----- مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص 19-26، 2006-----

تأثير الميثوكسي سورالين بوجود الأشعة فوق البنفسجية الطويلة الموجة (UVA) على حيوية كونيدات الفطر اسبرجلس امستيلودامي

رافعة قادر جرجيس

قسم علوم الحياة

كلية التربية

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2005/1/7 ؛ تاريخ القبول 2005/4/25)

الملخص

تم في البحث الحالي دراسة تأثير الميثوكسي سورالين (8-MOP) والأشعة فوق البنفسجية الطويلة الموجة (UVA) على حيوية كونيدات الفطر اسبرجلس امستيلودامي وذلك بمعاملة العالق الكونيدي للفطر بالسورالين 8-MOP وبواقع 15 مايكروغرام من السورالين لكل مل من العالق الكونيدي ولمدة خمسة دقائق، ثم جرى تعريض العالق الكونيدي للأشعة فوق البنفسجية (UVA) لسبع فترات زمنية 0، 5، 10، 15، 20، 25 و30 دقيقة. ثم فرش العالق الكونيدي لكل معاملة من المعاملات السبعة أعلاه على أطباق الوسط الغذائي الأدنى M والمضاف إليه الملح (D) Sodiumdeoxycholate وحضنت الأطباق لمدة اربعة أيام بدرجة 30° م، بعدها يتم حساب العدد الحي للكونيدات، وقد أظهرت الدراسة تناقصاً واضحاً في العدد الحي للكونيدات مع زيادة الفترة الزمنية للتشعيع، وتم حساب النسبة المئوية لانخفاض العدد الحي للكونيدات للمعاملات الستة مقارنة مع المعاملة صفر للتشعيع.

The Effect of Methoxy Psoralen in Presence of UVA on the Viability of Conidia of the Fungus *Aspergillus amstelodami*

Rafia K. Girges

Department of Biology

College of Education

Mosul University

ABSTRACT

In the present research we studied the effect of 8-MethoxyPsoralen (8-MOP) and long wave ultraviolet (UVA) light on the viability of conidia of the fungus *Aspergillus amstelodami*.

The conidial suspension was treated with 8-MOP (15 Mg/ml) for 5 min, and then exposed to UVA. Seven exposure times (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 min) were tested and appropriate dilution of the conidial suspenion for each treatment was plated on minimal medium to which sodiumdeoxycholate (D) was added.

The plates were incubated for four days at 30°C. Viability of conidia was significantly reduced as the exposure time to NUV increased.

المقدمة

الميثوكسي سورالين (8-MOP) عبارة عن فيوركومارين (furocoumarin) ثلاثي الحلقة العطرية، ذو اصل طبيعي وصناعي(Sage et al., 1993). وقد استخدم هذا العقار بوجود الاشعة فوق البنفسجية الطويلة الموجة (≈ 360 نانوميتر) في المعالجات الكيموضوئية (photochemotherapy) لبعض الامراض الجلدية المزمنة (Wang et al., 2001, Gasparro, 2000) وكذلك يستخدم في صناعة مستحضرات التجميل (Walter, 1986). وتعد الاحماض النووية في الخلية الهدف الرئيسي للتفاعلات الضوئية للسورالينات (Sage and Moustacchi, 1987).

ان النشاط الفوتوبايولوجي للسورالينات يرتبط بقدرتها على احداث جسور رابطة بين سلسلتي الـ DNA (Interstrand crosslinking-ICL) وهذه تؤدي الى نشوء الطفرة في الـ DNA الحامل لها (Ahmed and Gerd, 2004) كما ان الجسور الرابطة التي يصعب اصلاحها من قبل انظمة الإصلاح في الخلية تعمل على تثبيط عملية تصنيع الـ DNA وفقدان كامل لقدرة الـ DNA على التضاعف مما يؤدي الى موت الخلية بفعل السورالين بوجود الاشعة فوق البنفسجية الطويلة الموجة (UVA) وهذا يعرف بالقتل الضوئي (Photokilling)، (Papadopoula and Moustacchi, 1990).

كما ان ارتباط السورالين بجزيئة الـ DNA بوجود UVA يتسبب بشكل كبير في فقدان نشاط قالب الـ DNA الضروري لعملية تصنيع الـ RNA فضلاً عن ان تكوين الإضافات الأحادية (Monoadducts) بين جزيئة السورالين وجزيئة الثايمين لاحدى سلسلتي الـ DNA يحدثُ تثبيطاً في فعالية انزيم بلمرة الـ RNA (RNA-polymerase)، (Averbeck, 1989).

من التأثيرات الفوتوبايولوجية التي تم دراستها في بكتريا *E.coli*، تثبيط مراحل مختلفة في عملية تصنيع البروتين وقد لوحظ ان ارتباط السورالين (8-MOP) بالحامض النووي الرايبوزي الناقل(tRNA) للبكتريا يعمل على تثبيط الانزيم Aminoacyl-tRNA synthetase (Averbeck, 1989).

كما تبين ان تعريض الرايبوسومات الى UVA بوجود السورالين (8-MOP) في الزجاج يعمل على تثبيط عملية تصنيع البروتين (Scott et al., 1976). وكذلك تعمل السورالينات بوجود الضوء على تحطيم DNA المايتوكوندريا وهذه درست في خلايا الخميرة (Averbeck, 1989). وتسعاني جزيئة

السورالين بحد ذاتها تحوراً ضوئياً تأكسدياً (Oxidative photomodification)وهذا يتضمن تحرير الأوكسجين الأحادي والجذور الحرة (Free radicals and singlet oxygen). والنواتج المتأكسدة للسورالينات ترتبط تساهمياً مع بروتينات ودهون غشاء الخلية وهذا يعمل على تحطيم الغشاء الخلوي وبالتالي يؤدي الى موت الخلية (Dall'Acqua and Martelli, 1991).

كما ان التأثير التطفيري للسورالين (8-MOP) بوجود UVA لقي اهتماماً كبيراً من قبل الباحثين وقد درست تأثيراته التطفيرية في مختلف الكائنات الحية مثل فاج البكتريا T_4 وبكتريا *E.coli* (Igali et al., 1970) وكذلك في الخميرة (Averbeck and Averbeck, 1978). وخلايا الإنسان المزروعة (Sage et al., 1993). وأظهر السورالين(8-MOP) بوجود UVA تأثيراً طفرياً عالياً في الفطر الكيمي اسبرجلس.

(AL-Rawi, 2004; Girges, 1999; Kafer et al., 1986),

في البحث الحالي تم دراسة تأثير الميثوكسي سورالين (8-MOP) بوجود UVA على حيوية ونشاط كونيدات الفطر *Aspergillus amstelodami*.

المواد وطرائق العمل

كائن الاختبار

استخدمت السلالة Aq للفطر الكيسي اسبرجلس امستيلودامي وهي سلالة برية (Wild type) ذات كونيدات خضراء اللون ومصدرها Dr.C.E. Caten من قسم الوراثة بجامعة برمنكهام في انكلترا.

الأوساط الزرعية وظروف الزرع

ان الأوساط الزرعية وظروف الزرع التي تم اعتمادها هي كما وصفها Caten (1979). وقد استخدم وسطان أساسيان لأغراض النمو وهما: الوسط الأدنى غير المعضد (Minimal medium) ويرمز لهُ (M)، وقد اجريت الاختبارات على هذا الوسط. ووسط مستخلص الشعير – ملح الطعام (Maltextract-Salt medium) ويرمز لهُ MTS، وقد استخدم هذا الوسط للحصول على اكبر عدد من الكونيدات لتحضير العالق الكونيدي. وللحصول على نمو سريع يضاف للوسط الغذائي محلول الاضافة الكاملة (Complete supplement) ويرمز لهُ (C) وبتركيز نهائي قدرهُ 5% (حجم/حجم) ومكونات هذا المحلول كما مبينة في Girges(1999) وللحصول على مستعمرات عديدة ومنفردة يضاف الى الوسط الغذائي الملح Sodiumdeoxycholate ويرمز لهُ (D)، وبتركيز نهائي مقدارهُ 400 مايكروغرام/مل من وسط النمو.وكان الرقم الهيدروجيني للاوساط الزرعية بعد التحضير بحدود 6 ويتم تحضين المزارع الفطرية بدرجة 30°م وهذه هي الدرجة الحرارية المثلى لنمو الفطر *Aspergillus amstelodami* (Caten, 1979).

المحلول الخزين للميثوكسي سورالين (8-MOP)

هذا المركب غير قابل للذوبان في الماء (Goodman and Gilman, 1975) ولذلك فقد تم تحضير محلول خزين منه باستخدام الكحول الأثيلي المطلق لأذابته وقد تم تحضير محلول خزين من هذا المركب بتركيز مقدارهُ 1000 مايكروغرام/مل من الكحول الاثيلي ويحفظ بعيداً عن الضوء وبدرجة 5ْم.

مصباح الأشعة الفوق البنفسجية القريبة (NUV)

تم التشعيع باستخدام جهاز (Duo-Strahler) الذي يعمل بطول موجي 366/250 نانوميتر.

دراسة التأثير التثبيطي للميثوكسي سورالين على نمو الفطر اسبرجلس امستيلودامي

جرى هذا الاختبار بطريقة الوخز على اطباق M الحاوية على تراكيز متصاعدة من العقار 8-MOP وهي على التوالي 4، 8، 16، 32، 40، 80، 100، 120، 140، 150 و 160 مايكروغرام من العقار 8-MOP لكل مل من وسط النمو M، بالإضافة الى المعاملة صفر أي الوسط M بدون العقار. وتم تحضين الأطباق لمدة أربعة أيام بدرجة 30ْ م، ثم جرى قياس أقطار المستعمرات النامية في كل طبق ولكل تركيز من التراكيز المذكورة أعلاه وتم مقارنتها مع أقطار المستعمرات النامية على الوسط M الخالي من العقار (المعاملة صفر)، كما تم تعين التركيز الذي يتوقف عندهُ النمو حول نقطة الوخز.

تحضير العالق الكونيدي

يتم تحضير العالق الكونيدي من مزرعة حديثة بعمر أربعة أيام ومزروعة على الوسط MTS المضاف إليه محلول الإضافة الكاملة (C) وهذه المزرعة أصلها مستعمرة واحدة نامية على الوسط الأدنى (M) والمضاف إليه المحلول (C) والملح (D). وقد جرى تحضير 50 مل من العالق الكونيدي وكما مبين في AL-Rawi (2004).

دراسة تأثير الميثوكسي سورالين بوجود UVA على حيوية كونيدات الفطر اسبرجلس امستيلودامي

يؤخذ من العالق الكونيدي الذي تم تحضيرهُ في الفقرة (6) عينة صغيرة (حوالي 2مل) لكي تمثل المعاملة صفر وتترك في ظروف المختبر، وينقل حوالي 20مل من العالق الكونيدي نفسهُ الى طبق بتري معقم ونظيف ويضاف إليه العقار 8-MOP وبواقع 15 مايكروغرام/مل من العالق الكونيدي (وذلك بإضافة 0.3 مل من خزين الميثوكسي سورالين الى 20 مل من العالق) ويترك الطبق لمدة خمسة دقائق في ظروف المختبر مع التحريك المستمر قبل ان تجرى عملية التشعيع، بعد ذلك يتم نقل الطبق الحاوي على العقار 8-MOP الى حيز التشعيع (صندوق خشبي مظلم وضع بداخله مصباح الأشعة فوق البنفسجية)، وتجرى عملية التشعيع بعد وضع الطبق مكشوفاً على محرك مغناطيسي يقوم بتحريك العالق

الكونيدي باستمرار, يتم نقل عينة صغيرة (حوالي 3 مل) من العالق الى قنينة صغيرة معقمة بعد مضي كل من الفترات الزمنية التالية للتشعيع 5، 10، 15، 20، 25 و 30 دقيقة.وتعد كل من هذه العينات العالق ذي التخفيف 10^0 للمعاملة المدروسة، وبذلك يكون لدينا ستة معاملات بالإضافة الى المعاملة صفر.

حساب العدد الحي للكونيدات

لحساب العدد الحي للكونيدات لأي معاملة من المعاملات المدروسة يتم تحضير تخافيف متسلسلة من العالق الكونيدي لتلك المعاملة (10^0) ولغاية التخفيف (10^{-5}). ومن هذا الأخير يتم تلقيح طبقي MD بـ 0.1 مل لكل طبق وتفرش بشكل جيد على الوسط الغذائي، ثم تحضن الأطباق بدرجة 30 م لمدة أربعة أيام, بعدها يتم حساب عدد المستعمرات النامية على الطبقين وبحسب المعدل، ومن المعادلة التالية: المعدل × 10 × مقلوب التخفيف (10^5) يمكن حساب عدد الكونيدات الحية في 1 مل من العالق الكونيدي ذي التخفيف 10^0 للمعاملة المدروسة. وكذلك تم حساب النسبة المئوية لتثبيط العدد الحي من خلال المعادلة التالية:

$$\frac{\text{العدد الحي للمعاملة صفر} - \text{العدد الحي للمعاملة المدروسة}}{\text{العدد الحي للمعاملة صفر}} \times 100$$

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج تجربة التأثير التثبيطي للميثوكسي سورالين على نمو الفطر اسبرجلس امستيلودامي وكما مبين في الجدول رقم (1) ان أقطار المستعمرات النامية بوجود التراكيز الثلاثة الأولى للميثوكسي سورالين وهي 4 ,8 ,16 مايكروغرام/مل كانت قريبة من أقطار المستعمرات النامية على الوسط M الخالي من العقار مما يشير الى أن هذه التراكيز ليس لها تأثير تثبيطي ذو اهمية على نمو الفطر. ولكن أخذت أقطار المستعمرات بالتناقص اعتباراً من التركيز 32 مايكروغرام/مل، وتوقف النمو نهائياً حول نقطة الوخز عند التركيز 160 مايكروغرام من العقار (8-MOP) لكل مل من وسط النمو (M) وعليه فإن هذا التركيز يمثل التركيز الأدنى من العقار المثبط لنمو الفطر تثبيطاً تاماً، (Minimum inhibitory concentration). وبناءاً على نتائج هذه التجربة فقد تم اختيار التركيز 15 مايكروغرام من العقار 8-MOP لدراسة تأثيرهُ على حيوية كونيدات الفطر اسبرجلس امستيلودامي بوجود الأشعة فوق البنفسجية (UVA). وقد كررت التجربة اربع مرات. وكما مبين في الجدول (2) هناك تناقص واضح في معدل العدد الحي للكونيدات بعد تعريض العالق الكونيدي (المعامل بالعقار 8-MOP) للأشعة فوق البنفسجية UVA بدءاً من الفترة الزمنية5 دقائق، اذ كان العدد

الحي للمعاملة صفر(بدون عقار وبدون تشعيع) 178 × 10^5، بينما تراوح العدد الحي للكونيدات لفترات التشعيع الستة 5، 10، 15، 20، 25 و 30 دقيقة وبوجود العقار 8-MOP (بتركيز 15 مايكروغرام/ مل من العالق الكونيدي) بين 152 × 10^5 للفترة الزمنية للتشعيع خمسة دقائق و 54 × 10^5 للفترة الزمنية للتشعيع 30 دقيقة. وكذلك يبين الجدول (2) النسبة المئوية لتثبيط العدد الحي للكونيدات إذ نلاحظ وجود زيادة واضحة في هذه النسبة تبدأ بـ 14.6% للفترة الزمنية للتشعيع 5 دقائق وتزداد هذه النسبة بزيادة الفترة الزمنية للتشعيع حتى تصل الى 69.66% للفترة الزمنية 30 دقيقة.

ان هذا التثبيط في العدد الحي للكونيدات بعد معاملتها بالسورالين (8-MOP) وتعريضها للأشعة فوق البنفسجية (UVA) يعزى الى عدة أسباب وأهمها ارتباط السورالين بوجود الضوء بالحامض النووي الـ DNA وتكوين الجسور الرابطة (Interstrand cross-lniks) والتي يصعب إصلاحها من قبل أنظمة الإصلاح في الخلية مما يؤدي الى تثبيط عملية تصنيع الـ DNA وفقدان كامل لقدرة الـ DNA على التضاعف وهذا بدوره يؤدي الى موت الخلية (Photokilling)، (Papadopoula and Moustacchi, 1990). كما أن السورالين بحد ذاته قد يعاني تحوراً ضوئياً تأكسدياً، والنواتج المتأكسدة للسورالين لها القدرة على الارتباط تساهمياً مع بروتينات ودهون غشاء الخلية، وهذا يعمل على تحطيم الغشاء الخلوي وبالتالي يؤدي الى موت الخلية (Dall'Acqua and Martelli, 1991; Averbeck, 1989). وكذلك قد يعمل السورالين بوجود (UVA) على تثبيط مراحل مختلفة في عملية تصنيع البروتين كما أن الجسور الرابطة (ICL) تثبط تثبيطاً تاماً عملية الترجمة (Trascription) وبالتالي تثبيط عملية تصنيع البروتين والانزيمات المختلفة التي تحتاجها الخلية (Kupiec, 2000).

الجدول 1: أقطار المستعمرات (سم) للفطر *A.amstelodami* المزروعة على تراكيز مختلفة للعقار 8-MOP

أقطار المستعمرات(سم)		تراكيز السورالين (مايكروغرام/مل)											
		0	4	8	16	32	40	80	100	120	140	150	160
	مكرر(1)	2.6	2.4	2.4	2.1	1.7	1.5	0.8	0.5	0.3	0.2	0	0
	مكرر(2)	2.5	2.4	2.3	2.1	1.9	1.3	0.6	0.5	0.2	0.1	0	0
	مكرر(3)	2.7	2.3	2.4	2.2	1.8	1.4	0.7	0.4	0.2	0.1	0	0
	مكرر(4)	2.6	2.5	2.5	2.2	1.8	1.5	0.7	0.4	0.2	0.2	0.2	0
	المعدل	2.6	2.4	2.4	2.15	1.8	1.425	0.7	0.45	0.225	0.15	0.05	0

الجـــدول 2: العـــدد الحي للكونيدات × 10^5 بعد المعاملة بالميثوكسي سورالين* والأشعة فوق البنفســـجية الطويلة الموجة (UVA)**

% لتثبيط العدد الحي	العدد الحي للكونيدات × 10^5					الفترة الزمنية للتشعيع(دقيقة)
	المعدل ×10^5	مكرر (4)	مكرر (3)	مكرر (2)	مكرر (1)	
zero	178	124	142	260	186	0
14.6	152	118	133	180	177	5
26.82	130.25	102	85	158	176	10
30.75	123.25	100	80	143	170	15
34.69	116.25	89	81	127	168	20
54.63	80.75	82	70	75	96	25
69.66	54	33	35	75	73	30

* 15 مايكروغرام/مل

** 366 نانوميتر

المصادر الاجنبية

Ahmad, Besaratinia and Gerd, P. and Pfeifer., 2004. Biological consequences of 8-Methoxypsoralen-photoinduced lesions: Seguence-specificity of mutations. J. Invest. Dermatol. 123: pp.1140-1146.

AL-Rawi, G.M., 2004. The mutagenic effects of some environmental agents in *Aspergillus amstelodami*. M.Sc. Thesis, University of Mosul, Iraq.

Averbeck, D. and Averbeck, S., 1978. Dose rate effects of 8-MOP plus 365-nm irradiation on cell killing in *Saccharomyces cerevisiae*. Mutat. Res., 50: pp.195-206.

Averbeck, D., 1989. Recent advanced in psoralen phototoxicity mechanism photochem. Photobiol., 50: pp.859-882

Caten, C.E., 1979. Genetical determination of condial colour in *Aspergillus heterocaryoticus* and relationship of this species to *Aspergillus amstelodami*. Trans. Bri. Mycol. Soc.,73: pp.65-74

Dall'Acqua, F. and Martelli, P., 1991. Photosensitizing action of furocoumarin on membrane components and consequent intracellular event.J. Photochem. Potobiol. B8: pp.235-254

Gasparro, F.P., 2000. The role of PUVA in the treatment of psoriasis. Photobiology issues related to skin cancer incidence. Am. J. Clin. Dermatol. 1: pp.337-348

Girges, R.K., 1999. Mutagenicity of trisoralen and NUV in *Aspergillus amstelodami*. Ph.D Thesis, University of Mosul , Iraq.

Goodman, L.S. and Gilman, A.G., 1975. The pharmacological basis of therapeutics, 5th edition, associate editors, Gilman, A.G. and Koella, G.B.

Igali, S., Bridges, B.A., Ashwood-smith and Scott, B.R., 1970. Mutagenesis in *E. coli*. Mutat. Res., 9: pp.21-30

Kafer, E., Scott, B.R. and Kappas, A., 1986. Systems and results of testes for chemical induction of mitotic malesegregation and aneuploidy in *Aspergillus nidulans*. Mutat. Res., 167: pp.9-34

Kupiec, M., 2000. Damage-induced recombination in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mutat. Res. 451: pp.91-105

OU, C.N. and Song, P.S., 1978. Photobinding of 8-MOP to transfer RNA and 5-florouracil enriched transfer RNA. Biochemistry, pp.1054-1059

Papadopoulo, D. and Moustacchi, E., 1990. Mutagenic effects photoinduced in normal human lymphoblasts by monofunctional pyridopsoralen in comparison to 8-MOP. Mutat. Res., 245: pp.259-266

Sage, E. and Moustacchi, E., 1987. Sequence context effects on 8-MOP photobinding to defined DNA fragments. Biochemistry, 26: pp.3307-3314

Sage, E., Drobetsky, E.A and Moustacchi, E., 1993. Induced mutation are highly targeted at cross linkable sites of photoaddition on the non- transcribed strand of mammalian chromosomal gene. The EMBO Journal, 12: pp.397-402

Scott, B.R., Pathak, M.A., and Mohn, G.R., 1976. Molecular and genetic basis of furocoumarins reactions. Mutat. Res., 39: pp.29-74

Walter, H.K., 1986. Psoralen photomutagenic specifity in *Salmonella typhimurium*. Mutat. Res. 160: pp.195-205

Wang, S.Q., Setlow, R., Berwick, M., Polsky, D., Marghoob, A.A., Kopf, A.W. and Bart, RS., 2001. Ultraviolet A and melanoma: Arewiew. J. Am. Acad. Dermatol. 44: pp.837-846