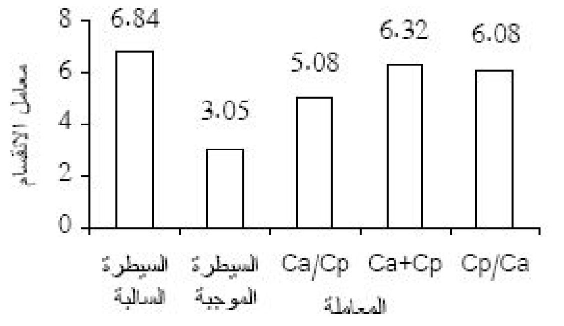
التحليل الإحصائي : حللت البيانات إحصائيا باستعمال التصميم العشوائي الكامل (CRD) واستعمل لذلك النموذج الخطي العام (GLM) ضمن البرنامج الإحصائي الجاهز (SAS ، ١٩٩٦) واختبرت الفروق المعنوية بين المتوسطات باستعمال اختبار دانكن متعدد الحدود (Duncan ، ١٩٥٥) .

النتائج والمناقشة

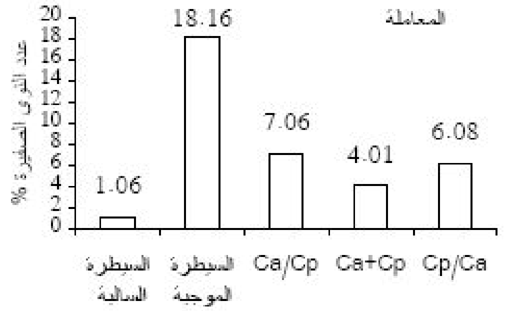
تحتاج عملية دراسة المطفرات والمسرطنات ان تتم داخل الانظمة الحية ، وتكتمل الصورة فيما اذا أقرنت نتائج فحوص قصيرة الامد مع الفحوص طويلة الامد ، لان الأخيرة سوف تعطي صورة واضحة عن توزيع المواد الضارة في جسم الحيوان وما تتعرض له من عمليات امتصاص وإفراز او تايض في الجسم (Heddle واخرون ، ١٩٨٣) ، كما ان دخول المواد المسرطنة عن طريق الفم يجعلها عرضة للارتباط مع بعض المواد مثل المخاط (Kassie وآخرون ، ١٩٩٩) وكذلك الحال مع البروتينات الاخرى مثل بروتينات المصل التي عند وجودها بتراكيز معينة يمكن ان تؤدي الى اختفاء تاثير المطفرات والمسرطنات (Kassie واخرون ، ١٩٩٩) . وقد اجريت الدراسة الحالية لتوضيح اثر المواد لمدة طويلة ، ومن المؤشرات التي درست معامل انقسام خلايا نقي العظم الموضحة نتائجه في الشكل (١) ، ويتضح ان المعامل كان مرتفعا في حالة السيطرة السالبة في حين انخفض الى ٤٤ % (٣.٠٥) عند استعمال العقار Cp ، ومعامل الانقسام يتأثر سلبا بالمواد المطفرة والمسرطنة (Shubber و Al-Allak ، ١٩٨٦) . في حين ادت المعاملة بالجزر لمدة ٣٠ يوم وتلتها المعاملة بالعقار لمدة ٣٠ يوم اخرى (Ca/Cp)الى الارتفا بالقيم الى ٧٤ % من القيمة الطبيعية له ، اما معاملة الحيوانات بالجزر مع العقار (Ca+Cp) فقد ادت الى استعادة ٩٢.٤ % من القيم الطبيعة ، ومعاملة الحيوانات بالعقار لمدة شهر ثم استعمال النبات (Cp/Ca)فقد ساعد في استرجا ٨٩ % من القيم الطبيعية ، وقد كانت نتائج المعاملة (Ca+Cp) لا تفرق معنويا عن السيطرة السالبة (P<0.01) ، في حين كانت المعاملات الاخرى وان كانت نتائجها ايجابية الا انها فرقت بشكل معنوي عن الحالة الطبيعية وعلى مستوى الاحتمال نفسه . ويوضح الشكل (٢) تاثير المعاملات الطويلة في حث تكون النوى الصغيرة .

ويلاحظ ان اعطاء الفئران العقار لمدة شهرين قد ادى الى تضاعف أعداد النوى الصغيرة الى حوالي (١٧) ضعف الحالة الطبيعية وهذه النتائج مهمة إحصائيا على مستوى احتمال (P<0.01) ، في حين ان المعاملات قصيرة الامد والتي تمتد الى ٢٤ ساعة تؤدي في أقصا الحالات الى زيادة عدد المرات الى حوالي ٨ مرات (دراسات تحت النشر) ويمكن ان تعود الأعداد الى مستويات طبيعية عند

المعاملة ببعض النباتات ، ولكن الملاحظ ان المعاملات لمدة طويلة ووجود العقار في جسم الحيوان ادى الى ارتفا عدد النوى وبقيم مرتفعة حتى عند المعاملة بالنبات (الجزر) اذ شكل المتبقي منها ٣٩ % ، ٣٢ % ، ٢٢ % للمعاملات (Ca/Cp) و (Ca+Cp) و (Cp/Ca) على التوالي ، وكانت كلها تفرق عن السيطرة السالبة (الحالة الطبيعية) بشكل معنوي (P<0.01) .

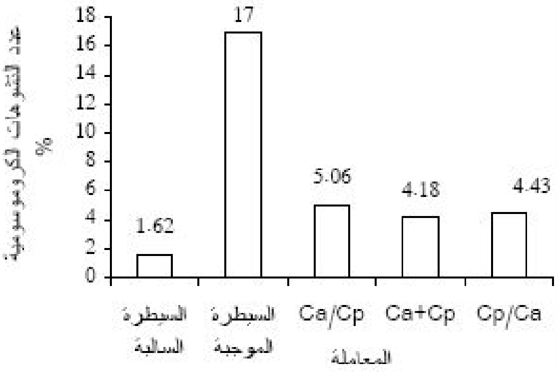


الشكل (١) : تاثير اطعام الجزر لمدة شهرين في معامل انقسام خلايا نقي عظم الفخذ

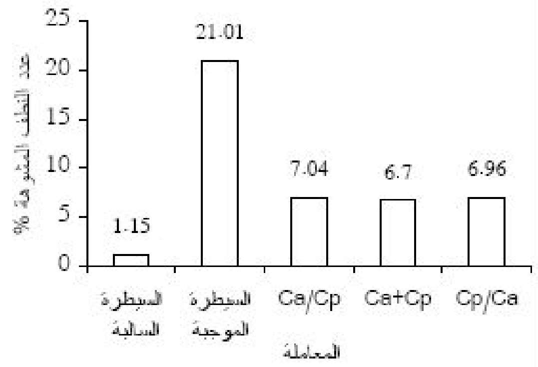


الشكل (٢) : تاثير اطعام الجز لمدة شهرين في تكون النوى الصغيرة في خلايا نقي العظم

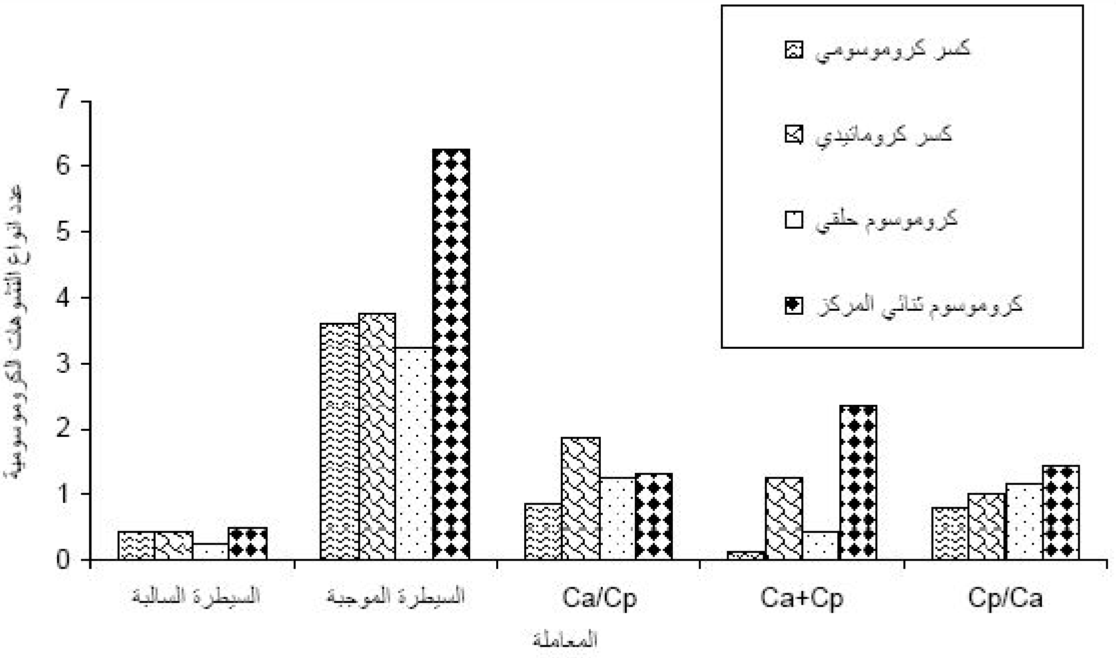
وان كانت منخفضة عن السيطرة الموجبة وبشكل معنوي (P<0.01) . وتمثل النوى الصغيرة كتل كروماتينية لم تنضم الى الهيئة الكروموسومية نتيجة لحدوث كسور في الكروموسومات وهذه الانوية تكون صغيرة جدا او تنتج من حصول إصابة في جهاز الانقسام المغزلي وبذلك لا ينضم كروموسوم كامل للمجموعة الكروموسومية وتكون هذه اكبر من الحالة الاولى أي ان النوى الصغيرة يمكن ان تختلف في الآلية التي تتكون بها ، وزيادتها يعني وجود تشوهات تركيبية او عددية وبالتالي يعني وجود تدمير للكروموسومات (Heddle واخرون ، ١٩٨٣ و Heddle و Salamone ، ١٩٨١ و Tawn و Holdsworth ، ١٩٩٢) ، وقد اثبت ان عقار Cp يؤدي الى زيادة النوى الصغيرة (Legator و Rinkus ، ١٩٨١) اذ امكن تسجيل وجود ٢٦ -٣٠ نوية صغيرة / ٥٠٠ خلية عند استعمال فئران من الضرب B6C3F1/BR بعد مرور ٤٨ ساعة عند استعمال (٧٥) ملغم من العقار / كغم وزن الجسم (Heddle و Salamone ، ١٩٨١) وهذا الاختلاف يعود الى اختلاف سلالات الحيوان المستعملة ، والعقار يكون له تاثير تراكمي ، كما ان تكرار الجرعة يؤدي الى زيادة الحساسية وزيادة الاستجابة (Heddle و Salamone ، ١٩٨١) . ويوضح الشكل (٣) تاثير العقار Cp في اعداد التشوهات الكروموسومية المستحثة ، اضافة الى تاثير المعاملات المختلفة بالجزر في اعداد التشوهات ومعاملة الحيوانات بالعقار لمدة طويلة ادى الى زيادة عدد التشوهات الى (١٠) أضعاف الحالة الطبيعية في حين ان المعاملات قصيرة الامد لا تتجاوز (٤ – ٥) أضعاف ، وقد ادى إطعام الفئران بالجزر لمدة شهر قبل العقار (Ca/Cp) الى زيادة عمليات الإصلاح وصلت الى ٧٠ % ، اما اعطاء الجزر مع المطفر (Ca+Cp) ولمدة ٦٠ يوم فقد ادت الى التخلص من ٧٥ % من التشوهات مقارنة بالسيطرة الموجبة ، واعطاء الحيوانات الجزر بعد اعطائها العقار (Cp/Ca) لمدة شهر ادى الى تقليل التشوهات بنسبة وصلت الى ٧٤ % . والعقار Cp معروف انه من العوامل المؤلكلة اذ تؤدي هذه العوامل الى اضافة مجموعة الكيل الى ذرة الاوكسجين في القاعدة النتروجينية الكوانين ، وهذه الاضافة تجعل المناطق المجاورة حساسة لتاثير الانزيمات القاطعة للحوامض النووية Nucleases (Flamm و Mehlam ، ١٩٧٨) خاصة في مناطق الكروماتين المتباين Heterochromatin وهي المناطق التي تحدث فيها الكسور الكروموسومية اكثر من غيرها من مناطق الكروموسوم ، وهي تشكل مناطق مهمة لدخول واندماج الفيروسات المولدة للسرطانات (McDermott ، ١٩٧٥) ، وقد تكون هذه حاوية على مجموعة الجينات Caretaker genes المسئولة عن سلامة الجينوم وعند حدوث الطفرات في هذه المجموعة من الجينات يزداد التطفير في جينات اخرى (Goldman و Shields ، ٢٠٠٣) ، وبذلك فان حصول التشوهات الكروموسومية يعني تدمير للمادة الوراثية ومقدمة لتطور الأورام والسرطانات .اما تفاصيل انوا التشوهات فموضحة في الشكل (٤)



الشكل (٣) : تاثير اطعام الجزر لمدة شهرين في حث التشوهات الكروموسومية في خلايا نقي عظم الفخذ



الشكل (٥) : تاثير اطعام الجزر لمدة شهرين في تشوهات رؤوس النطف في الفئران



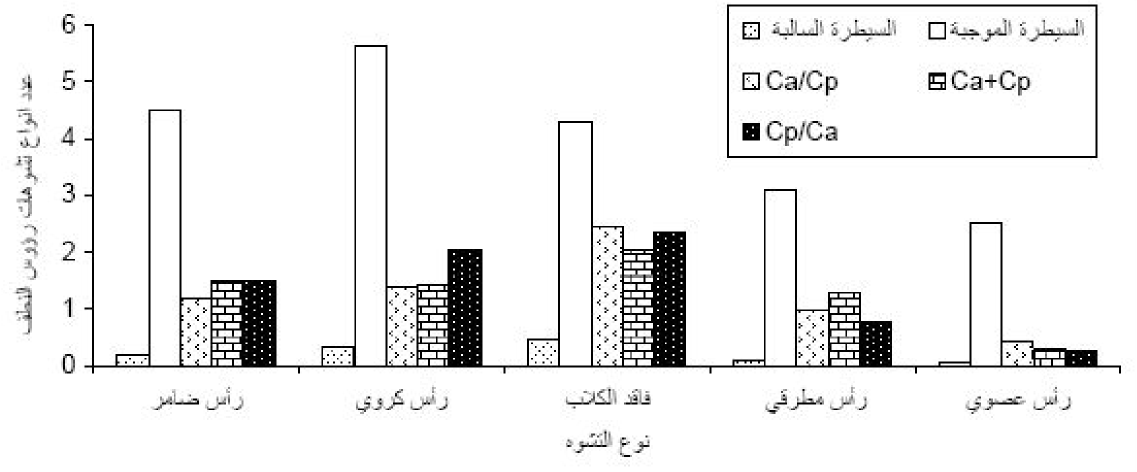
الشكل (٤) : تاثير اطعام الجزر لمدة شهرين في انواع التشوهات الكروموسومية

ويظهر الشكل ان العقارقد ادى الى زيادة كل انوا التشوهات المدروسة وهي الكسور الكروموسومية والكسور الكروماتيدية والكروموسومات الحلقية والكروموسومات ثنائية المركز وبفروق معنوية عن السيطرة السالبة (P<0.01) . ومعاملة الحيوانات بالنبات لمدة شهر ثم بالعقار لشهر اخر (Ca/Cp) قد ساعد في التخلص من عدد من الكسور الكروموسومية والكروموسومات ثنائية المركز وأصبحت أعدادها لا تفرق معنويا عن السيطرة السالبة ، اما الكسور الكروماتيدية فقد تم اصلاح حوالي ٥٠ % منها وحوالي ٦١ % من حالة تكون الكروموسومات الحلقية وحوالي ٧٩ % من الكروموسومات ثنائية المركز ، والملاحظ ان اطعام الفئران بالجزر مع العقار كان أكفأ في اصلاح الكسور الكروموسومية والكروماتيدية وحالة الكروموسومات الحلقية ولكن الكروموسومات ثنائية المركز بقيت عالية اذ بقيت تفرق عن السيطرة السالبة بشكل معنوي (P<0.01) . واطعام الحيوانات الجزر لمدة شهر بعد اعطائها العقار لمدة شهر (Cp/Ca) فقد اظهر الجزر تاثيرا ايجابيا وانخفضت التشوهات بشكل معنوي عن السيطرة الموجبة واغلبها اصبح لا يفرق معنويا عن السيطرة السالبة ما عدا الكروموسومات الحلقية التي بقيت تفرق معنويا عن السيطرة السالبة ولكنها أصلحت بنسبة ٦٣.٧ % واصبحت تفرق معنويا عن السيطرة الموجبة (P<0.01) .

اما الجانب الاخر الذي تناولته الدراسة فهو ملاحظة تشوه رؤوس النطف كما مبين في الشكل (٥)

ويلاحظ انه في الحالة الطبيعية تظهر التشوهات لرؤوس النطف وهذه مسجلة في دراسات اخرى وتتراوح بين ٠.٩٨ – ١.٨ % (Wyrobek و Bruce ، ١٩٧٥ و Rastogi و Levin ، ١٩٨٧) ، ويلاحظ ان العقار وعلى مدة زمنية امتدت شهرين قد ادى الى ارتفا عدد التشوهات الى حوالي (١٨) ضعف ، وهذا متوقع لان العقار يسبب التشوهات الكروموسومية (كما ذكر اعلاه) والتي تؤدي الى تشوه رؤوس النطف (Wyrobek و Bruce ، ١٩٧٥) ، وتحدث التشوهات عادة نتيجة للتداخل مع سلامة DNA او التعبير عن المعلومات الوراثية (Wyrobek و Bruce ، ١٩٧٥) . ويفضل فحص تشوه رؤوس النطف لانه طريقة اقتصادية ، اضافة الى حساسيته نتيجة لطبيعة النطف الخاصة التي تخلو من معظم الوظائف الخلوية وتخصصها في حمل المواد الوراثية وهذا يعني انها خلايا متخصصة جدا (Phillips ، ١٩٧٤) . ويلاحظ ان اعطاء الحيوانات الجزر والعقار وبمعاملات مختلفة قد ادى بشكل عام الى انخفاض التشوهات التي اصبحت تفرق معنويا عن السيطرة الموجبة (أي استعمال العقار لوحده) (P<0.01)، فاستعمال الجزر مسبقا قبل المطفر (Ca/Cp) قد ادى الى اصلاح التشوهات بنسبة ٦٦ % ، وكانت معاملة (Ca+Cp) الافضل اذ ادت الى اختفاء ٦٨ % من التشوهات ، واطعام الحيوانات بالجزر بعد إطعامها العقار (Cp/Ca) ادى الى اصلاح ٦٧ % وهي حالة مقاربة للمعاملة (Ca/Cp) .

اما تفاصيل التشوهات المستحثة والتي شملتها الدراسة وهي النطف ضامرة الرأس والنطف ذات الرس الكروي وكذلك النطف التي فقدت كلابها والنطف ذات الرأس ألمطرقي والنطف ذات الرأس العصوي فموضحة تفاصيلها في الشكل (٦)



الشكل (٦) : تاثير اطعام الجزر لمدة شهرين في تشوه رؤوس النطف

والملاحظ ان العقار قد ادى الى حث جميع انوا التشوهات المدروسة وبشكل معنوي مقارنة بالسيطرة السالبة ، اما المعاملات المختلفة فقد ادت الى اختزال اعداد التشوهات المذكورة بشكل ملحوظ وبفرق معنوي عن المعاملة بالعقار (P<0.01) ، ولكن جميعها لم تصل بأيمن انوا التشوهات الى مستوى الحالة الطبيعية . والنتائج اعلاه تشير الى ان استعمال فحص تشوه رؤوس النطف يمكن ان يستعمل كدليل على ان المواد مسرطنة كما يتفق مع دراسات اخرى (Topham ، ١٩٨٠) .

ويتضح من النتائج اعلاه ان مكونات الجزر وغيره من الاغذية يمكن ان يخفف من ضرر المواد التي تدمر المواد الوراثية ، فاحتواء المواد (الطازجة خاصة) على الفيتامينات مثل فيتامين A الذي يكون الجزر غنيا به ويساعد في خفض تشوهات رؤوس النطف المستحثة ببعض العقاقير (الكناني ، ٢٠٠٥) ، كما ان الدراسات الوبائية الموسعة تشير الى ان معظم الاغذية من الفواكه والخضر يمكن ان تضاد عمليات التطفير والتسرطن (Kassie واخرون ، ٢٠٠٣) ، اذ ان تناول الفواكه والخضر يزود الجسم بالعديد من المواد الكيماوية التي تقي من الإجهاد التاكسدي(Goldman و Shields ، ٢٠٠٣) ، وذلك لان التخلص من الإجهاد التاكسدي تعد طريقة مهمة لحماية المواد الوراثية (Kapiszewska واخرون ، ٢٠٠٥) ، وتعمل مكونات المواد الغذائية اما بشكل Desmutagens

أي مثبطات مباشرة (Knudsen ، ١٩٨٦) وهي التي يكشف عنها بالمعاملات المسبقة للمطفر او معه (كما في النتائج اعلاه) ، او تكون المواد بمثابة مضادات تطفير حيوية Bioantimutagens وهي التي يكشف عنها باستعمالها بعد المطفرات وما تحثه من اضرار اذ تقوم هذه المواد بالمساعدة في عمليات الاصلاح للاضرار الحادثة والموجودة . وتظهر الاغذية عدة آليات للحفاظ على الانظمة الحية منها التنشيط الايضي وإزالة سمية المواد والعمل على زيادة عمليات اصلاح DNA المدمر وذلك لان الخطوة الاولى للسرطانات حصول إصابة في DNA بشكل أساسي وحصول اصابة في RNA او البروتينات والتي كلها تمثل تفاعلات كيماوية . كما ان المواد تعمل في حالة عدم كفاية عمليات الاصلاح بتعجيل الاستماتة Apoptosis للخلايا التي قطعت شوطا في الاتجاه السلبي لحياة الخلية (Goldman و Shields ، ٢٠٠٣) ، والجزر المستعمل في الدراسة الحالية يحوي خليط من المواد التي عمل بعضها على منع الاضرار عن الخلايا وعمل الاخر على اصلاح ما دمر من المواد الخلوية بالعقار المستعمل .

EFFECT OF LONG TERM ADMINISTRATION OF CARROT ROOTS (*Daucus carota*) ON SOME CYTOGENETIC PARAMETERS IN WHITE MICE

Ilham A. Khalaf Zahra M. Al-Khafaji*
Institute of Genetic Engineering & Biotechnology for Postgraduate Studies / University of Baghdad / IRAQ .
* Present address : Dept. of Food Science / University of Mosul / IRAQ.

ABSTRACT

The effect of long term administration of carrot roots (2 months) on some cytogenetic parameters in bone marrow cells of white mice was studied , these included , mitotic index (MI) , micronuclei formation (Mn) , and chromosomal aberrations (Ch . ab .) of different types . In addition the effect was studied in germ cells (Sperms) by scoring the number and types of sperm – head abnormalities in comparison of the effect induced by cyclophosphamide (Cp) . Results showed that Cp reduced the MI to about 44 % of the normal value (6.84), administration of carrot before the drug (Ca/Cp) raised the index to 74 % of the normal value , while administration of carrot with the drug (Ca+Cp) restored 92.4 % , and administration of Cp followed by carrot (Cp/Ca) restored 88.9 % of the normal value . Cp induced Mn to about 17 times of the baseline value 1.06 .The different treatments with carrot reduced the Mn to 3.8 – 6.7 times the natural values , and the (Ca/Cp) treatment was the best . Cp treatment for long time raised the Ch .ab. to about 10 times the natural value 1.62 , these values reduced upon administration of carrot to about 24.5 – 29.8 % of the positive control 17 , and such effect extended to the types of Ch. ab. except that of dicentric chromosomes which persisted with high values , but it was lower than the positive control with statistical difference ($P<0.01$) . The drug increased the sperm – head abnormalities to about 18 times the natural background 1.15 . Different treatments of carrot reduced the level of abnormalities with significant differences compared to positive control ($P<0.01$) , but the abnormalities were higher than the negative control with statistical difference ($P<0.01$) , these results were reflected on the types of abnormalities .

المصادر

الزركاني ، علي صنيخ (١٩٩٩) . عزل وتشخيص صبغة الساندين – ٣ – ارابينوسايد من القشرة الخارجية لجذور الجزر العراقي ودراسة تطبيقاتها التحليلية ، رسالة ماجستير ، كلية العلوم / قسم الكيمياء ، جامعة البصرة – العراق .

الكناني ، ابتسام بداي (٢٠٠٥) . دور فيتامين A , C , E في تعديل التاثيرات المناعية والوراثية لعقار الايتبسيد في الفأر الابيض *Mus musculus* . رسالة ماجستير ، كلية التربية ابن الهيثم / قسم علوم الحياة ، جامعة بغداد – العراق .

Allen , J ; C. Shuler ; R. Mendes and S. Latt (1977) . A simplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchange using 5 – bromro – deoxy uridine . Cytogenet. Cell Genet. 18 : 231 – 237.

Atlas , R . ; A. Brown and C . Parks (1995) . Manual of Experimental Microbiology . Mosby Co. New York .

Belisario , A . ; N . Panza, and G . Pacilia (1985) . Effect of beta- carotene on mutagenic activity of some antineoplastics . Acta Vitaminol. Enzymol . 7 : 75 – 78 .

Duncan ,D.(1955).Multiple range and multiple F- test .Biometric 11:1- 42

Evans , W. (2002) . Treas and Evan's Pharmacognosy . 15th Edition . W . B. Sanders Comp . Ltd . London , UK .

Flamm , W . and M . Mehlam (1978) . " Advances in Modren Toxicology " vol . 5 . Mutagenesis . John Wiely and Sons , New York , London .

Ghaskadbi , S ; S. Rajmachikar ; C . Agate ; A. Kapadi and V . Vaidya . (1992) . Modulation of cyclophosphamide mutagenicity by vitamin C *in vivo* rodent micronucleus assay . Mutagens 12 : 11 -17 .

Goldman , R . and P . Shields (2003) . Food Mutagens . J . Nutr. 133 : 965S – 973S .

Heddle , J . ; M . Hiet ; B . Kirkhart ; K . Mavoumin ; J . MacGregor ; G . Newell and M . Salamone (1983) . The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity : A report of the U.S .Environmental Protection Agency gene- tox program . Mut . Res . 123 : 61 – 118 .

Heddle , J. and M . Salamone (1981) . The micronucleus Assay . I . *In* " Short – Term Tests for Chemical Carcinogens " . H. Stich and R. San (Eds.). Springer – Verlag : New York , Heidelberg .

Hsu , T . ; W , Au ; L . Strong and D . Johston (1981) . A short – Term Cytogenetic Test for Genetic Instability in Human *In* " Short -Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich and R . San (Eds.) . Springer – Verlag : New York , Heidelberg .

Kapiszewska , M . ; E . Soltys ; F . Visioli ; A . Cierniak and G . Zajac (2005) . The protective ability of the Mediterranean plant extracts against the oxidative damage. The role of the radical oxygen species and the polyphenol content . J . Physiol . Pharmacol . 56 : 183 -197 .

Kassie , F . ; B . Pool-Zobel ; W. Parzefall and S . Knasmuller (1999) . Genotoxic effects of benzyl isothiocynatate, a natural chemoprotective agent . Mutagenesis 14 : 595 –604 .

Kassie , F.; M. Uhl; S. Rabot ; Grasl-Kraup , B . ; R . Verker ; M. Kundi ; M . Chabicovsky ; R. Schultr-Hermann and S. Knasmuller (2003). Chemoprotective effects of 2-amino- 3- methyl-imidazo[4,5-f] quinoline (IQ)-induced colonic and hepatic preneoplastic lesions in the F433 rat by cruciferous vegetables administrated simultaneously with carcinogen . Carcinogenesis 24 : 255 -261 .

Kinzler , K and B . Vogelstein (1998) . Landscaping the cancer terrain ., , Science 280 : 1036 – 1037 .
Knudsen , I. (1986) .Genetic Toxicology of the Diet . Alan R. Liss . New York .
Legator , M . and S. Rinkus (1981) . Mutagenicity : Problems in Application *in vitro* . *In* " Short – Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich and R . San (Eds.) . Springer – Verlag : New York , Heidelberg .
McDermott , A . (1975) . Cytogenetics of Man and Other Animals . Chapman and Hall . London .
Metcalf . J . ; J . Gallin ; W . Nauseef and R . Root . (1986) . Laboratory Manual of Neutrophil Function . Revan Press : New York .
Murty , A. (1988) . Toxicity of Pesticides to Fish . vol II . CRC Press Inc . Boca Roton , Florida .
Phillips , D . (1974) . Sperminogenesis . Academic Press . New York , London .
Rastogi , P . and R . Levin (1987) . Induction of sperm abnormalities in mice by quercetin . Environ . Mutag . 9 : 79 – 86 .
Sandifer , S . ; R . Wikens ; C . Loadholt ; L . Lane and J . Eldridge (1979) . Spermatogenesis in agricultural workers exposed to dibromochloropropane (DBCP). Bull. Environ. Contam . Toxicol . 423 : 703 – 710 .
Schimd , W . (1976) . The Cell Micronucleus Test for Cytogenetic Analysis . *In* " Chemical Mutagens : Principles and Methods for their Detection". A. Hollaender (Ed.) . Plenum : New York , Vol IV.
Shubber , E . and B . Al-Allak (1986) . Spontaneous chromosomal aberrations and SCEs in human lymphocyte effect of culture conditions . Nucleus 29 : 92 – 98 .
Stoltz , D . (1981) . Detection of Cocarcinogens and Anticarcinogens with Microbial Mutagenicity Assays . *In* " Short – Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich and R . San (Eds.) . Springer – Verlag : New
Tawn , E . and D . Holdsworth . (1992) .Mutagens Induced Chromosome Damage in Human Lymphocytes . *In* " Human Cytogenetic " Vol . II . D . Rooney and B . Czepukowski (Eds.) . Oxford University Press , UK .
Thompson , M . ; R. McInnes and H . Willard . (1991) . Clinical Cytogenetics : General Principles and Autosomal Abnormalities . *In* . " Genetics in Medicine " . Saunders , W. B. Comp. UK.
Topham, J. (1980) . The detection of carcinogen induced sperm head abnormalities in mice . Mut . Res . 69 : 149 – 155 .
Whorton , D . ; R . Kraus ; S . Marshall and T . Milbt (1977) . Infertility in male pesticides workers . Lancet 2 : 1259 – 1261 .
Wyrobek , A . (1981) . Methods for Human and Murine Sperm Assays . *In* " Short – Term Tests for Chemical Carcinogens " . H . Stich and R . San (Eds.) . Springer –Verlag : New York , Heidelberg .
Wyrobek , A . and W . Bruce (1975) . Chemical induction of sperm abnormalities in mice. Proc . Natl . Acad . Sci . 72 : 4425 – 4429 .