حجم أنوية الخلايا المنوية لنسيج الخصية في الأرانب النيوزلاندية البيضاء Oryctolagus cuniculus كمؤشر للجينوم

قمرة مختار النعاس*1 ، رمضان مفتاح حطيبة2
1قسم الأحياء، كلية العلوم، جامعة مصراتة، مصراتة، ليبيا
2قسم الأنسجة، كلية الطب البشري، جامعة مصراتة، مصراتة، ليبيا
g.naas@sci.misuratau.edu..ly

الملخص:
تبحث الدراسة الحالية الفروق في حجوم أنوية الخلايا المنوية ثنائية وأحادية الصيغة الصبغية بالنسيج الخصوي لخمس ذكور بالغة بالارنب Oryctolagus cuniculus بالأضافة، ولغرض المقارنة بالخلايا المشيجية، تم تحضير مسحة دم مصبوغة بصبغة Giemsa لتعيين حجم أنوية الخلايا اللمفاوية الدموية ثنائية الصيغة الصبغية (N2). قطاعات خصوية رقيقة تم تحضيرها روتينيا وصبغت بصبغة hematoxylin and eosin حجوم الأنوية للأنواع المختلفة من الخلايا ثم قياسها باستعمال عدسة ميكروسكوبية عينية مدرجة. عدد الخلايا التي أستعملت لقياس قطر الأنوية كان 1.000 خلية منوية أولية، 500 خلية منوية ثانوية، ثم 500 خلية دم لمفاوية. التحاليل الأحصائية تشير إلى وجود فروق معنوية واضحة بين حجوم انوية ثنائية وأحادية الصيغة الصبغية عند المستوى المعنوي0.05 >α. حجوم أنوية الخلايا ثنائية الصيغة الصبغية أكبر من تلك بالخلايا احادية الصيغة الصبغية بقيمة تقدر بحوالي 50%..

الكلمات المفتاحية: حجم انوية، ، الجينوم، خلايا الدم البيضاء اللمفاوية، الخلايا المنوية .

المقدمة Introduction

ذكر [10]بأن عدد الصبغيات (Chromocomes) في الخلايا الجسدية في الأرانب تساوي44 . تتميز الصبغيات بانها توجد في الخلايا الجسدية بأعداد زوجية وهو ما يعرف بثنائية الصيغة الصبغية(Diploid, 2N) وتلك الأزواج هي ازواج متماثلة(Homologous Pairs) تماما أحدهما موروث من الأب والأخر موروث من الأم.

الخلايا التناسلية(البويضة والحيوان المنوي) تحتوي على نصف العدد الصبغي الاصلي المميز للنوع وتسمى أحادي الصيغة الصبغية(Haploid, 1N) ويتحقق ذلك بواسطة الأنقسام الأختزالي المنصف أو الختزالي(Meiosis) . يتكون الأنقسام الأختزالي من انقسامين متعاقبين وخلال الانقسام الأول يختزل عدد الصبغيات وكمية مادة الحمض النووي الريبوزي منزوع الأكسجين (Deoxyribonucleic Acid, DNA) الى النصف. بينما تختزل كمية الـ DNA الى النصف خلال الانقسام الثاني.

كمية الـــ DNA في النواة هي الغالبة. يعتبر التركيب الأساسي للمورثات مستند بالدرجة الأولى إلى الـــ DNA. هذا من جهة ، ومن جهة أخرى ، فإن أنماط الـــ DNA المرتبطة بالبروتين موجودة بكميات في السيتوبلازم، ولاتتجاوز نسبته 0.1% من مجموع الـ DNAالخلية . الجدير بالذكر أن كمية الDNA في خلايا الأمشاج تساوي نصف كميته في الخلايا التي تمتلك الصيغة الصبغية الثنائية (Diploid) للنوع نفسه وبالجدية نفسها يجرى الحديث في لغة الوراثة عن الصبغيات تماما فتوزع الـــDNA على عدد محدد من الصبغيات ثابت لكل الأنماط الخلوية الثابتة في الفرد الواحد، ويختلف بثباته، وكميته وتوزعه من نوع إلى أخر [5].

يتجزا الـDNA الخلية الحقيقية إلى عدة أجزاء ويتم تكوين الصبغيات منها عند بداية انقسام الخلية على عكس الـ DNA الخلية الأولية الذى يبقى متصلا مما ينتج عنه تكوين صبغي واحد. قام [12]باستعمال مصطلح -C Value في اشارة إلى محتوى الـــــ DNA في الهيئة الصبغية الاحادية (N1) والتي تعرف حاليا في البحوث العلمية بمصطلح حجم الجينوم (Genomic size) في الحيوانات ذات الصيغة الصبغية الثنائية (N2)

يشير متوسط حجم أنوية خلايا الدم احمراء (Erythrocytes) في الحيوانات الغير ثدييه كما في سمك القط (Catfish) لنوع Ictalurus punctatus على سبيل المثال إلى حد بعيد لتحديد الـ 13] Ploidy]وأن الزيادة في عدد الصبغيات نظريا تسبب الزيادة في حجم أنوية الخلايا.

الجزء العملي Eexperimental Part

المواد وطرق البحث:

استخدمت خمسة ارانب ذكور نيوزلاندية بيضاء (Oryctolagus cuniculus) يتراوح عمرها 6-12 شهرا تقريبا ، وسجلت أوزانها قبل البدء في عملية التشريح فكانت بين 1،532-2،540 جم

1 فحص فلم الدم الدقيق(مسحة الدم): Examination of Thin Blood Film

يوضع الأرنب على لوحة التشريح على ظهره، ويربط بعد تخديره باستعمال قطن مبلل بالكلوروفورم يوضع على الانف. يجمع الدم بواسطة حقنة بحجم 29-G26 من قلب الأرنب. حضرت سحبة الدم وفق قواعد متفق عليها [7]. ثم فحصت تحت المجهر بإستخدام قوة تكبير x40- ثم x100 .يتم اختيار أفضل حقل يهدف أنوية خلايا الدم البيضاء اللمفاوية (Lymphosytes) (تمثل عينة إضافية تأكدية للخلايا المنوية الأولية(Primary Spermatocyes) ولخلايا أمهات المني (Spermatogonia) وذلك لإشتراكهما في الصيغة الصبغية الثنائية للصبغيات(N2).

2- تحضير القطاعات النسيجية بالشرائح الزجاجية باستعمال تقنية شمع البرافين.

تم الإعداد للتحضيرات النسيجية بعد ذبح الأرانب حيث فتحت المنطقة البطنية السفلية بإستخدام مشرط لإستخراج الخصية الموجودة داخل كيس الصفن(Scrotum).

سجلت المعلومات الخاصة بالخصية من حيث الوزن ، الطول والعرض، وأخذت قطاعات عرضية لكل خصية من كل أرنب، وأعطيت رقم خاص بها (1،2،3،4،5). نقلت العينات إلى أنبوب يحتوي على محلول Neutral Buffered Formalin10% لغرض التثبيت والحفظ. تم اجراء باقي الخطوات والصبغ الروتينية المتبعة للتحضير النسيجي حسب طريقة [11] . باستخدام D.P.X.تم لصق غطاء الشريحة (Coverslip) على الشريحة وبذلك تصبح جاهزة للفحص المجهري.

3- معايرة واستعمال الشريحة العينية المدرجة(Ocular Micrometer):

استعملت شريحة مدرجة عيارية التدريج، مصنوعة من شركة البصريات في أمريكا(American Optical Company, Buffalo, N.Y.) ضبطت العينية المدرجة 10-0، بتثبيتها داخل عينية المجهر. وضعت العدسة الشيئية على القوة x100، وعند تطابق أي خطي من خطوط الشريحة المدرجة مع خطي من العدسة العينية المدرجة أخذت قراءة العينية بالميكرومتر، فنحصل على المسافة بين خطين من العينية المدرجة بالميكرومتر

4- الفحص وتسجيل القياسات:

بعد الإنتهاء من عملية المعايرة، فحصت مسحات الدم والقطاعات النسيجية بالشرائح الزجاجية تحت المجهر للتعرف على أنوية خلايا الم البيضاء اللمفاوية(Lymphocytes)،الخلايا المنوية الأولية (Primary Spermatocytes)، أمهات المني (Spermatogonia) وأنوية الخلايا المنوية الثانوية(Secondary Spermatocytes) . وضعت العدسة الشيئية للمجهر على القوة 100x (أي العدسة الشيئية الزيتية) واستعملت العدسة العينية المدرجة بقوة 10x . حيث أخذت القياسات لأقطار 1,000نواة لكل من الخلايا ا لمنوية الأولية (Primary Spermatocytes) وأمهات المني (Spermatogonia) ، 500قراءة لأنوية الخلايا المنوية الثانوية(Secondary Spermatocytes) لقلة تواجدها في قطاع نسيج الخصية بسبب فترة حياتها القصيرة، 500 قراءة لأنوية خلايا الدم البيضاء اللمفاوية (Lymphocytes) بأحجامها الكبيرة ، المتوسطة والصغيرة(Large, Small, and Medium-sized Lymphocytes).

5-التحليل الإحصائي:

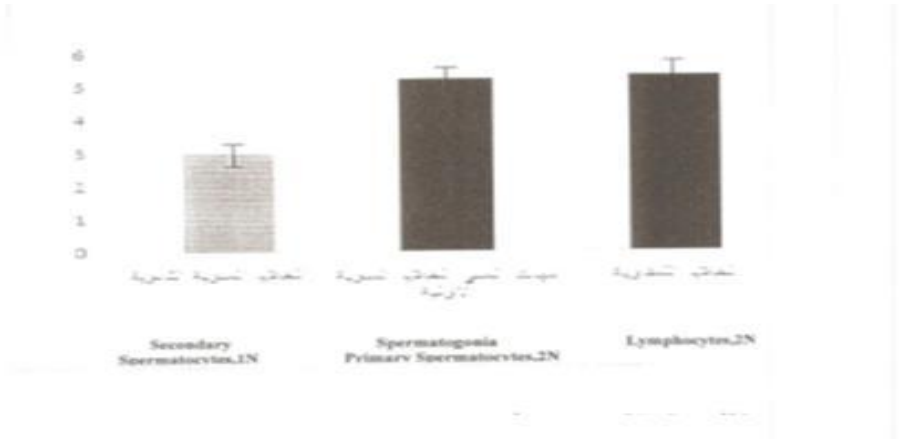
تم إجراء تحليل التباين وفق تصميم Randomized Completely Design (RCD) لمعرفة وجود فروق معنوية بين N2وN1 عند مستوى معنوية 0.05 >1] α [.

النتائج والمناقشة RESULTS AND DISCUSSION

هناك اختلافات في قيم تكرار حجم الأنوية للخلايا المنوية الثانوية أحادية الصيغة الصبغية (Haploid, 1N) في الأرانب فكانت 2.5-4.10 ميكرومتر، في حين كانت في الخلايا المنوية الأولية وأمهات المني ثنائية الصيغة الصبغية (Diploid, 2N) 5.00 - 7.00 ميكرومتر . من جهة أخرى ، كانت قيم تكرار حجم الأنوية لخلايا الدم البيضاء اللمفاوية ثنائية الصيغة الصبغية (Diploid, 2N) — 5.20- 7.00 ميكرومتر.

هناك اختلافات في قيم متوسط حجم أنوية الخلايا المنوية واللمفاوية فكان متوسط حجم أنوية الخلايا المنوية واللمفاوية فكان متوسط حجم أنوية الخلايا المنوية ثنائية الصيغة الصبغية (Diploid, 2N) 5.1730 ميكرومتر بينما متوسط حجم أنوية خلايا الدم البيضاء اللمفاوية ثنائية الصيغة الصبغية (Diploid, 2N) 5.2855 ميكرومتر. من ناحية اخرى ، كان متوسط حجم أنوية الخلايا المنوية أحادية الصيغة الصبغية (Haploid, 1N) 2.9160 ميكرومتر (شكل1). هناك فرق معنوي بين حجم أنوية الخلايا ثنائية الصيغة الصبغية وحجم أنوية الخلايا أحادية الصيغة الصبغية عند مستوى معنوي0.05 > α (جدول 1،2).

نظرا لعدم عزل الـ DNAبسبب صعوبة فصل أنوية الخلايا المنوية الأولية وأمهات المني (N2) ، وأنوية الخلايا النوية الثانوية (N1) نتيجة عدم توفر الامكانيات التقنية والمادية في الوقت الحاضر ، أدى هذا الى عدم دراسة الصبغيات دراسة كافية ودقيقة بالدراسة الحالية.



شكل1. متوسط قيم حجم انوية الخلايا المنوية واللمفاوية.

جدول1.قيم المنوسط لحجم أنوية الخلايا المنوية واللمفاوية.

الصبغة الصبغية	المتوسط (µm)	الانحراف المعياري	عدد العينات	الخطا المعياري
1N	2.9160	0.26664	200	0.01885
2N	5.1730	0.06852	200	0.00484
2N-لمفاوية	5.2855	0.13576	200	0.00960

جدول2. متوسط حجم الأنوية والانحراف المعياري للخلايا المنوية واللمفاوية

رقم العينة	الصيغة الصبغية	عدد العينات	المتوسط (µm)	الانحراف المعياري	اكبر قيمة (µm)	اصغر قيمة (µm)	المدى (µm)	الخطا المعياري
الأولى	1N	100	3.5840	0 .34749	4.10	3.20	0 .90	0 .03475
	2N	200	5.9745	0.57642	6.90	5.20	1.70	0 .04076
	-2N لمفاوية	100	6.2040	0.64148	6.90	5.20	1.70	0 .06415
الثانية	1N	100	3.2200	0 .48969	3.90	2.50	1.40	0 .04897
	2N	200	5.9840	0 .63447	6.90	5.20	1.70	0 .04486
	-2N لمفاوية	100	5.9220	0 .72969	6.90	5.20	1.70	0 .07297
الثالثة	1N	100	3.2850	0 .35686	3.90	2 .90	1.00	0 .03569
	2N	200	6.0985	0 .56100	7.00	5.00	2.00	0 .03967
	-2N لمفاوية	100	6.0350	0 .74622	6.90	5.20	1.70	0 .07462
الرابعة	1N	100	3.3140	0.38271	3.90	2.50	1.40	0 .03827
	2N	200	5.8610	0 .65860	7.00	5.00	2.00	0 .04657
	-2N لمفاوية	100	5.9940	0 .64021	6.90	5.20	1.70	0 .06402
الخامسة	1N	100	3.0430	0.31790	3.90	2.50	1.40	0 .03179
	2N	200	5.9680	0 .68529	6.90	5.20	1.70	0 .04846
	-2N لمفاوية	100	5.8030	0.67021	7.00	5.20	1.80	0 .06702

تشير نتائج هذه الدراسة إلى أن حجم أنوية الخلايا المنوية ثنائية الصيغة الصبغية (N2) مساو تقريبا لحجم أنوية الخلايا اللمفاوية ثنائية الصيغة الصبغية (N2) . السبب في ذلك قد يرجع إلى أن المقادير النسبية للقواعد ثابتة في الـ DNA بغض النظر عن العضو الذي استخلص منه النسيج ، في نفس النوع من الحيوانات نجد أن مقدار ال - DNA في النواة واضح الثبات وأن عملية تخليق ال DNA والصبغي عمليتان متوافقتان ومتلازمتان في الحدود. سجلت الدراسة الحالية زيادة في حجم أنوية الخلايا المنوية ثنائية الصيغة الصبغية(N2) بحوالي 50% عن حجم أنوية الخلايا المنوية أحادية الصيغة الصبغية(N1). قد يشير هذا الى أن تحديد الحجم النووي ينبع من الصبغي نفسه وليس من مصدر أعم في النواة. نتائج هذه الدراسة تتفق مع ما أشار إليه [12]في سمك القط I.Punctatus ثنائية وثلاثية الصيغة الصبغية وهي أن الزيادة في عدد الصبغيات نظريا تسبب الزيادة في حجم انوية الخلايا.

التغير الحاصل في حجم Ploidy ينتج عنه زيادة تقدر بحوالي 50% في حجم النواة وأن النسبة المئوية للتنبؤ عن التفاوت بين التقطتين الحاصلتين في Ploidy تـــكون في المحور الأكبر (92.65% Major Axis)، وأن نسبة الخطأ التجريبي للمحور الأكبر 6%.

توصل [3]عند دراسة الأسماك Poeciliopsis spp. إلى أن جميع قيم أنوية الخلايا في الأسماك الثلاثية الصيغة الصبغية تجاوزت قيم حجم أنوية الخلايا في الأسماك ثنائية الصيغة الصبغية.أشار[8]، [4] و [9]

بأن حجم النواة في البرمائيات والزواحف له علاقة وطيدة موجبة بحجم الجينوم. تشير كل الدرسات الخاصة إلى وجود علاقة طردية بين حجم الجينوم وحجم الخلايا [8]
بين [6] أن محتوى الخلية من ألـ DNA في الجرد الصحراوي Typanoctomys barrerae ذو الصيغة الصبغية الرباعية (N4) يكون ضعف ما هو موجود في الأنواع ذات الصيغة الصبغية الثنائية (N2)
هناك اختلافات في تكرار قيم حجم الأنوية ثنائية الصيغة الصبغية (N2) وقيم تكرار حجم الأنوية أحادية الصيغة الصبغية(N1)، قد ترجع هذه الأختلافات إلى أطوار الإنقسام المختلفة . في الطور البيني والتمهيدي تظهر الصبغيات رفيعة ومتعرجة بسبب التميؤ العالي للصبغيات وزيادة حجم النواة، في حين تحتوي الصبغيات في الطور الأستوائي على مقدار من الماء اقل مما تحتويه نواة الطور البيني ويكسب هذا انكماش وزيادة في قطر الصبغي ونقص في حجم النواة . كذلك قد يرجع هذا الاختلاف في تكرار قيم حجم النواة إلى تغير في حالة البروتينات النووية.

المراجع References

1) الساهوكي، وهيب. (1990) . تطبيقات في تصميم وتحليل التجارب.دار الحكمة، الموصل، 488ص ص.
2) 3 2) aspermatogenic nuclear size in the testicular tissue of the new Zealand whitw rabbits, Oryctolagus cuniculus , as an indicator of the genome
3) (3 Cimino, m. c. (1973). Karyotypes and erythrocyte sizes of some diploid and triploid fishes Of the genus poeciliopsis. Journal of the research board of Canada, 30: 1736-1737.
4) Desmet, H. M.(1981). Genome And Cell Size In Reptiles. Basic applied histochemistry, 26: 27-34
5) Felsenfeld, g. (1985). DNA. Scientific amercan , october: 58-67
6) Gallardo, M. H., J. W. Bickham, R. L. Honeycutt, R. A. Ojeda And N. Kohler. (1999). Discovery Of Tetraploidy In Mammal, Nuture, 401:341.
7) Humason, g. l. (1979). Animal Tissue Techniques. Fourth edn. W. h. freeman and company, san Francisco. 661pp.
8) Olmo, e. (1983). Nucleotype and cell size in vertebrates: a review. Basic applied histochemistry, 27: 227-256.
9) Olmo, E. and A. Morescalchi. (1978). Genome and cell sizes in frogs: A comarsion with salamaders. Experientia, 34:44-46.
10) Painter, t. s. studies in mammalian spermatogenesis (1926) . The chromosomes of the rabbit. Journal of morphology and physiology, 43: 1-43.
11) Sheehan, d. c. and b. b. hrapack. (1980). Theory and practice of histotechnology. 2 edn. C. v. mosby, saint Louis.
12) Swift, H. (1950) The Constancy Of Deoxyribose Nucleic Acid In Plant Nuciei. Proceedings Of The National Academy Of Sciences. Of Sciences, Usa, 36: 643-654.
13) Wolters, w. r., c. l. Chrisman, And G. S. Liby. (1982). Erythrocyte nuclear measurements of diploid and triploid channel catfish, Ictalurus punctatus (rafinesgue). Journal of fish biology, 20: 253-258

Spermatogenic nuclear size in the testicular tissue of the new Zealand whitw rabbits, *Oryctolagus* cuniculus , as an indicator of the genome

Gamra M. Naas1and Ramdan M. Hatayba2
1biology Department, Faculty Of Sciences , Misurata University ,Misurata, Libya
2 Histology Departmen , Faculty Of Medcine, Misurata University, Misurata, Libya
G.Naas@Sci.Misuratau.Edu..Ly

Abstract:
the current study investigates the differences in nuclear sizes of diploid (2N) and haploid(1N) spermatocytes in testicular tissue of five adult rabbit males, Oryctolagus cuniculus. In addition, for the purpose of comparison that of the gametocytes, a blood smear stained with giemsa stain was prepard to determine the nuclear size of the diploid (2N) blood lymphocytes. Testicular thin sections were routinely prepared and stained with hematoxylin and eosisn. Nuclear sizes of the different cell types were measured by the use of ocular micrometer. The number 0f cells included in the measurements of the nuclear diameter was 1,000 diploid primary spermatocytes, 500 haploid secondary spermatocytes, and 500 diploid blood lymphocytes. Statistical analyses indicate clear significant differences between the diploid and haploid nuclear sizes at a significant level of $\alpha<50\%$. the nuclear sizes of the diploid cells are about 50% larger than that of the haploid cells.

Keywords:. nuclu size , genome, lympho cyte, spermato cyte .