استخدام فحص النوى الصغيرة كمقياس بايولوجي في الخلايا اللمفاوية لدم الانسان المعرضة مختبريا الى اشعة كاما

Micronucleus Assay as a Biological Indicator for *In Vitro* Exposure of Human Lymphocytes to Gamma Rays

عباس ناجي بلاسم
وزارة البيئة
Abbas N. Balasem
Ministry of Environment

المستخلص

هدفت الدراسة الحالية الى استخدام فحص النوى الصغيرة Micronucleus Assay كمقياس بايولوجي لتقدير الجرع الاشعاعية نتيجة التعرض الحاد لجرع مختلفة من اشعة كاما الصادرة من عنصر السيزيوم (-137) حيث عرضت نماذج من دم الانسان خارج الجسم الحي *In vitro* الى ست جرع من هذه الاشعة هي (0.5،0.4،0.3،0.2،0.1، 1.0)غراي إضافة إلى مجموعة السيطرة 0.0 غراي ، زرعت الخلايا نسيجيا بأستخدام طريقة cytokinesis blocked method وفحصت الخلايا مجهريا للتعرف على اعداد النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية المتعرضة للاشعاع ، وجد إن التعرض لهذه الجرع الإشعاعية سبب زيادة في إعداد النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية مقارنة مع مجموعة السيطرة وان إن حساب النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية أحادية وثنائية وثلاثية ورباعية النواة أفضل من الطريقة التقليدية التي تعتمد على الخلايا ثنائية النواة فقط . واستخدمت برامج حاسبية لايجاد علاقات رياضية بين الجرع الاشعاعية وما يقابلها من نوى صغيرة للافادة منها كمقياس بايولوجي لتقدير الجرع الاشعاعية اثناء الحوادث .

Abstract

Micronucleus Assay was employed to detect the effects of acute exposure of human peripheral blood lymphocytes in vitro to Cs -137 gamma rays. Human whole blood samples were irradiated with different doses of gamma rays namely (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.00) Gy, respectively in addition to a control non-irradiated sample. The samples were tissue cultured and cytokinesis blocked method was used to investigate the frequency of micronuclei. In vitro exposure of lymphocytes to this doses led to elevation of micronuclei in comparison with non –irradiated samples However, inclusion of mono-, tri-,and quadrinucleated cells in micronucleus assay probably gives more satisfying result than restriction the test on binucleated cells. Computed programmed were employed to establish dose – response relationships to be used as biological dosimeter during radiation accidents.

المقدمة

تتكون النوى الصغيرة عند تعرض الخلية لمادة محدثة للكسور الكروموسومية بحيث ينتج من التكسر قطع كروموسومية صغيرة او كروموسوم كامل متغير غير مرتبط بالمغزل بحيث تندمج مع احد النواتين اثناء انقسام الخلية الى خليتين بل تبقى الاجزاء الكروموسومية سائبة في السايتوبلازم خارج النواة ، ثم تتكور بشكل نواة صغيرة اصغر من النواة الاساسية بكثير وتصطبغ بصغتها [1] . يعد فحص النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية المزروعة بأستخدام تقنية Cytokinesis Blocked Lymphocytes Methods من افضل المقاييس الحديثة في معرفة التأثيرات الوراثية للمطفرات ومنها الاشعاع ، اذ انها تعتبرالاكثر حساسية في كشف الضرر الوراثي لدى الاشخاص المتعرضين للاشعاع [2] لكن هذه الطريقة غير مستقرة بدرجة كبيرة عند المعاملات الحادة للخلايا التي تتميز بسرعة الانقسام [3] .

يعتبر فحص النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية مكملا لفحص الانحرافات الكروموسومية chromosomal aberrations او بديلا عنه ، فهو طريقة سهلة وسريعة لمعرفة الاضرار الوراثية التي تحدثها المطفرات

الفيزياوية والكيمياوية [4 ,5 ,6] . أصبح فحص النوى الصغيرة من المؤشرات البيولوجية التي تستخدم في تخمين وتقدير الجرع الاشعاعية ، حيث اكدت الوكالة الدولية للطاقة الذرية International Atomic(IAEA) Energy Agency ، استخدام هذه التقنية بحيث تكون مكملة للمقايس الفيزياوية الروتينية المستخدمة في قياس الجرع الإشعاعية [7] . وتستخدم حاليا التغيرات في مستوى التعبير الجيني كمؤشر بايولوجي في الكشف التعرض او التلوث للاشعة المؤينة [8 ,9] . يتطلب التقييس البيولوجي للإشعاع تحضير منحنيات قياسية وعلاقات رياضية توضح العلاقة بين الجرع الإشعاعية لأنواع مختلفة من الأشعة المؤينة وما يقابلها من تأثيرات في المادة الوراثية ويتم ذلك بتعريض نماذج من دم الإنسان خارج الجسم الحي *In vitro* الى جرع متعددة من الأشعة المؤينة من مصدر خارجي [10 ,11 ,12] .

المواد وطرائق العمل

عينات الدم وطرائق التشعيع

سحب (20) مل من دم شخص بعمر (30) سنة ، لايدخن ولايتعاطى المشروبات الكحولية ، ووضع الدم المسحوب في انابيب تحوي على مانع التخثر الهيبارين Heparin بعد عملية السحب مباشرة . وبعدها تم توزيع عينات الدم المسحوبة في محاقن طبية بلاستيكية معقمة سعة (1) سم ³ بمعدل (0.5) سم³ في كل محقنة طبية بلاستيكية ومن ثم اجريت عملية تشعيع هذه النماذج وذلك بتعريضها الى جرع إشعاعية هي(0.1,0.0 ,0.3, 0.2 ,0.5,0.4, 1.0 ,0.1,0.0) غراي من أشعة كاما الصادرة من عنصر السيزيوم – 137 بأستخدام جهاز Gamma cell – 40 المصنع من قبل شركة Atomic Energy of Canada l، imited وان المصدر المستخدم يعطي جرعة اشعاعية مقدارها (64.23) غراي / ساعة ، وبعد انتهاء عملية تشعيع النماذج حضنت بدرجة حرارة 37 م لمدة ساعتين قبل اجراء عملية الزرع النسيجي للخلايا .

الزرع النسيجي للخلايا

زرع (0.5) مل من الدم المعرض لاشعة كاما في انابيب زرع معقمة تحوي على (4) سم ³ من الوسط الزرعي Minimum Essential Medium مضافا له 1.5 مل من محفز الانقسام phytohemagglutinine (PHA) و(1) سم ³ من مصل جنين العجل Fetal calf serum بعد انتهاء عملية الزرع حضنت الخلايا بدرجة حرارة 37م لمدة 72 ساعة ثم اضيف 40 مايكروليتر (6 µg/ml) من محلول cytochalasin –B (cyt-B) الذي يسمح لانقسام النواة ويمنع انقسام السايتوبلازم في الساعة 44 ساعة من الزرع ثم أكملت فترة الحضانة الى 72 ساعة وحسب طريقة [13] .

تهيئة الشرائح المجهرية

بعد انتهاء فترة الحضانة للخلايا المزروعة في انابيب الزرع ، تم نقلها الى انابيب الطرد المركزي وأجريت عملية الطرد المركزي بسرعة (1500) دورة / دقيقة لمدة (10) دقائق أهمل الرائق وأضيف إلى خلايا الراسب محلول كلوريد البوتاسيوم KCL ذي عيارية (0.1 M) وترك لمدة (3) دقائق ، وبعدها رسبت الخلايا بطريقة النبذ وسكب ثم عوملت الخلايا (الراسب) مع محلول مثبت مكون من الميثانول وحامض الخليك الثلجي (1:3) حجم وغسلت الخلايا بهذا المحلول لاربع مرات وفي المرة الاخيرة سكب الرائق كاملا وعلقت الخلايا بقطرات قليلة من المحلول المثبت وفرش العالق الخلوي على الشرائح بصبغة كمزا Giemsa stain .

الفحص المجهري

تم حساب (500) خلية لمفاوية ثنائية النواة Binucleated إضافة إلى ذلك سجل ما لوحظ من خلايا احادية النواة والتي تحوي على انوية صغيرة والخلايا ثلاثية ورباعية النواة واستخرج المعدل اعتمادا على طريقة [14] .

التحليل الاحصائي

استخدم البرنامج الاحصائي الجاهز (SPSS) في تحليل البيانات والنتائج التي تم الحصول عليها واعتماد على معامل الانحدار والارتباط حددت علاقات رياضية ومعدلات رياضية لتوضيح العلاقة بين الجرع الاشعاعية المستخدمة النوى الصغيرة المستحثة . كما استخدم اختبار دنكن لإجراء المقارنات بين الجرع وما يقابلها من معدل الانوية الصغيرة .

النتائج والمناقشة

يبين جدول (1) معدل النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية ثنائية النواة اذ تبين هناك زيادة معنوية ($p<0.01$) في نماذج الدم المعرضة للاشعاع مقارنة بالمجموعة غير المعرضة . وان معدل النوى الصغيرة يزداد بزيادة الجرع

الاشعاعية ان ظهور النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية غير المعرضة للاشعاع بمعدل (0.008) نوية صغيرة /خلية قد لوحظ في دراسات عدة حول امكانية وجود النوى الصغيرة في الاشخاص الطبيعيين ربما بسسبب تعرضهم الى مطفرات بيئية تؤدي الى حدوث مثل هذه التغيرات كالتشخيص بالشعة السينية او من الاشعة الكونية اذ كان ترددها (0.008 – 0.025) نوية صغيرة / خلية ثنائية النواة [15] و (0.002– 0.03) نوية صغيرة / خلية ثنائية النواة [13] و0.016. نوية صغيرة / خلية ثنائية النواة [14] ان الزيادة في معدل النوى الصغيرة عند التعرض لجرع تزيد على 0.1 غراي تتفق مع ما توصل اليه [18,17,16,13] في ان الزيادة المعنوية في معدل النوى الصغيرة تظهر عند التعرض لجرع تزيد على 0.05 غراي من أشعة كاما .

جدول (1): معدل وتوزيع النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية ثنائية النواة المعرضة خارج الجسم الحي *In vitro* لجرع من اشعة كاما الصادرة من عنصر السيزيوم - 137

الجرعة (غراي)	توزيع الانوية الصغيرة في الخلايا ثنائية النواة					عدد الخلايا الحاوية على نوية صغيرة	عدد الانوية الصغيرة	نوية صغيرة/خلية (المعدل)	المعنوية (p<0.01)
	0	1	2	3	4				
0.00	496	4	-	-	-	4	4	0.008	a
0.1	484	14	2	-	-	16	18	0.036	b
0.2	478	19	2	1	-	22	26	0.052	c
0.3	473	23	3	1	-	27	32	0.064	cd
0.4	467	27	5	1	-	33	40	0.080	e
0.5	460	31	7	2	-	40	51	0.102	f
1.00	440	45	10	3	2	60	82	0.164	g

الحروف المتشابهة للدلالة على عدم وجود فرق معنوي عند مستوى0.01> pحسب اختبار دنكن [22]

كما يبين جدول (1) توزيع إعداد النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية ثنائية النواة حيث احتوت بعض الخلايا على (1-2) نوية صغيرة في نماذج الدم المعرضة للجرعة 0.1 غراي مقارنة بالمجموعة غير المعرضة والتي احتوت خلاياها على نوية صغيرة واحدة فقط . اما الخلايا المعرضة لجرع (0.1-0.5) غراي فأحتوى على (1-3) نوية صغيرة بينما الخلايا المعرضة للجرعة 1.0 غراي فاحتوت خلاياها المتضررة على (1-4) نوية صغيرة . ويعزى ذلك الى حصول بعض الكسور الكروموسوميه في الخلية الواحدة وهذه النتائج تتفق مع ما لاحظه الباحثون [16,14] بوجود الشيء نفسه.

يمثل جدول (2) إعداد النوى الصغيرة و توزيعها في المجموع الكلي للخلايا اللمفاوية المفحوصة (أحادية و ثنائية و ثلاثية و رباعية النواة) حيث اقترح [14] تضمين الخلايا المذكورة في الفحص وذلك لإعطاء أفضل علاقة خطية فعن طريق استعمال طريقة فحص النوى الصغيرة وجد إن أكثر من 40% من هذه الخلايا تكون أحادية وثلاثية ورباعية النواة ، حيث إن الطريقة التقليدية تهمل هذه الأنواع من الخلايا وتعتمد على الخلايا ثنائية النواة (2) .

جدول (2): معدل وتوزيع النوى الصغيرة في الخلايا اللمفاوية احادية و ثنائية وثلاثية ورباعية النواة المعرضة خارج الجسم الحي *In vitro* لجرع من اشعة كاما الصادرة من عنصر السيزيوم - 137

الجرعة (غراي)	توزيع الانوية الصغيرة في الخلايا احادية و ثنائية وثلاثية ورباعية النواة					عدد الخلايا الحاوية على نوية صغيرة	عدد الانوية الصغيرة	نوية صغيرة/خلية (المعدل)	المعنوية (p<0.01)
	0	1	2	3	4				
0.00	532	6	-	-	-	6	6	0.011	a
0.1	508	17	3	-	-	20	23	0.043	b
0.2	501	25	2	1	-	28	32	0.061	c
0.3	507	29	4	1	-	34	40	0.072	cd
0.4	501	33	6	1	-	40	48	0.090	e
0.5	498	36	9	2	-	47	60	0.110	f
1.00	491	55	14	3	2	74	100	0.182	g

الحروف المتشابهة للدلالة على عدم وجود فرق معنوي عند مستوى0.01> pحسب اختبار دنكن [22]

لقد بينت الدراسة الحالية مدى امكانية تحديد علاقات رياضية بين الجرع الاشعاعية والنوى الصغيرة لاستخدامها كمؤشر بيولوجي لتقدير الجرع الاشعاعية فالجدول (3) يوضح العلاقة بين النوى الصغيرة وجرع من اشعة كاما واعتمادا على معامل الانحدار والارتباط حددت معادلات رياضية توضح العلاقة بين النوى الصغيرة والجرع

الاشعاعية جدول (3) اذ يمكن الافادة منها كمؤشر بيولوجي في تقدير الجرع الاشعاعية اثناء الحوادث او نتيجة التعرض المهني لجرع اشعاعية اعلى من الحد المسموح بها دوليا [19] .

جدول (3): يمثل العلاقات الرياضية بين الجرع الاشعاعية والنوى الصغيرة المدروسة والتي حددت اعتمادا على طريقة الانحدار الخطي واعلى معامل ارتباط (r)

معدل النوى الصغيرة	المعادلات الرياضية $Y= a + bD+ cD^2$	معامل الارتباط (r)
نوى صغيرة /خلية لمفاوية ثنائية النواة	$Y+0.0115 + 0.1989D + 0.0465D^2$	0.9952
نوى صغيرة / خلية احادية وثنائية وثلاثية ورباعية النواة	$Y= 0.0164 + 0.2084 D + 0.0433 D^3$	0.9941

Y: معدل التغير المدروس / خلية

D: الجرعة (غراي)

a, b, c : ثوابت

ان تحديد منحنيات قياسية وعلاقات رياضية بتعريض نماذج من دم الانسان خارج الجسم الحي *In vitro* يؤكد ما أشارت اليه دراسات سابقة حول أستخدام هذه التقانة كمؤشر بيولوجي في تقدير الجرع الاشعاعية وذلك لوجود علاقة خطية بين الجرع الاشعاعية وتردد النوى الصغيرة في نماذج دم المعرضة لجرع تزيد على 0.05 غراي من أشعة كاما او الاشعة السينية [12 , 17 ,20, 21]

المصادر

1. Schmid, W.(1979). The micronucleus test. Mut.Res. 31:9-15.-
2. Fenech, J., Morley, A.A., (1986) .Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: Effect of in vivo ageing and low-dose X-irradiation, Mut. Res. 161: 193–198.
3. Ramize ,M.J.; Surreles,J.;Puerto,S,;Creus,A. and Marcos,R.(1999).Low persistence of radiation induced centromer positive and negative micronucli in cultured human cells. Mut. Res. 440: 163–169.
4. Kormos, C. and Keteles ,G.J.(1990).Comparison of cytogenetic test for monitoring over exposure fro ionizing radiation . Acta.Biol. Hung.41:115-120.
5. Balasem, A. N.; Ali, A. K. and Abdul-Khaliq,J.J.(1993).The yield of micronuclei in human blood lymphocyte treated with radioactive caesium . Radiat. Prot. Dosim., 46:295-297.
6. Morgan, W. F.(2003). Non-targeted and delayed effects of exposure to ionizing radiation: I. Radiation-induced genomic instability and bystander effects *in vitro*. Radiat. Res 159:567–580.
7. International Atomic Energy Agency (1986).Biological dosimetry Chromosome aberration analysis for dose assessment, technical reports series No.260, IAEA, Vienna.
8. Grace, M.B.; Salter, C.A.; Bullard,J.R.; Prasanna, P.G.S.; Manglapus, G.L. and Blakely, W.F. (2005).Gene-Expression biomarkers for application to high-throughput radiation biodosimetry. International Journal of Radiation Biology, 78: 1011-1021.
9. Abdul Sahib K. A. (2009). Gene expression using as Biomarkers for detection of ionizing radiation exposure. A thesis submitted to the College of Science, University of Baghdad .
10. Ivan,B.and Koteles, J.K. (1998).Low does response analysis through a cytogenetic end-point center.Euro. J. Occup.Environ.Med. 4(1):15-24.

11. Lloyd, D.C.; Edwards, A.A and Prosser, J.S. (1986). Chromosome aberration induced in human lymphocytes by *In vitro* acute X and gamma radiation. Radiat.Prot.Dosim. 15:83-88.

12. Balasem, A. N and Ali, A. K (2002).Gamma-ray induced chromosomal aberration in lymphocytes: dose response relationships and comparison with the yield of micronuclei. Sci.J. Iraqi A.E.Comission . 4(1):231-237.

13. Fenech, J., Morley, A.A., (1985).Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mut. Res. 147: 29-36.

14. Balasem, A. N.; Ali, A. K.(1991).Establishment of dose response relationships between doses of Cs-137 - gamma rays and frequencies of micronuclei method in human peripheral blood lymphocytes. Mut. Res. 259: 133-138.

15. Pincu ,M.; Bass,D.and Norman,A.(1984).An improved micronuclus assay in lymphocytes. Mut. Res. 139: 61-65.

16. Elmore, E; Lao, X.Y.; Kapadia ,R. and Redpath ,J.L.(2006) .The effect of dose rate on radiation-induced neoplastic transformation in vitro by low doses of low-LET radiation. *Radiat Res* .166:832–838.

17. علي ، عبدالصاحب كاظم و بلاسم ، عباس ناجي و مطر ،امل جبار (2009) . دراسة التغيرات الكروموسومية في الخلايا اللمفاوية المعرضة مختبريا الى اشعة كاما . مجلة جامعة الكوفة لعلوم الحياة-عدد خاص بالمؤتمر العلمي الثاني للعلوم الصرفة والتطبيقية.ص:.5-10 .علي ،عبدالصاحب كاظم (2002) . التأثيرات الوراثية الخلوية لجرع واطئة من اشعة كاما في الخلايا اللمفاوية لدم الانسان . رسالة ماجستير مقدمة الى مجلس كلية العلوم –جامعة بغداد .

18. International Atomic Energy Agency IAEA (2001).Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. Technical Reports Series No.405, Vienna.

19. Kormos ,C.and Koteles ,G. J.(1990). Comparison of cytogenetic test monitoring over exposures from ionizing radiation. Acta.Biol.Hung., 41:127-132.

20. Kanokporn, N. R and Bobby R. S. (2008). Evidence for radiation after *In Vitro* exposure of human lymphocytes to low doses of ionizing .Radiation Dose Response. 6(3): 252–271.

21. Duncan, D.B. (1956). Multiple rang and multiple F-test. Biometrics, 11:1-42.