



جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة ميسان - كلية العلوم
قسم علوم الحياة

التغيرات الوراثي لجيني *AhR2* و *CYP1A* في سمك الكارب الشائع المعرض
لـ **Benzo (ghi) perylene** و **Benzo (a) pyrene** و **البنفط الخام**

رسالة مقدمة إلى

مجلس كلية العلوم / جامعة ميسان

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير في علوم الحياة

من قبل

آلاء حسن حاتم

بكالوريوس كلية التربية - علوم الحياة (2005)

بإشراف

أ. م. د. صالح حسن جازع

2023م

أ. م. د. صلاح حسن فرج

1445هـ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
(قَالُوا سُبْحَانَكَ لَا عِلْمَ لَنَا إِلَّا مَا عَلَّمْتَنَا إِنَّكَ أَنْتَ الْعَلِيمُ الْحَكِيمُ)
صَدَقَ اللَّهُ الْعَلِيُّ الْعَظِيمُ

سورة البقرة الآية (32)

بسم الله الرحمن الرحيم

إقرار المشرفين

نقر بأن إعداد هذه الرسالة الموسومة: التغيرات الوراثي لجيني *AhR2* و *CYP1A* في سمك الكارب

الشائع المعرض للنفط الخام و *Benzo (a) pyrene* و *Benzo (ghi) perylene*

المقدمة من قبل الطالبة (آلاء حسن حاتم)

قد جرى تحت إشرافنا في قسم علوم الحياة / كلية العلوم / جامعة ميسان كجزء من متطلبات نيل

درجة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:

الاسم: د. صلاح حسن فرج

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الاختصاص الدقيق: وراثية جزيئية

التاريخ:

التوقيع:

الاسم: د. صالح حسن جازع

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

الاختصاص الدقيق: تلوث بيئي

التاريخ:

توصية رئيس القسم

بالنظر لتوصية المشرفين أحيل هذه الرسالة إلى لجنة المناقشة.

التوقيع:

الاسم: د. ميثم عبد الكاظم دراغ

المرتبة العلمية: أستاذ مساعد

المنصب: رئيس قسم علوم الحياة

التاريخ:

إقرار لجنة المناقشة*

تشهد نحن أعضاء لجنة التقييم والمناقشة الموقعين أدناه أننا أطلعنا على الرسالة الموسومة بـ (التغاير الوراثي لجيني *AbR2* و *CYP1A* في سمك الكارب الشائع المعرض للنفط الخام و *Benzo (a) pyrene* و *Benzo (ghi)* و *perylene*) المقدمة من قبل الطالبة (الأه حسن حاتم)، وناقشنا الطالبة في محتوياتها وفيما له علاقة بها، بتاريخ 2023/9/17 فوجدناها جديرة بالقبول لنيل درجة الماجستير في علوم الحياة.

التوقيع:
الأستاذ

د. أسعد يحيى عايد

كلية الزراعة / جامعة البصرة

التاريخ: / / 2023

رئيس اللجنة

التوقيع:
الأستاذ المساعد

شيماء ربيع يعقوب

كلية العلوم / جامعة ميسان

التاريخ: / / 2023

عضو اللجنة

التوقيع:
الأستاذ المساعد

د. نيران عثمان عباس

كلية العلوم / جامعة ميسان

التاريخ: / / 2023

عضو اللجنة

التوقيع:
الأستاذ المساعد

د. صالح حسن جازع

كلية العلوم / جامعة ميسان

التاريخ: / / 2023

عضو اللجنة والمشرف

التوقيع:
الأستاذ المساعد

د. صلاح حسن فرج

كلية العلوم / جامعة ميسان

التاريخ: / / 2023

عضو اللجنة والمشرف

مصادقة عمادة كلية العلوم / جامعة ميسان

التوقيع

الأستاذ المساعد

د. تحسين صدام فهد

التاريخ: / / 2023

العميد

الإهداء

إلى بقية الله في أرضه إلى من يدفع الله به البلاء عنا الإمام المنتظر عجل الله فرجه الشريف
إلى من كان سبباً في تحقيق حلمي إلى من ضحى بروحه فداءً وحباً لوطنه جدي رحمه الله
إلى مصدر اعترانري واقتخاري إلى من أعيش ببركة دعائهما أبي وأمي أطال الله عمرهما
إلى من ملأوا حياتي بالتحدي وتحطى الصعاب قرّة عيني وفلذة كبدي نروحي وأبنائي
إلى كل من علمني حرفاً وساندني ولو بابتسامة أهدي ثمرة جهدي المتواضع

شكر وتقدير

الحمد لله والشكر له كما ينبغي لجلال وجهه وعظيم سلطانه عدد خلقه ورضا نفسه وزنة عرشه ومداد كلماته على أن من عليّ بإنجاز هذه الرسالة، والصلاة والسلام على أفضل الخلق نبينا محمد وعلى أهل بيته الطيبين الطاهرين وأصحابه المنتجبين، واهتداء بقول النبي محمد صلى الله عليه وآله وسلم في قوله: (من لم يشكر الناس لم يشكر الله)، فمن هنا أغتتم هذه الفرصة كي أتقدم بجزيل الشكر والامتنان والعرفان إلى كل من أفاض عليّ عطفه وشاركني جهده، فأثمر ذلك وسعى في غرس بذور هذا العمل المتواضع حتى ظهر إلى النور، وأخص بالشكر والتقدير والامتنان أستاذي المشرفين على رسالتي الدكتور صلاح حسن فرج والدكتور صالح حسن جازع لما قدماه من دعم ومسانده وآراء علمية سديدة ساهمت في إتمام البحث متمنية لهما دوام التوفيق وجزاهما الله عني خير الجزاء.

وكما يسعدني أن أتقدم بخالص شكري وتقديري إلى عمادة كلية العلوم / جامعة ميسان لرعايتها وتقديمها التسهيلات لطلبة الدراسات العليا، وأوفر الشكر والامتنان إلى جميع كادر قسم علوم الحياة في كلية العلوم وفي مقدمهم رئيس القسم الدكتور ميثم عبد الكاظم دراغ.

كما أتقدم بالشكر الجزيل للدكتور أحمد سالم شنتة لمساعدته في تحضير تراكيز مركبات المعالجة، وكذلك الشكر موصول للدكتور محمد هاتو والأستاذ خضير عبد العباس في كلية الزراعة لملاحظتهما القيمة في تربية الأسماك، وكذلك الشكر الموصول للدكتور باسم العريبي مدير بيطرة محافظة ميسان لمساعدته في فحص الأسماك، كما أتقدم بالشكر الجزيل للأستاذ عبد الحسين عليعل في مركز علوم البحار/ جامعة البصرة لمساعدته في تقدير المركبات بجهاز HPLC ، وعميق شكري وعرفاني للأستاذ علي ياسين فالح لمساعدته في سحب الدم والشكر موصول لشركة نفط ميسان لتجهيزنا بالنفط الخام .

وأقدم بكل ما تجود به معاني الشكر والعرفان، لأقف على بحر جودهم وحنانهم عائلي، ولا سيما زوجي لما بذلوه من صبر وجهد وتحملهم من أجلي الكثير طوال مدة الدراسة والبحث. ولا يفوتني أن أقدم شكري وتقديري إلى إخوتي وأخواتي زملاء الدراسة وبالأخص الزميلة زهراء قاسم لما قدمته من دعم ومشورة طيلة مدة الدراسة والبحث.

وأخيرا أقدم الشكر الجزيل إلى كل من مدّ لي يد العون، فجزاهم الله عني أوفر الجزاء.

آلاء

الخلاصة

أُجريت الدراسة الحالية للمدة من 2022/11/25 ولغاية 2023/4/16 على عينة مكونة من 60 سمكة كارب شائع بأعمار متقاربة متوسط أوزانها (35 غرام/ سمكة)، قُسمت إلى 6 مجموعات تتكون كل مجموعة من 10 سمكات، المجموعة الأولى (السيطرة) لم تُعامل بأي مادة من مواد الاختبار أما المجموع الخمس الأخرى، فقد جُرعت كلّ منها بوحدة من مواد الاختبار التالية: النفط الخام و B(a)P 1µg/kg و B(a)P 10µg/kg و B(ghi)P 1µg/kg و B(ghi)P 10µg/kg على التوالي، وكانت جرعة النفط الخام 25µl لكل سمكة أما جرعة بقية المجموع، فكانت 5µl لكل غرام من وزن الجسم بمعدل ثلاث جرعات لكل سمكة يفصل بين الجرعة والأخرى 48 ساعة. أخذت عينات الدم وأنسجة العضلات والأحشاء في اليوم العاشر من بداية التجريع، قُدرت تراكيز المركبات الهيدروكربونية الأروماتية متعددة الحلقات Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) في أنسجة العضلات والأحشاء والماء المستخدم في تربية الأسماك، أما عينات الدم فتم استخلاص الـ DNA منها، ثم أُجري تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase chain reaction لجيني *Ahr2* و *CYP1A*، وأُرسلت العينات إلى شركة Macrogen الكورية لغرض تحليل تسلسل الـ DNA، أُستخدمت بعض برامج المعلوماتية الحيوية لغرض اصطفاف Alignment التسلسلات لعيناتنا وتحليلها مع التسلسلات التتابعية القياسية المنشورة في المركز الوطني لمعلومات التقنيات الأحيائية (NCBI) National Center for Biotechnology Information باستخدام برنامج (BioEdit) وكشف التشكل الوراثي وتنوع النيوكليوتيدات باستخدام برنامج (DnaSP 5.10)، كما تم التعرف على التغيرات في الأحماض الأمينية باستخدام برنامج (MEGA X)، ورُسمت شبكة الأنماط الفردية الكلية (Haplotype (H) باستخدام برنامج (Network 5.0.0.0)، ورُسم البروتين ثلاثي الأبعاد (3D) Three dimensional باستخدام برنامج (PHYRE2 V.2.0) وتلخصت النتائج بما يأتي:

أولاً: أظهرت نتائج الدراسة الحالية قابلية أسماك الكارب الشائع على تراكم مركبات PAHs في أنسجتها المختلفة عند تعرضها إلى النفط الخام، وسجلت الأحشاء الداخلية تراكيز أعلى من مركبات PAHs الكلية مقارنة بالعضلات، كما تبين أنّ تراكيز مركبات PAHs ذات الوزن الجزيئي العالي أعلى من تراكيز مركبات PAHs ذات الوزن الجزيئي الواطئ في أنسجة الأسماك المعرضة للنفط الخام.

ثانياً: كانت نتائج تحليل الألكسون العاشر من جين *Ahr2* لمجاميع الاختبار كالاتي:

1. مجموعة السيطرة: لم تُظهر أي تغيير في تسلسل القواعد النيتروجينية.
 2. مجموعة النفط الخام: حدوث 10 طفرات، 8 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما الاثنتين الأخرتين، فكانتا صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 4 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.818 و 0.00731 على التوالي.
 3. مجموعة B(a)P 1µg/kg: حدوث 11 طفرة، 8 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما الثلاث الأخرى، فكانت صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 4 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.8181 و 0.00877 على التوالي.
 4. مجموعة B(a)P 10µg/kg: حدوث 13 طفرة، 12 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما واحدة، فكانت صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 4 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.819 و 0.00974 على التوالي.
 5. مجموعة B(ghi)P 1µg/kg: حدوث 4 طفرات، 3 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما واحدة، فكانت صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 4 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.818 و 0.00317 على التوالي.
 6. مجموعة B(ghi)P 10µg/kg: حدوث 4 طفرات، 3 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما واحدة، فكانت صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 4 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.818 و 0.00317 على التوالي.
- ثالثاً: كانت نتائج تحليل الألكسون الثاني من جين *CYP1A* لمجاميع الاختبار كالاتي:
1. مجموعة السيطرة والنفط الخام: لم يظهر أي تغيير في تسلسل القواعد النيتروجينية.
 2. مجموعة B(a)P 1µg/kg: حدوث 8 طفرات، 4 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما الأربع الأخرى، فكانت صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 5 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.933 و 0.00848 على التوالي.
 3. مجموعة B(a)P 10µg/kg: حدوث 21 طفرة، 13 منها مؤثرة، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما الثمان الأخرى، فكانت صامتة، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 7 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.900 و 0.01435 على التوالي.

4. مجموعة B(ghi)P 1µg/kg: حدوث 10 طفرات، 3 منها مؤثرة ، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما السبع الأخرى، فكانت صامتة ، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 6 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.893 و 0.00985 على التوالي.
5. مجموعة B(ghi)P 10µg/kg: حدوث 13 طفرة، 5 منها مؤثرة ، وأدت إلى تغيير الأحماض الأمينية، أما الثمان الأخرى، فكانت صامتة ، وبلغ عدد الأنماط الفردية (H) 6 أنماط، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وتنوع النيوكليوتيدات (π) 0.882 و 0.00974 على التوالي.
- رابعاً: تغير شكل البروتين ثلاثي الأبعاد (3D) للمجاميع أعلاه ولكلا الجينين، باستثناء مجموعتي السيطرة، ومجموعة النفط الخام في جين *CYP1A*.
- خامساً: مركب B(a)P أعلى قدرة تطفيرية من مركب B(ghi)P في جيني *AhR2* و *CYP1A*.
- سادساً: جين *CYP1A* أكثر تأثراً بمركبي B(a)P و B(ghi)P من جين *AhR2*.
- سابعاً: تم تسجيل بعض تتابعات النيوكليوتيدات في الدراسة الحالية لجيني *AhR2* و *CYP1A* في بنوك الجينات العالمية NCBI و DDBJ و EMBL وكالاتي:
- AhR2*: LC768696, LC768697, LC768698, LC768699, LC768700
- CYP1A*: LC768701, LC768702, LC768703, LC768704, LC768705

قائمة المحتويات

الصفحة	العنوان
III-I	الخلاصة
VIII-IV	قائمة المحتويات
IX-VIII	قائمة الجداول
XI-X	قائمة الأشكال
XII	قائمة المخططات
XII	قائمة الصور
XIII-XII	قائمة الملاحق
XV-XIII	قائمة المختصرات
3 – 1	الفصل الأول: المقدمة
1	المقدمة
3	الهدف من الدراسة
31 – 4	الفصل الثاني: استعراض المراجع
4	التلوث النفطي
5	تركيب النفط الخام
6	المركبات المشبعة
6	الراتنجات
6	الأسفلتين
6	الهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات (PAHS)
9	Benzo (a) pyrene B(a)P

10	Benzo (ghi) perylene B(ghi)P	2.4.2.2
11	مصادر التلوث النفطي في البيئة المائية	3.2
12	آليات التأثير السام والأثار الناجمة عنها في الأسماك	4.2
16	التمثيل الغذائي للهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات	5.2
17	التراكم الحيوي للهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات في الأسماك	6.2
18	تأثير الهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات على صحة الإنسان	7.2
19	آلية حدوث السرطان من قبل مركبات PAHS	8.2
21	أهمية الثروة السمكية	9.2
22	الكارب الشائع Common carp	10.2
23	الكروموسوم والجينوم في الكارب الشائع	1.10.2
23	التباين الوراثي Genetic variation	11.2
24	الطفرات الوراثية Genetic mutation	12.2
25	تعدد أشكال النوكليوتيدات المفردة (SNPs)	1.12.2
26	جين مستقبل الهيدروكربون أريل 2	13.2
28	ميكانيكية عمل AhR2	1.13.2
29	جين الساييتوكروم (CYP1A)	14.2
30	ميكانيكية عمل CYP1A	1.14.2
47-32	الفصل الثالث: المواد وطرق العمل	
32	جمع العينات ومعالجتها	1.3
32	أحواض التجربة	2.3
33	تصميم التجربة	3.3

34	أقلمة الأسماك ومعالجتها	4.3
35	جمع عينات الدم والأعضاء	5.3
36	الأجهزة والأدوات والمواد المستعملة في الدراسة	6.3
39	تحضير مركبات المعالجة	7.3
39	قياس الأوكسجين المذاب	8.3
40	استخلاص الهيدروكربونات النفطية من المياه	9.3
41	استخلاص الهيدروكربونات النفطية من أنسجة الأسماك	10.3
42	استخلاص الحامض النووي DNA من دم الأسماك	11.3
43	الكشف عن وجود المادة الوراثية DNA	12.3
44	تحميل عينات الحامض النووي DNA	13.3
44	تجهيز البادئات	14.3
45	تفاعل أنزيم البلمرة المتسلسل (PCR)	15.3
46	التحري عن ناتج PCR	16.3
46	تحليل تسلسل القواعد النيتروجينية لـ DNA	17.3
46	التنوع الوراثي Genetic diversity	18.3
47	شبكة الأنماط الفردية Haplotypes network	19.3
47	رسم البروتين ثلاثي الأبعاد Three dimension protein	20.3
93 -48	الفصل الرابع: النتائج والمناقشة	
48	العوامل البيئية لمياه الاحواض	1.4
48	تراكيز مركبات PAHs في الماء وأنسجة الأسماك لمجموعي النفط الخام والسيطرة	2.4
51	استخلاص وتضخيم الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA	3.4
52	تسجيل تتابعات الجينات المدروسة (CYP1A و Ahr2) في بنوك الجينات العالمية NCBI و DDBJ و EMBL	4.4

52	التنوع الوراثي Genetic diversity	5.4
52	التنوع الوراثي لجين <i>AhR2</i>	1.5.4
54	التنوع الوراثي لجين <i>CYP1A</i>	2.5.4
55	تعدد اشكال النيوكلو تيدات المفردة	6.4
55	جين <i>AhR2</i>	1.6.4
55	مجموعة النفط الخام	1.1.6.4
59	مجموعة B(a)P 1µg/kg	2.1.6.4
62	مجموعة B(a)P 10µg/kg	3.1.6.4
64	مجموعة B(ghi)P 1µg/kg	4.1.6.4
67	مجموعة B(ghi)P 10µg/kg	5.1.6.4
69	جين <i>CYP1A</i>	2.6.4
69	مجموعة النفط الخام	1.2.6.4
69	مجموعة B(a)P 1µg/kg	2.2.6.4
72	مجموعة B(a)P 10µg/kg	3.2.6.4
75	مجموعة B(ghi)P 1µg/kg	4.2.6.4
78	مجموعة B(ghi)P 10µg/kg	5.2.6.4
81	تركيب البروتين ثلاثي الابعاد 3-D protein structure	7.4
81	تركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لجين <i>AhR2</i>	1.7.4
84	تركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لجين <i>CYP1A</i>	2.7.4
86	شبكة الأنماط الفردية Haplotypes network	8.4
86	جين <i>AhR2</i>	1.8.4
86	مجموعة النفط الخام	1.1.8.4
86	مجموعة B(a)P 1µg/kg	2.1.8.4

87	B(a)P 10µg/kg مجموعة	3.1.8.4
88	B(ghi)P 1µg/kg مجموعة	4.1.8.4
89	B(ghi)P 10µg/kg مجموعة	5.1.8.4
89	جين <i>CYP1A</i>	2.8.4
89	B(a)P 1µg/kg مجموعة	1.2.8.4
90	B(a)P 10µg/kg مجموعة	2.2.8.4
91	B(ghi)P 1µg/kg مجموعة	3.2.8.4
92	B(ghi)P 10µg/kg مجموعة	4.2.8.4
95 - 94	الفصل الخامس: الاستنتاجات والتوصيات	
94	الاستنتاجات	1.5
95	التوصيات	2.5
138-96	الفصل السادس: المصادر	
144-139	الملاحق	
A - D	Summary	

قائمة الجداول

الصفحة	العنوان	الرقم
36	الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة	1-3
37	المواد المستخدمة في الدراسة	2-3
44	البادئات المستخدمة لجيني <i>AhR2</i> و <i>CYP1A</i>	3-3
45	المواد المستخدمة في تقنية الـ PCR وكمياتها	4-3

45	البرنامج الخاص ببيادئات تقنية PCR-DNA لجيني <i>CYP1A</i> و <i>AhR2</i>	5-3
49	تراكيز مركبات PAHs في الماء (ng/l) وفي أنسجة العضلات والأحشاء (ng/g وزن جاف) لأسماك مجموعتي السيطرة والنفط الخام	1-4
52	أرقام انضمام تتابعات الجينات <i>AhR2</i> و <i>CYP1A</i> في بنوك الجينات العالمية EMBL و NCBI و DDBJ	2-4
53	التنوع الوراثي لجين <i>AhR2</i> بين مجاميع الأسماك المعاملة بالنفط الخام وبمركبي B(a)P و B(ghi)P بتركيزي 1µg و 10µg لكل مركب	3-4
54	التنوع الوراثي لجين <i>CYP1A</i> بين مجاميع الأسماك المعاملة بمركبي B(a)P و B(ghi)P بتركيزي 1µg و 10µg لكل مركب	4-4
56	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>AhR2</i> لمجموعة النفط الخام	5-4
60	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>AhR2</i> لمجموعة B(a)P 1µg/kg	6-4
63	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>AhR2</i> لمجموعة B(a)P 10µg/kg	7-4
65	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>AhR2</i> لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg	8-4
67	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>AhR2</i> لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg	9-4
70	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(a)P 1µg/kg	10-4
73	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(a)P 10µg/kg	11-4
76	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg	12-4
79	تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg	13-4

قائمة الأشكال

الرقم	العنوان	الصفحة
1-2	التركيب الكيميائي لـ 16 مركبات من PAHs	7
2-2	المسارات الرئيسية لانتقال PAHs في البيئة	8
3-2	تركيب منطقتي bay و K في الـ B(a)P و B(ghi)P	11
4-2	آليات B(a)P في السمية	14
5-2	مناطق bay و fjord في PAHs	20
6-2	مسارات التنشيط الأيضية المقترحة والأحداث الرئيسية في طريقة العمل المسرطنة لـ B(a)P	20
7-2	الآثار المترتبة عن تعرض الحامض النووي لمخاليط مركبات PAHs	21
8-2	تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة لأليلين	26
9-2	تركيب جين <i>Ahr2</i> في الكارب الشائع	27
10-2	مسار إشارات AHR	28
11-2	تركيب جين <i>CYP1A</i> في الكارب الشائع	29
12-2	يوضح ميكانيكية عمل <i>CYP1A</i> في التمثيل الغذائي لـ B(a)P	31
1-4	مقارنة تتابعات جين <i>Ahr2</i> لمجموعة النفط الخام مع رقم الانضمام XM_042749540.1	57
2-4	مقارنة تتابعات جين <i>Ahr2</i> لمجموعة B(a)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1	61
3-4	مقارنة تتابعات جين <i>Ahr2</i> لمجموعة B(a)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1	64
4-4	مقارنة تتابعات جين <i>Ahr2</i> لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1	66
5-4	مقارنة تتابعات جين <i>Ahr2</i> لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1	68
6-4	مقارنة تتابعات جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(a)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2	71

74	مقارنة تتابعات جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(a)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2	7-4
77	مقارنة تتابعات جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2	8-4
80	مقارنة تتابعات جين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2	9-4
82	مقارنة تتابع الأحماض الأمينية في جين <i>AhR2</i> لمجاميع (Crude oil ، kg/ B(ghi)P /kg ، B(ghi)P 1µg/kg ، B(a)P 10µg/kg ، B(a)P 1µg (10µg مع رقم الانضمام XM_042749540.1	10-4
83	الأشكال ثلاثية الأبعاد لبروتين <i>AhR2</i> (A) في رقم الانضمام XM_042749540.1 ، (B) في النفط الخام، (C) في B(a)P 1µg/kg ، (D) في B(a)P 1µg/kg ، (E) في B(ghi)P 1µg/kg ، (F) في B(ghi)P 10µg/kg	11-4
84	مقارنة تتابع الأحماض الأمينية لمجاميع جين <i>CYP1A</i> B(a)P 1µg/ kg (B(ghi)P 10µg/ kg ، B(ghi)P 1µg/ kg ، B(a)P 10µg/ kg ، مع رقم الانضمام XM_019064218.2	12-4
85	الأشكال ثلاثية الأبعاد لبروتين <i>CYP1A</i> (A) في رقم الانضمام XM_019064218.2 ، (B) في B(a)P 1µg/kg ، (C) في B(a)P /kg ، (D) في B(ghi)P 1µg/kg ، (E) في B(ghi)P 10µg/kg	13-4
86	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>AhR2</i> لمجموعة النفط الخام	14-4
87	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>AhR2</i> لمجموعة B(a)P 1µg/kg	15-4
88	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>AhR2</i> لمجموعة B(a)P 10µg/kg	16-4
88	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>AhR2</i> في مجموعة B(ghi)P 1µg/kg	17-4
89	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>AhR2</i> في مجموعة B(ghi)P 10µg/kg	18-4
90	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>CYP1A</i> لمجموعة B(a)P 1µg/kg	19-4
91	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>CYP1A</i> في مجموعة B(a)P 10µg/kg	20-4
92	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>CYP1A</i> في مجموعة B(ghi)P 1µg/kg	21-4
93	شبكة الأنماط الفردية لجين <i>CYP1A</i> في مجموعة B(ghi)P 10µg/kg	22-4

قائمة المخططات

الرقم	العنوان	الصفحة
1-2	أسباب الطفرات	25
1-3	أهم الخطوات المتبعة في هذه الدراسة	33

قائمة الصور

الرقم	العنوان	الصفحة
1-3	أحواض التجربة	32
2-3	أسماك التجربة	34
3-3	التجريب الفموي للأسماك	35
4-3	سحب عينات الدم	35
1-4	الترحيل الكهربائي لنتائج PCR لجين <i>Ahr2</i> بحجم (665 زوج قاعدي) باستخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5%	51
2-4	الترحيل الكهربائي لنتائج PCR لجين <i>CYP1A</i> بحجم (503 زوج قاعدي) باستخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5%	51

قائمة الملاحق

الرقم	العنوان	الصفحة
1	كروماتوغرامات مركبات PAHs في أحشاء أسماك الكارب الشائع لمجموعة السيطرة	139
2	كروماتوغرامات مركبات PAHs في أحشاء أسماك الكارب الشائع لمجموعة النفط الخام	139
3	كروماتوغرامات مركبات PAHs في عضلات أسماك الكارب الشائع لمجموعة السيطرة	140

140	كروماتوغرامات مركبات PAHs في عضلات أسماك الكارب الشائع لمجموعة النفط الخام	4
141	تسلسل جين <i>AhR2</i>	5
142	تسلسل جين <i>CYP1A</i>	6
143	تسجيل جين <i>AhR2</i> على مواقع الـ EMBL و NCBI و DDBJ	7
144	تسجيل جين <i>CYP1A</i> على مواقع الـ EMBL و NCBI و DDBJ	8

قائمة المختصرات

المختصر	المصطلح
AhR	Aryl hydrocarbon receptor
AhRR	aryl hydrocarbon receptor repressor
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
B(a)P	Benzo (a) pyrene
B(ghi)P	benzo (ghi) perylene
bHLH	basic helix-loop-helix
Bp	base pair
BPDE	B(a)P- 7,8-dihydrodiol-9,10 epoxide
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
d.w	dry.weight
DMSO	dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DnaSP	DNA Sequence Polymorphism
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid

EMBL	European Molecular Biology Laboratory
HMW	high molecular weight
HPLC	high performance liquid chromatography
HSP90	Heat shock proteins 90
I	Isoleucine
IARC	International Agency for Research on Cancer
LMW	low molecular weight
M	Methionine
MEGA	Molecular Evolutionary Genetics Analysis
ml	Milliliter
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
Ng	Nanogram
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND	Not detected
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PAS	Per-Arnt-Sim
PCR	Polymerase chain reaction
Phyre2	Protein Homology analogy Recognition engine V.2.0
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SNP	Single nucleotide polymorphism
USEPA	US Environmental Protection Agency
3D	Three Dimension

µg	Microgram
المختصر	الحامض الأميني
A	Alanine
C	Cysteine
D	Aspartic acid
E	Glutamic Acid
F	Phenylalanine
G	Glycine
H	Histidine
K	Lysine
L	Leucine
N	Asparagine
P	Proline
Q	Glutamine
R	Arginine
S	Serine
T	Threonine
V	Valine
W	Tryptophan
Y	Tyrosine

الفصل الأول

المقدمة

Introduction

1.1: المقدمة Introduction

يُساهم التلوث بشكل عام بالإضرار بالنظم البيئية في جميع أنحاء العالم (Santi *et al.*, 2021)، ففي الوقت الحاضر أصبحت البيئة المائية أكثر عرضة للعديد من الملوثات، فيمكن عدّها خزائنًا حقيقيًا لمعظم الملوثات البيئية التي قد تتراكم في أجسام الكائنات المائية (Akhbarizadeh *et al.*, 2022; Ju *et al.*, 2019; *al.*، 2019)، إذ أثار التلوث للنظم البيئية المائية مخاوفًا بيئيةً وصحيةً كبيرةً، فهو لا يُؤثر على بقاء الكائنات المائية وتكاثرها فقط بل يُؤثر على صحة الإنسان من خلال التركيز الأحيائي (Dighiesh *et al.*, 2019).

النفط الخام عبارة عن مزيج من آلاف الهيدروكربونات والمركبات الأخرى ذات الصلة (French-McCay *et al.*, 2023). يُمكن أن تكون بعض أشكال التلوث النفطي أما من النشاطات البشرية أو مشتقة من مصادر طبيعية (Santi *et al.*, 2021).

الهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات (PAHs) أكثر مكونات النفط الخام سُمية، فهي تُستخدم غالبًا كمؤشر على السُمية وتنتشر في الهواء والماء والتربة (Imam *et al.*, 2022)، وتتكون من حلقتين أو أكثر من حلقات البنزين المكونة من اتحاد الكربون والهيدروجين، وهي مركبات بيضاء أو صفراء فاتحة أو صلبة عديمة اللون (Mallah *et al.*, 2022)، ذات سُمية عالية وآثار سلبية واسعة على صحة الإنسان والكائنات الحية، فضلًا عن استقرارها الكيميائي العالي في البيئة وطبيعتها غير القابلة للتحلل (Jesus *et al.*, 2022)، وهي من المواد الكيميائية المحبة للدهون، وتتطلق من الأنشطة البشرية عن طريق الاحتراق غير الكامل للوقود الأحفوري والفحم والنفط والغاز والخشب والنفايات الصلبة والنواتج البترولية (Kakavandi *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2020)، توجد على شكل مركبات معقدة ولكل مكون درجة مختلفة من السُمية، والبعض منها هي مواد مُسرطنة ومُطفرة (Liu *et al.*, 2022)، من بين أهم مركباتها تم تحديد Benzo (a) pyrene كعامل مُسبب للسرطان من الدرجة الأولى، و Benzo (ghi) perylene كمادة مُسرطنة محتملة من قبل الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) (IARC, 2021; Kim *et al.*, 2022b)، تضم البيئة المائية أعدادًا كبيرةً من مختلف أنواع الكائنات الحية، إذ تُعد الثروة السمكية من أهم الثروات التي لها القدرة على التجدد إذا ما توفرت الظروف الملائمة لها، كما أنّها تُعد من أهم المصادر الغذائية الأساسية في حياة الإنسان؛ لكونها تشكل مصدرًا أساسيًا للبروتينات والدهون (Nur *et al.*, 2020)، وإنّ الأسماك المعرضة لهذه الملوثات تُعاني

طفرات وراثية و تغيرات مظهرية مما يُؤثر كثيرًا على نموها وتطورها (Yamaguchi *et al.*, 2020)، وكذلك تُشكل خطرًا كبيرًا على صحة الإنسان، فهي مسؤولة عن سرطان الجلد والرئة والبنكرياس والمريء والقولون والمثانة والثدي؛ بسبب التعرض الطويل الأمد لها، وأمراض القلب والأوعية الدموية، بما في ذلك تصلب الشرايين وارتفاع ضغط الدم والتخثر واحتشاء عضلة القلب (Mallah *et al.*, 2022). إذ تُؤدي المُطفرات البيئية إلى حدوث تغيرات وراثية (طفرات)، وبالتالي فإنَّ حدوث الطفرات على مستوى الخلايا الجسمية يُؤدي إلى خطر الإصابة بأمراض السرطان (LeBlanc *et al.*, 2022). إنَّ تعرض الكائنات الحية إلى المؤثرات البيئية (PAHs) في وقت مبكر من العمر يُؤدي إلى تغيرات وأضرار على مستوى المادة الوراثية أو تحورات لا جينية (epigenetic modifications)، مثل مثيلة الدنا (DNA methylation) وتحورات بروتينات الهستونات وتنظيم الحامض النووي الريبوزي الدقيق (miRNA) (Das and Ravi, 2022).

من بين أهم الجينات التي يُمكن استخدامها كمؤشرات حيوية في الأسماك وكعلامات إنذار مبكر لتدهور البيئات المائية والتلوث بالمركبات الأروماتية هما جيني *AhR2* و *CYP1A*، إذ ينتمي جين *AhR2* إلى عائلة عوامل النسخ اللولبية الحلزونية الأساسية (BHLH-PAS) Basic helix-loop-helix Per-Arnt-Sim ويُعد منظماً ثابتاً لعدد كبير من العمليات الخلوية والجزيئية، إذ إنَّ له دور أولي في إزالة السُموم من المركبات الغريبة، كما يقوم بالعديد من الوظائف منها تنظيم النسخ وتعديلات بنية الكروماتين والمشاركة في مسارات إشارات محورية مختلفة، وأنَّ مجالات التأثير هذه تنتهي بالتأثير على توازن الأنسجة والأعضاء، بما في ذلك الاستجابة التجديدية لكل من المنبهات الداخلية والخارجية (Rejano-Gordillo *et al.*, 2022)، أما جين *CYP1A* فينتمي إلى العائلة الإنزيمية Cytochromes P450 (CYP450) التي تعمل على إزالة السُموم من الكائنات الحية، إنَّ تحفيز *CYP1A* الكبدي في الأسماك بأنواع معينة من الملوثات يعمل كنظام إنذار مبكر والاستجابة البيولوجية الأكثر حساسية لتحديد مستويات التلوث البيئي (Andleeb *et al.*, 2022).

2.1: الهدف من الدراسة

نظرًا لانعدام الدراسات والبحوث المتخصصة بدراسة التغيرات الوراثية في جيني *AhR2* و *CYP1A* الناتجة عن تعرض أسماك الكارب الشائع للنفط الخام وبعض المركبات الأروماتية متعددة الحلقات، أُجريت هذه الدراسة والتي تهدف إلى ما يأتي:

1. تقدير تراكيز المركبات الأروماتية في المياه المستخدمة لتربية الأسماك و بعض أنسجة الأسماك المدروسة (مجموعة الأسماك المعاملة بالنفط الخام ومجموعة أسماك السيطرة).

2. الكشف عن القابلية التطفيرية للنفط الخام و المركبين *B(a)P* و *B(ghi)P*.

3. دراسة التباين الوراثي في جيني *AhR2* و *CYP1A* الناتج عن معاملة أسماك التجربة بالنفط

الخام ومركبي *B(a)P* و *B(ghi)P* بتركيزي (1,10 $\mu\text{g/kg}$) من وزن الجسم و حساب عدد

الأنماط الفردية ورسم البروتين ثلاثي الأبعاد للجينات المختارة باستخدام برامج المعلوماتية الحيوية.

الفصل الثاني

استعراض المراجع

Literatures Review

1.2: التلوث النفطي Oil pollution

شهد العقد الماضي قفزه في التوسع الاقتصادي في جميع أنحاء العالم مما أدى إلى زيادة في الطلب العالمي على النفط الخام من 86.4 مليون برميل يوميًا في عام 2010 إلى 96.5 مليون برميل يوميًا في عام 2021 (Imam *et al.*, 2022). الطلب المتزايد على البترول أدى إلى تصعيد الأنشطة البشرية لاستكشاف واستغلال المصادر البترولية غير المتجددة التي قادت إلى التلوث البيئي، بما في ذلك الانسكابات النفطية أثناء التنقيب والنقل وتكرير النفط الخام (Imam *et al.*, 2019; Johnston *et al.*, 2019).

مُصطلح البترول مشتق من الكلمتين (petra) حجر و (oleum) زيت، وهو يحدث بشكل طبيعي ويتم معالجته بشكل عام إلى ناتجات مختلفة بواسطة المصفاة (Adedeji *et al.*, 2022). يُعد التلوث البيئي بالهيدروكربونات البترولية مضرًا بالبشر، وكذلك بالمكونات الحيوية الأخرى، ترتبط وجود الملوثات في البيئة بانخفاض أعداد الأنواع، وانقراض عدد منها، وحدثت أضرار صحية في الكائنات الحية المعرضة للتلوث، وحدثت خلل في المجتمعات البيئية (Santi *et al.*, 2021). الماء هو أحد أهم وأثمن الموارد على هذا وقد لوحظ أن مصافي البترول هي أكثر الصناعات تلويثًا له؛ لأنها تبعث مجموعة متنوعة من الملوثات الضارة والمستمرة وتُعد PAHs واحدة من أهم هذه الملوثات، ويتأثر الإنسان والحيوان والنباتات المائية سلبًا بهذه الملوثات إذا تم تصريفها من دون معالجة أو معالجة غير كافية (Jafarinejad and Jiang, 2019). مصادر المياه السطحية الرئيسية في العراق هي نهري دجلة والفرات، هذان المسطحان المائيان هما الأكثر تضررًا من التلوث النفطي، فقد كشفت دراسة حديثة قامت بها (Grmasha *et al.*, 2023) في دراسة مناطق متعددة من نهر دجلة ومنها في محافظة ميسان لدراسة تراكيز 16 هيدروكربونًا متعدد الحلقات في المياه السطحية والرواسب عن وجود تراكيز مرتفعة من هذه المركبات، وكانت القيمة المحسوبة للإصابة بالسرطان عالية المخاطر مع الآثار الصحية الضارة.

أشار (AL-Saadi *et al.*, 2022) إلى الإدارة السيئة لنفايات النفط في العراق والتي تسبب تلوثًا

بيئيًا واسعًا.

2.2: تركيب النفط الخام Composition of crude oil

النفط الخام خليط مُعقد من المكونات الهيدروكربونية وغير الهيدروكربونية بأرقام كربون تتراوح من واحد إلى أكثر من 100 ذرة ودرجات غليان من 161.60 درجة مئوية إلى أكثر من 760 درجة مئوية. لا يزال التركيب الجزيئي المفصل للنفط الخام يُمثل تحديًا للكيميائيين التحليليين؛ بسبب طبيعته المعقدة والتي تضم عددًا من المركبات الكيميائية أكبر من عدد الجينات في الجينوم البشري (Shishkova et al., 2022)، وهو ليس مادة خام متجانسة، فكل نفط خام يُنتج في العالم يكون له تركيبة كيميائية فريدة تختلف باختلاف طريقة تكوينه، عادة يوجد أكثر من 150 نوعًا منه في جميع أنحاء العالم، وعليه لا يُوجد نفطًا خامًا متماثلان ولهذا السبب توصيف البترول لا يزال يُمثل تحديًا لكل منتجي النفط الخام ومصافي البترول (Silverio and Szklo, 2012). يتكون النفط الخام من الهيدروجين والكاربون والكبريت و النيتروجين والأوكسجين وبعض العناصر، مثل النيكل والكوبلت بنسب قليلة جدًا (Ramirez-Corredores, 2017). المعلومات التركيبية التفصيلية على المستوى الجزيئي للبترول يُمكن الحصول عليها من خلال التقنيات المتطورة، مثل قياس الطيف الكتلي واللوني الشامل للغاز والمنصات التحليلية الهجينة (Huynh et al., 2021; Saitova et al., 2021). يُصنف النفط إلى خمس مجموعات أساسية هي: الزيوت الخفيفة غير الثابتة، والزيوت الخفيفة الثابتة، والزيوت المتوسطة، والزيوت الثقيلة، والزيوت الثقيلة جدًا (Ferguson et al., 2020). قد يكون للمجموعات المختلفة من النفط المنسكب مسارات و مصائر مختلفة؛ نظرًا لخصائصها المتنوعة (Wang et al., 2021a).

بناءً على قابلية الاستقطاب وقطبية النفط المنسكب يتم تصنيفه إلى أربعة أجزاء: الهيدروكربونات المشبعة، والعطريات، والراتنجات، والاسفلتين، وتتكون معظم الزيوت الخام وبالأخص الزيوت الخفيفة من نسبة كبيرة من الهيدروكربونات المشبعة والعطرية تصل إلى أكثر من (80%) من الوزن، أما الزيوت الثقيلة تحتوي على نسبة أعلى من الراتنج والاسفلتين مقارنة بالزيوت الأخف، كما إنَّ هذه الأجزاء الرئيسية يُمكن أن تُقسم إلى عدة مركبات وأقسام فرعية بناءً على تكوين النفط الخام (Chen et al., 2022). النفط الخام عادة ما يحتوي على نسبة مئوية من الغازات والسوائل والمواد الصلبة المذابة ويُمكن تقسيم السوائل إلى مواد مشبعة وعطريات وراتنجات وتوجد أيضًا أنواع مختلفة من المواد الصلبة في النفط الخام ومع ذلك، فأَنَّ الإسفلت الصلب هو الأبرز (Fakher et al., 2020).

1.2.2: المركبات المشبعة Saturated compounds

هي مركبات هيدروكربونية مشبعة لا تحتوي على روابط مزدوجة بين الكربون والكربون، ترتبط ذرات الكربون بالحد الأقصى المسموح به من الهيدروجين وتشمل الالكانات الخطية (المستقيمة والمتفرعة) والالكانات الحلقية، الالكانات الخطية (Paraffines) عبارة عن هيدروكربونات مشبعة بمعنى إنها تحتوي على روابط مفردة فقط في بنيتها وصيغتها العامة هي C_nH_{2n+2} ، ويُمكن أن تكون بنية الكربون فيها إما مستقيمة أو متفرعة ويصل عدد ذرات الكربون فيها إلى 40 ذرة لكل جزيء، الالكانات الحلقية (naphthenes) هي أيضًا هيدروكربونات مشبعة باستثناء الكربون يكون على شكل حلقة مغلقة مع الصيغة العامة C_nH_{2n} وفي خصائصها العامة تشبه نسبيًا الالكانات الخطية (Gudde, 2018).

2.2.2: الراتنجات Resins

الراتنجات هي أكثر تعقيدًا في التركيب مقارنة بالمواد المشبعة والعطرية، وتمتلك وزن جزيئي أعلى مقارنة بالمكونين السابقين، ولها دور مهم في تثبيت الأسفلتين في النفط الخام وهي أصغر المركبات القطبية في النفط الخام لكنها ليست هيدروكربونات؛ لأنَّ هياكلها لا تحتوي على الكربون والهيدروجين فقط ولكن أيضًا النيتروجين والأوكسجين والكبريت (Fakher et al., 2020; León et al., 2002).

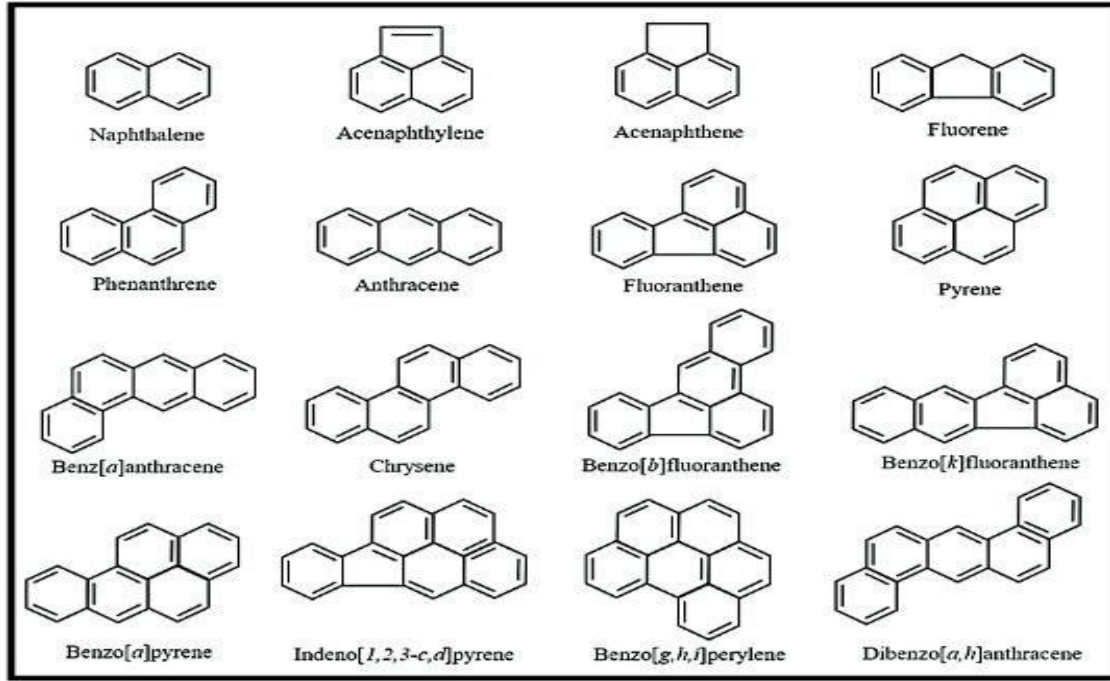
3.2.2: الأسفلتين Asphaltene

يُعد الأسفلتين من أكثر مكونات النفط الخام تعقيدًا؛ لأنَّ جميع المكونات الثلاثة تحتوي على هيكل عام يُمكن من خلاله تصنيفها بينما الأسفلتين يحتوي على العديد من الهياكل المختلفة (Fakher et al., 2020; Pande et al., 2018).

4.2.2: الهيدروكربونات الأروماتية المتعددة الحلقات**Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**

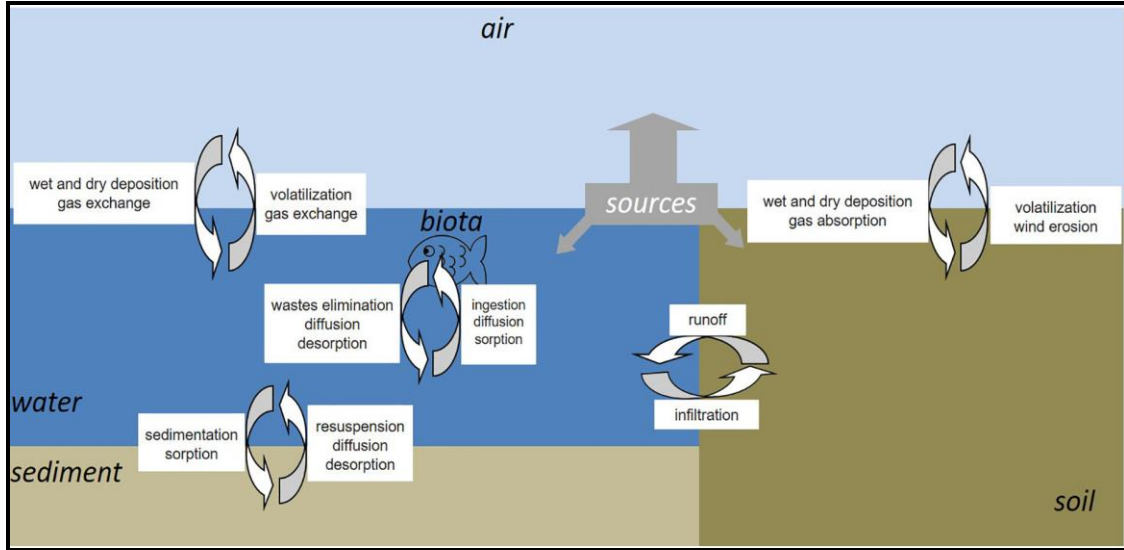
هي مركبات عضوية تتكون من اندماج اثنين أو أكثر من حلقات البنزين (Branco et al., 2021)، هي المكون الرئيسي الثاني في الهيدروكربونات النفطية وتُعد أكثر تعقيدًا في التركيب من الهيدروكربونات المشبعة وهي بشكل عام غير قطبية، وتُصنف على أنَّها ملوثات عضوية ثابتة ضارة على البيئة والكائنات الحية تتواجد في الأوساط البيئية كافة كالماء والهواء والترربة (Imam et al., 2022)، وتدخل إلى البيئة من عدة مصادر منها البراكين وحرائق الغابات وانبعاث الفحم واحتراق الوقود واحراق النفايات (Kariyawasam et al., 2021; Reizer et al., 2021)، وقد تم تقدير تراكيزها

في البيئة المائية في الماء والرواسب والثدييات والأسماك والقواقع والطيور وغيرها من الأحياء المائية (Chizhova *et al.*, 2013; Uno *et al.*, 2010)، وبسبب انخفاض قدرتها على الذوبان بالماء وكونها محبة للدهون وبسبب خواصها الثابتة فإنها تميل إلى التراكم في الأنسجة المختلفة للكائنات الحية وخاصة الأنسجة الدهنية (García and de Llasera, 2021; Krzyszczak and Czech, 2021; Recabarren-Villalón *et al.*, 2021)، وتعدّ واحدةً من أكثر المركبات خطورة على صحة الإنسان والكائنات الحية الأخرى، فقد حددت وكالة حماية البيئة الأمريكية (USEPA) Environmental Protection Agency 16 مركبًا من هذه المركبات موضحة في الشكل (1-2) (Abdel-Shafy and Mansour, 2016; Reizer *et al.*, 2021).



شكل (1-2) التركيب الكيميائي لـ 16 مركبًا من PAHs.

يتم نقل PAHs على نطاق واسع في الماء والرواسب و الهواء و الأحياء (Meudec *et al.*, 2007; Pii *et al.*, 2019)، كما موضح في الشكل (2-2)، إذ تدخل هذه المركبات أو مشتقاتها في التربة والمياه والهواء عن طريق التبخر والذوبان والتساقط والأكسدة الضوئية والتحلل البيولوجي وتؤثر على بقاء ونمو الحيوانات والنباتات (Lourenço *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022).



شكل (2-2) : المسارات الرئيسية لانتقال PAHs في البيئة (Jesus et al., 2022).

يؤدي الامتصاص والتراكم (التضخم الأحيائي) لـ PAHs في السلسلة الغذائية إلى العديد من المخاطر الصحية، فهي مركبات مسرطنة وسامة ومطفرة (Xie et al., 2021)، حيث يُزيد التعرض لها من مخاطر الإصابة بالسرطان والاضطرابات الوراثية واضطرابات الغدد الصماء (LeBlanc et al., 2022; Šimečková et al., 2022). هناك مخاوف كثيرة من الآثار الضارة التي تحدثها هذه المركبات على البيئة والكائنات الحية وخاصة الإنسان (Sun et al., 2021)، ويُعزى السبب في ذلك إلى الاستمرار بإطلاقها إلى البيئة؛ بسبب تواجدها في العديد من المصادر (Jesus et al., 2022; Lima et al., 2005)، ومقاومتها العالية للتحلل من قبل الأحياء المجهرية (Haritash and Kaushik, 2009) وتأثيراتها السُمّية، فهي مركبات لها القدرة على إحداث الطفرات الوراثية والأورام السرطانية (Baird et al., 2005; Sun et al., 2021).

أشار كل من (Krzyszczak and Czech (2021); Châtel et al. (2014) إلى أنّ مشتقات هذه المركبات أكثر سُمية من المركبات الأم.

كشفت دراسة أجراها (Nematollahi et al., 2022) في العراق عن نسبة عالية من تراكيز PAHs في المناطق المحيطة بمصافي النفط، بالإضافة إلى الدراسة المذكورة أعلاه خلص تقرير حديث لهيئة الإذاعة البريطانية بعنوان (السرطان منتشر) إلى وجود كميات كبيرة من هذه المركبات في عينات دم العراقيين الذين يعيشون بالقرب من مرافق صناعة النفط (Grmasha et al., 2023). تم تصنيف المركبات، على أساس الوزن الجزيئي إلى مجموعتين هما مركبات ذات وزن جزيء واطئ (PAHs-LMW) تحتوي على حلقتين أو

ثلاث من البنزين، وعالية الوزن الجزيئي (PAHs-HMW) PAHs-High molecular weight تتألف من أربع إلى ست حلقات بنزين، وتمتاز المركبات ذات الوزن الجزيئي العالي بأنها أكثر خطورة من ناحية السمية وإحداث الطفرات (Aiyesanmi *et al.*, 2021; Du and Jing, 2018; Liu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2021; *al.*, 2021)، وهناك نوع آخر من التصنيف اعتمادًا على طرق تكوينها منها petrogenic إذا كانت مشتقة من الوقود و biogenic إذا نتجت من قبل الكائنات الحية و pyrogenic إذا نشأت من الاحتراق غير الكامل للوقود و diagenetic إذا نشأت من عمليات التحول في الرواسب (Das and Ravi, 2022)، كما صُنفت من قبل الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) إلى أربع مجاميع:

- ❖ مجموعة 1 : مواد مسرطنة للإنسان.
- ❖ مجموعة 2A : من المحتمل أن تكون مسرطنة للإنسان.
- ❖ مجموعة 2B : على الأرجح أن تكون مسرطنة للإنسان.
- ❖ مجموعة 3: غير مصنفة على أنها مسرطنة للإنسان (IARC , 2010).

Benzo (a) pyrene B(a)P :1.4.2.2

عبارة عن هيدروكربون أروماتي متعدد الحلقات، يُنتج بشكل أساسي عن طريق الوقود الأحفوري والخشب والمواد العضوية الأخرى (Bukowska and Sicińska, 2021)، ذو وزن جزيئي عالي يبلغ 252.3 وبصيغة كيميائية $C_{20}H_{12}$ ، تحتوي على خمس حلقات بنزين متحدة و قابلية ذوبان منخفضة في الماء (0.0038mg/L) وضغط بخار منخفض (5.0×10^{-7} torr)، وإنَّ نصف عمر التحلل الضوئي في المياه السطحية 0.54 ساعة (Moffat *et al.*, 2015)، وبالتالي فإنَّ B(a)P ثابت في البيئة المائية، ويُمكن للكائنات الحية تناوله بسهولة؛ بسبب طبيعته المحبة للدهون، والتي تُحدث في النهاية آثارًا ضارةً على الكائنات الحية عبر السلاسل الغذائية (Haritash and Kaushik, 2009; Mo *et al.*, 2022).

تم تضمين هذا المركب في قائمة المواد المسرطنة رقم واحد للإنسان من قبل الوكالة الدولية لأبحاث السرطان نظرًا لخصائصه المُطفرة والمُسببة للسرطان (Kim *et al.*, 2022b). من بين مركبات PAHs يتم استخدامه بشكل شائع كنموذج لدراسة التمثيل الغذائي والسمية البيئية، يمتاز هذا المركب بأنه مُسبب للطفرات وسام ومُسرطن وماسخ ومُسبب لاضطرابات الغدد الصماء والجهاز المناعي والقلب والعظام في الفقريات، مثل الأسماك والثدييات (Moffat *et al.*, 2015)، بصرف

النظر عن التعديلات الجينية، فإنَّ B(a)P ومستقلبه B(a)P- 7,8-dihydrodiol- (BPDE) epoxide 9,10 يمارسان تأثيرات لا جينية بما في ذلك عدم تنظيم تعبير miRNA وتغير مثيلة DNA وتعديل ذيول الهستون (Fang et al., 2015; Fu et al., 2017; Zhang et al., 2014). تم العثور على B(a)P في الهواء والماء والتربة، ولقد ثبت أنَّ الغذاء و مياه الشرب والهواء هي المصادر الرئيسية لتعرض الإنسان له (Agrawal et al., 2018).

تتأثر الأسماك نتيجة التعرض المباشر لهذا المركب ومشتقاته، وإنَّ هذه التأثيرات تظهر في الأجيال الأخرى التي لم تتعرض أبدًا لـ B(a)P ؛ بسبب تعرض الخلايا الجنسية في الغدد التناسلية للأباء (Mo et al., 2022).

بيّن Soltani et al. (2019) أنَّ B(a)P يُمكن أن يؤدي إلى كسر الحامض النووي في عضو الكبد في سمكة *Liza klunzingeri*، كما بيّن Ardeshir et al. (2019) أنَّ الإجهاد التأكسدي الناجم عنه، سبب تلف الحامض النووي في أنسجة الكبد للأسماك البيضاء في بحر قزوين. أظهرت دراسة أخرى أنَّ B(a)P تسبب في كسر خيوط الحامض النووي في كبد وكريات الدم الحمر لسمكة *Prochilodus lineatus* (Santos et al., 2018).

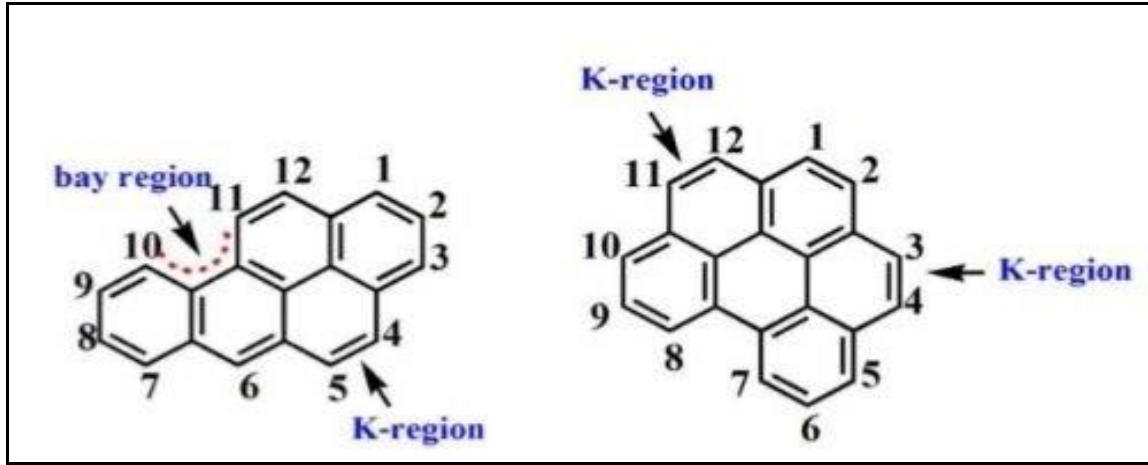
2.4.2.2 Benzo (ghi) perylene B(ghi)P

عبارة عن هيدروكربون أروماتي متعدد الحلقات مكون من ست حلقات بنزين بوزن جزيئي يبلغ 276.3 (Mandal et al., 2018)، وبصيغة كيميائية $C_{22}H_{12}$ وبكثافة 1.378 g/cm^3 ، ودرجة ذوبان 278°C ودرجة غليان 500°C ، ويمتاز بأنَّه كاره للماء وأكثر مقاومة للتحلل البيولوجي (Gherardi et al., 2021).

أظهرت الدراسات الأولية للوكالة الدولية لبحوث السرطان أنَّه غير مُسبب للسرطان ومع ذلك فإنَّ سُمية هذا المركب كانت مثيرة للجدل، فقد أظهرت العديد من الدراسات أنَّه لا يُشكل معقدات مع الـ DNA فقط لكنَّه يتآزر مع B(a)P لزيادة التأثيرات المُسببة للسرطان (Li et al., 2019). يتم إنتاجه غالبًا عن طريق الاحتراق غير الكامل للمواد العضوية ويُعد علامة على ارتفاع تدفق المركبات في المدن الكبرى. من المعروف إنَّه يعمل كرابط لمستقبل الهيدروكربون أريل AhR والذي من المُمكن أن يتسبب في العديد من الاستجابات الجزيئية (Zaragoza-Ojeda et al., 2022). يُعتبر B(ghi)p من مركبات PAHs التي حازت اهتمامًا كبيرًا من الباحثين؛ كونها تشكل مجالًا مثيرًا للاهتمام (Khokhlov et al., 2018; Verma et al., 2014).

أشار (Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2016) إلى أنّ تعرض خلايا القصبات الهوائية البشرية إلى تراكيز مختلفة من B(ghi)P يؤدي إلى تغيرات مورفولوجية للخلايا عن طريق زيادة عدد الحويصلات في الساييتوبلازم، وكذلك تنشيط مسار AhR، فهو واحد من 16 هيدروكربوناً متعدد الحلقات تم تعريفها على أنّها ملوثات ذات أولوية من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية، نظراً لسُميتها وسلوكها المسبب للطفرات والسرطان (Hou *et al.*, 2015; Mandal *et al.*, 2018).

أظهرت دراسة على يرقات أسماك المنوة *Pimephales promelas* في المياه العذبة أنّ معدل النفوق أقل من 20% بعد 120 ساعة من التعرض لتركيز B(ghi)P قدره 0.15 ميكروغرام / لتر (EC, 2011). تمتلك مركبات PAH المسببة للسرطان على سبيل المثال B(a)P منطقة bay، بينما يُمثل B(ghi)P مجموعة PAHs التي تفتقر إلى منطقة bay وتمتلك بدلاً عنها منطقة K، كما موضح في الشكل (3-2) (Pan *et al.*, 2013).



شكل (3-2) تركيب منطقتي bay و K في الـ B(a)P و B(ghi)P (Pan *et al.*, 2013)

3.2: مصادر التلوث النفطي في البيئة المائية

Sources of oil pollution in the aquatic environmen

تُصنف مصادر التلوث النفطي إلى: مصادر طبيعية Natural sources، ومصادر بشرية Anthropogenic sources، أحد الأسباب الطبيعية الأكثر شيوعاً هو تسرب النفط من قاع المحيطات والبحار، أو التصريف من الصخور المنتجة للنفط في قاع المحيط إلى النظام البيئي البحري (Korotenko *et al.*, 2010)، بينما المصادر البشرية، مثل حوادث التصادم وتسرب النفط من منصات النفط في أثناء التخزين، أو التداول للنفط الخام ومشتقاته، ومياه الصابورة الناتجة عن

تنظيف السفن وصيانتها (Brody *et al.*, 2012)، وإطلاق النفايات السائلة غير المعاملة من المصانع المختلفة، وأعمال الحرب وتصريفات المياه الآسنة مباشرة في المسطحات المائية (Vlaev *et al.*, 2011)، وبمجرد إطلاق النفط في البيئة المائية سيتعرض إلى التغيرات الفيزيائية والكيميائية والبيولوجية كالانتشار، التبخر، التثنت، الذوبان، الامتصاص، الترسيب، الأكسدة الضوئية، الاستحلاب بالماء، التحلل بواسطة الميكروبات (Mishra and Kumar, 2015)، انسكابات النفط البحرية كوارث بيئية تحصل بين الحين والآخر (Hosseinipooya *et al.*, 2022)، طبقاً لأحدث البيانات والإحصاءات وقعت حوادث انسكابات كبيرة (أكثر من 700 طن) وخمسة حوادث انسكابات متوسطة بين (7-700 طن) من السفن البحرية في عام 2021 مما يُعد اتجاهًا تصاعديًا مقارنةً بعام 2020، وبالتالي يُشكل آتارًا سلبية على البيئات المائية (Bi *et al.*, 2021).

4.2: آليات التأثير السام والاثار الناجمة عنها في الاسماك

Mechanisms of toxic action and its effects in fish

إنَّ التعرض للنفط والتأثيرات السامة الناتجة عنه تتأثر بالعديد من الخصائص:

- ❖ خصائص النفط وتكوينه (التي تتغير مع عمليات التجوية، مثل: التبخر، والذوبان والأكسدة، الضوئية، والتحلل البيولوجي).
- ❖ مدة التعرض (التي تتعلق بمعدل التخفيف وسلوك الكائنات الحية).
- ❖ الظروف البيئية، مثل (التعرض للضوء ودرجة الحرارة).
- ❖ سُمية المكونات المشتقة من النفط (والتي تعتمد على درجة حساسية الكائنات المعرضة والتأثيرات التي تم أخذها في الاعتبار).

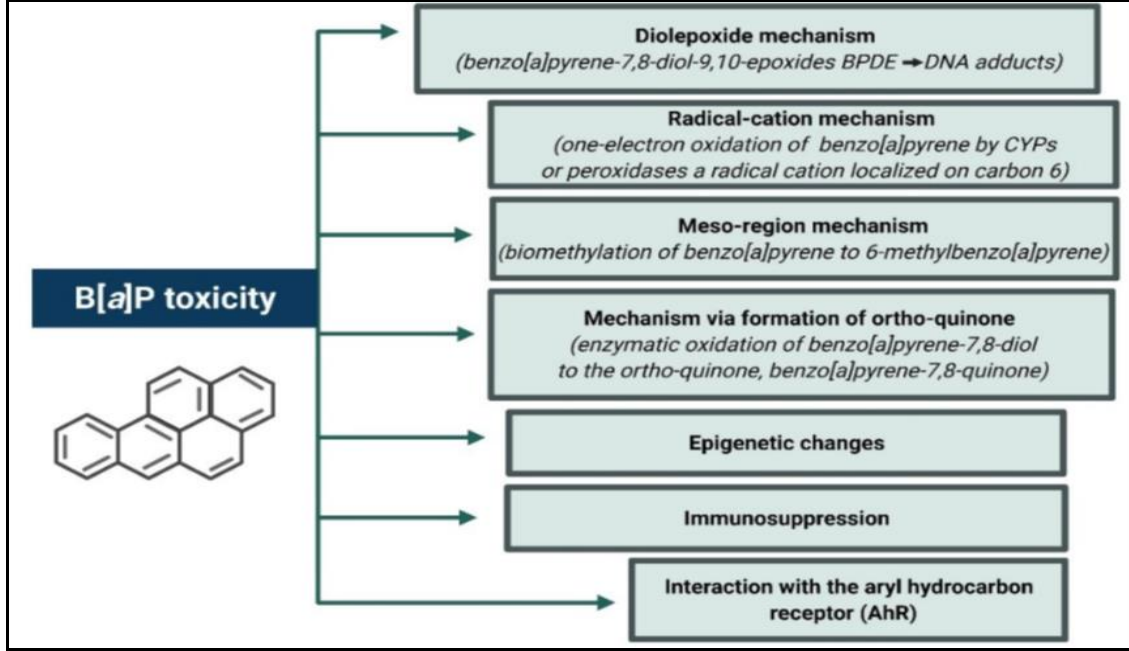
بالنسبة لمعظم الكائنات المائية، فإنَّ المركبات الذائبة هي المركبات المتوفرة بيولوجيًا، وبالتالي تُؤدي إلى تأثيرات سامة حيث يجب تناول هذه المكونات أولاً بواسطة الكائن الحي حتى تحدث التأثيرات (Carls *et al.*, 2008; French-McCay *et al.*, 2023; Hodson *et al.*, 2019; Nordtug *et al.*, 2017; Redman *et al.*, 2011)، وبالرغم من ذلك قد تُسهل قطرات النفط الملتصقة على أسطح الكائنات الحية امتصاص المواد المذابة التي تتداخل ميكانيكيًا مع وظائف الأعضاء (Parkerton *et al.*, 2023).

أشار Incardona *et al.* (2006) إلى أنّ الآلية الأساسية للعمل السام في الكائنات الحية المائية هي السمية الشبيهة بالديوكسين بواسطة تنشيط مسار AhR الذي يتحكم في مجموعة من الجينات المشاركة في أيض PAHs.

PAHs هي مركبات غير تفاعلية نسبياً أتجاه الجزيئات الكبيرة، وتتطلب تنشيطاً أيضاً لتحويلها إلى مركبات ثانوية مؤكسجة ومتفاعلة تُؤثر على الجينات وتحدث أورام سرطانية (Ha *et al.*, 2019)، يتم التمثيل الغذائي بواسطة إنزيمات السيتوكروم P450، وهي من البروتينات المرتبطة بالغشاء، تشارك في تفاعلات المرحلة الأولى من التمثيل الغذائي؛ لأنها تعمل على PAHs، حيث يتم تعديل هذه المركبات بشكل أساسي بواسطة إنزيمات الطور الأول والثاني إلى ناتجات أيضاً أكثر قابلية للذوبان والإفراز بسهولة. تمتلك PAHs القدرة على تغيير المسار الأيضي لعائلة CYP1 المنبع لتحريض CYP1 والذي تتوسطه عوامل نسخ AhR حيث من المعروف أنّ معظم هذه المركبات تحفز مسار AhR مما يعزز نسخ CYP1A وبالتالي تحفيز عملية الأيض لـ PAHs (Franco and Lavado, 2019).

يُمكن لبعض مشتقات PAHs أن ترتبط تساهمياً بالحامض النووي والبروتينات والتي تكون مسؤولة عن إحداث الطفرات المؤدية إلى التشوهات والأورام السرطانية (Santana *et al.*, 2018). هناك آلية أخرى مُعترف بها لسمية هذه المركبات هي بداية الإجهاد التأكسدي الناتج عن مشتقات المسارات الأيضية للمركبات الأم (Crowe *et al.*, 2014; Santana *et al.*, 2018)، أو عن طريق التفاعل الضوئي (التنشيط الضوئي) للمركبات الأم بواسطة ضوء الأشعة فوق البنفسجية، إذ يُمكن تعزيز سمية هذه المركبات بواسطة ضوء الأشعة فوق البنفسجية اعتماداً على هيكلها الجزيئي (Sun *et al.*, 2021)، حيث تتفاعل هذه المركبات في حالة الإثارة الضوئية مع المواد الكيميائية المتواجدة لإنتاج مواد وسيطة تفاعلية مثل أنواع الأوكسجين التفاعلية reactive oxygen species (ROS) و PAHs المؤكسجة والجذور الحرة التي تحفز الإجهاد التأكسدي (Fu *et al.*, 2012). يتضح الإجهاد التأكسدي من خلال الاضطراب الأنزيمي، مما يُؤثر على العديد من أنزيمات مضادات الأوكسدة، مثل (superoxide dismutase, glutathione-S-transferase and catalase) والفيتامينات والجلوتاثيون، مما يترجم في النهاية إلى ضرر فعلي لبيروكسيد الدهون (Yazdani, 2020). إضافة على ذلك يُمكن أن تعمل PAHs كمثبطات للمناعة عن طريق الحد من مناعة الكائنات الحية المعرضة، وهي آلية ترتبط باستحداث موت الخلايا المبرمج للخلايا

اللمفاوية والبلعمية (Logan, 2007)، كما لوحظ أنها تعمل على إعاقة عمل الغدد الصماء (Zhang *et al.*, 2016)، تحدث السمية نتيجة التعرض الحاد والمزمن، والسمية تكون شائعة في أغلب المواد الكيميائية العضوية، وذلك من خلال التأثير على أغشية الخلايا والأنسجة العصبية (Paumen *et al.*, 2009). كنموذج لـ PAHs الشكل (4-2) يوضح آليات B(a)P في السمية.



شكل (4-2) آليات B(a)P في السمية (Bukowska *et al.*, 2022).

يمتاز جنين الأسماك بحساسية عالية اتجاه هذه المركبات خلال المراحل المبكرة من التطور (Cherr *et al.*, 2017)، ويتم ذلك خلال مرحلتين الأولى خلال مراحل الانقسام عندما تعيق هذه المركبات نشوء المحور الظهري البطني وينتج عن ذلك أجنة غير قادرة على الوصول إلى مرحلة الفقس، بينما المرحلة الثانية وهي الأكثر حساسية عند تعرض القلب إلى هذه الملوثات، فأنها تؤدي إلى اضطراب وظائف القلب، مما يؤثر على بقاء الأسماك على قيد الحياة (Incardona and Scholz, 2016)، وبالتالي يؤثر على أداء السباحة نتيجة اضطراب وظيفة القلب؛ بسبب هذه المركبات، كما بينت الدراسات أن مركبات PAHs الموجودة في النفط الخام تؤثر في تنظيم الجينات المهمة في نمو العين ووظيفتها وتتسبب في التشوهات المورفولوجية للعين (Magnuson *et al.*, 2018).

تؤثر العديد من مركبات PAHs في فقدان كتلة العظام وقوة العظام، ويؤدي التعرض لهذه المركبات إلى اضطراب العظام في سمك الرنجة في المحيط الهادي والسلمون الوردي والميديكا (Billiard *et al.*, 2006)، كما ثبت أن B(a)P يمنع تكوّن خلايا نخاع العظم في الجرذ

(Guo *et al.*, 2018)، مما يُشير إلى أنه ينبغي إيلاء المزيد من الاهتمام لعملية التمثيل الغذائي (Ikegame *et al.*, 2019)، كما لوحظت تشوهات في العمود الفقري للأسماك التي تعيش في المناطق الملوثة بالنفط الناتج عن حوادث الناقلات (De Soysa *et al.*, 2012)، كما لوحظ أن مياه البحر الملوثة تثبط نشاط العظام في الأسماك من خلال عمليات الإضافة و/أو التآزر لـ PAHs (Suzuki *et al.*, 2016). أما في كبد الأسماك، فإن التراكم الحيوي لهذه المركبات يكون واضحاً؛ لكون الكبد من الأعضاء المستهدفة، وقد أثبتت التجارب التي أجريت على خلايا الكبد تعرضها للسمية الخلوية عند معاملتها بهذه المركبات (Rahmanpour *et al.*, 2014; Yadetie *et al.*, 2018).

أظهرت مركبات PAHs سُمية للغدد التناسلية حيث تُساهم في تأخر نضج المبايض وموت الخلايا المبرمج، وقد لوحظ إن أسماك الجمبري المعرضة لمركبات Pyrene تُعاني في انخفاض مجالات التكاثر (Colli-Dula *et al.*, 2018)، فضلاً عن انخفاض الخصوبة وعدد مرات التكاثر وبقاء اليرقات على قيد الحياة وتشوه الأمشاج وتكون بأعداد قليلة، كما تتأثر الذكور عند التعرض لهذه المركبات فقد لوحظ إن بعض حيواناتها المنوية غير طبيعي ويُعاني من تشوهات (Kim *et al.*, 2008).

هناك تأثيرات أخرى لهذه المركبات، مثل الاستجابات السلوكية للحيوانات كالحمول وقلة النشاط في أثناء السباحة والتزاوج (Ali *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2008).

أما تأثير هذه المركبات على النمو، فهي تؤدي إلى انخفاض بناء الهيكل العظمي في سمكة القاروص (*Dicentrarchus labrax*) (Olsvik *et al.*, 2021) والتشوهات القحفية أو تشوهات في الفكوك في أسماك *Sebastiscus marmoratus* (Lu *et al.*, 2020)، كذلك لوحظ حدوث نزف في بعض الأسماك المعرضة لهذه المركبات، وبالتالي فإن كل هذه التأثيرات سوف تنعكس على النمو، مما يؤدي إلى انخفاض في وزن وحجم هذه الأسماك، فضلاً عن انخفاض مستويات الدهون المخزونة كمصدر للطاقة (Gilliers *et al.*, 2012; Jee *et al.*, 2006).

كما تمتلك هذه المركبات تأثيرات أخرى خاصة في تنظيم الضغط الأزموزي والتمثيل الغذائي، فلقد لوحظ عند تعرض الأسماك للمركبات النفطية القابلة للذوبان في الماء أن هناك تغيرات مظهرية في الخياشيم وهذا له علاقة بتقليل التلامس مع الملوثات مما يقلل من المساحة السطحية للخياشيم، وبالتالي يؤثر على نسبة الأوكسجين، مما يؤدي إلى حدوث خلل في التمثيل الغذائي في الأسماك،

كما إنَّ هذه المركبات تثبط نشاط أيونات البوتاسيوم والصوديوم اللذان يلعبان دورًا مهمًا في تنظيم عملية التناضح (Agamy, 2013).

إنَّ مركبات PAHs تمتلك تأثيرات كبيرة على بقاء الأسماك على قيد الحياة، وتم دراسة ذلك من خلال اختبارات السُمية، مثل الجرعة القاتلة للنصف (Lethal Dose 50 (LD50) أو التركيز القاتل للنصف (Lethal concentration 50 (LC50)، ولُوحظ أنَّ يرقات الأسماك أكثر عرضة لهذه المركبات؛ بسبب قدرتها المحدودة على الهروب أو الابتعاد من هذه الملوثات مقارنة مع الأسماك البالغة (Frantzen *et al.*, 2012)، إنَّ حساسية الأسماك العالية لهذه المركبات يُؤدي إلى العديد من الاستجابات النوعية وغير النوعية من قبل الجهاز المناعي، مثل إنتاج الأجسام المضادة أو زيادة نشاط الجسيمات الحالة و/ أو عملية البلعمة (Jazza *et al.*, 2015).

أوضح (Derakhshesh *et al.* (2019) أنَّ أنواع الهامور في خليج المكسيك المتعرضة لهذه المركبات تُعاني من تغيرات خلوية ومورفولوجية كبدية كبيرة وتثبيط التمثيل الغذائي وضعف الخصوبة والإجهاد التأكسدي وحصول طفرات تُؤدي إلى إحداث أورام سرطانية.

لُوحظت آثار شبيهة مميّزة مرتبطة بالتلوث بـ PAHs في كل من الأجنة والياغين والبالغين، وانخفاض في القدرة الإيجابية وحجم الغدد التناسلية وإنتاج البيض نتيجة التلوث بها (Thanuthong *et al.*, 2011). تتمتاز هذه المركبات بأنَّها مركبات عضوية ثابتة وذات سُمية عالية وكارهة للماء، وتُميل إلى التراكم في الأنسجة الدهنية، ولها القدرة على إحداث تأثيرات سُمية ومميّزة وشبه مميّزة في كائنات المياه العذبة، ولها ميل للتراكم في أنسجة الأحياء خلال السلاسل الغذائية لتصل إلى الإنسان كونه يحتل قمة السلسلة الغذائية (Jazza, 2018; Salman *et al.*, 2014).

5.2: التمثيل الغذائي للهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات

Metabolism of PAHs

العديد من مركبات PAHs مسببة للسرطان، مما يتطلب تحوُّلاً كبدياً لتكوين موادٍ أبيضية ثانوية مُسببة للسُمية (Jarvis *et al.*, 2021; da Silva Junior *et al.*, 2021; Branco *et al.*, 2013)، خلال المرحلة الأولى من التحول وبالتحديد عن طريق نظام Cytochrome p450 mono oxygenase، تتشكل هذه المستقلبات التفاعلية، مثل (phenols, phenol diols, diol-epoxidase, dihydrodiols, quinones) التي يُمكن أن ترتبط تساهمياً بالحامض النووي لتشكل معقدات (Chen, 2020). على سبيل المثال يتم إزالة السموم من diol-epoxidase بشكل

أساسي بواسطة expoxide hydrolase إلى dihydrodoil، ولكن هذه المركبات عبارة عن ركائز CYP1A1 والتي تحولها إلى dihydrodoil epoxidese تفاعلية لا يُمكن لـ expoxide hydrolase إزالة السموم منها وعليه، فإنَّ اقتران المرحلة الثانية ضروري (El-Sherbeni and El-Kadi, 2014)، وتضمن تفاعلات المرحلة الثانية اقتران مستقلبات PAHs مع glutathione لإنتاج معقدات قابلة للذوبان في الماء التي تفرز بسهولة بواسطة الكائنات الحية (Sinaei and Zare, 2019)، من الإنزيمات المشاركة في هذا التفاعل هو glutathione- s- ransferase الذي يُحفز على المستوى الجزيئي لإنتاج أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS) التي تُؤثر على الجزيئات الكبيرة، مثل الدهون والبروتينات والأحماض النووية والتي قد تبلغ ذروتها في الالتهاب وموت الخلايا (Santana *et al.*, 2018)

6.2: التراكم الحيوي للهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات في الأسماك

Bioaccumulation of PAHs in fish

النظم البيئية المائية عرضة لتلقي وتراكم الملوثات المختلفة خاصة مركبات PAHs، فهي مسؤولة عن تدهور هذه الأنظمة في السنوات الأخيرة (Baali *et al.*, 2016). تتنوع مسارات تعرض مركبات PAHs في الحيوانات المائية، فهي تحدث إما عن طريق التنفس وابتلاع الطعام والرواسب والجزيئات العالقة أو عن طرق التلامس مع الجلد والخياشيم (Honda and Suzuki, 2020)، لقد وجدت العديد من الدراسات تراكيز مختلفة من هذه المركبات في الأسماك والفقاريات البحرية الأخرى في كل أنحاء العالم (Frapiccini *et al.*, 2018) مقارنة بالملوثات البيئية الأخرى، فإنَّ نصف عمر هذه المركبات في الكائنات الحية قصيرة نسبياً كونها مركبات قابلة للأبيض بسرعة (Recabarren- Villalón *et al.*, 2021)، إنَّ حدوث التعرض مستمر لها لكنَّ بسبب التمثيل الغذائي السريع لهذه المركبات، فإنَّها لا تميل إلى التضخم الأحيائي Biomagnification على المستوى الغذائي في السلسلة الغذائية (Zhang *et al.*, 2015). تتمتع الأسماك ذات المستوى التغذوي العالي بقدرة أكبر على أيض هذه المركبات، كما إنَّ تراكيزها تكون أقل في المستويات الغذائية الدنيا من السلسلة الغذائية (Zhang *et al.*, 2015). يصعب الحصول على إجماع حول اتجاه تراكم PAHs في الأسماك بين المستويات التغذوية؛ بسبب الاختلافات الكبيرة في التوافر البيولوجي لهذه المركبات بين أنواع الموائل (Oliva *et al.*, 2017).

ذُكرت العديد من الدراسات وجود كميات من PAHs في الأسماك منها (de Albergaria- Barbosa *et al.*, 2017; Kanhai *et al.*, 2015; Murawski *et al.*, 2014; Olayinka *et al.*, 2019; Romero *et al.*, 2018; Snyder *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019)، هذا يُشير إلى أنّ التعرض المستمر لهذه المركبات يحدث في جميع أنحاء العالم فضلاً عن عمليات التراكم الأحيائي لهذه المركبات (Almatari *et al.*, 2017; Froehner *et al.*, 2018; Kwok *et al.*, 2013).

استخدمت الأسماك كمؤشرات حيوية للتلوث بـ PAHs؛ لكونها تحتل مكانة رئيسية في السلسلة الغذائية وبسبب أهميتها التجارية والاقتصادية تُعد الأسماك أكثر الكائنات الحية أهمية في البيئات المائية (Recabarren-Villalón *et al.*, 2021)، فضلاً عن ذلك ومن الناحية الصحية تُعد الإسمك الملوثة أحد أكثر المسارات شيوعاً للملوثات الثابتة التي يتعرض لها البشر (Akinsanya *et al.*, 2018). يُوفر استخدام أنواع المؤشرات الحيوية في القياسات البيئية مزايا عديدة، مثل التمثيل الجيد والحساسية والأهمية البيئية العالية (Fontanetti *et al.*, 2011). هناك العديد من العوامل التي تُؤثر على تراكم PAHs بواسطة الأسماك كمعدل الامتصاص والعادات الغذائية والتمثيل الغذائي والحالة الصحية والعمر (Baali and Yahyaoui, 2020) وبالتالي، فإنّ زيادة المعرفة حول المؤشرات الحيوية أمر مهم لمعرفة أنماط التراكم الحيوي في الأسماك لتقييم مخاطر السمية البيئية؛ لأنّ هذه الظاهرة تشير إلى الآثار الضارة على الكائنات الحية وتدهور النظام البيئي (Honda and Suzuki, 2020).

7.2: تأثير الهيدروكربونات الأروماتية متعددة الحلقات على صحة الإنسان

Impact PAHs on human health

من المُمكن أن يتعرض الإنسان لمركبات PAHs من خلال ثلاث طرق رئيسية: الاستنشاق، والابتلاع، وملامسة الجلد، وتتراوح الآثار الصحية من الحادة أو القصيرة المدى إلى المزمنة أو طويلة المدى، تعتمد التأثيرات الحادة على فترة التعرض والتركيز ونوعية المركبات وطريقة التعرض (Hrdina *et al.*, 2022; Palade *et al.*, 2023)، إنّ المستويات العالية من هذه المركبات تُؤدي إلى ظهور أعراض تهيج العين والجلد والغثيان والإسهال، كما وجد أنّ التعرض الطويل الأمد لمستويات منخفضة من B(a)P يُسهم في زيادة خطر الإصابة بسرطان الجلد والرئة والمثانة والجهاز

الهضمي (Kim et al., 2013)، من جانب آخر، فإن الآثار الصحية التي تُنسب إلى التعرض المزمن لهذه المركبات تشمل إعتام عدسة العين وتدهور الجهاز المناعي وتلف الأعضاء الداخلية، مثل الرئتين والكلى والكبد، مما يؤدي إلى الإصابة باليرقان، أحياناً، قد تؤدي إلى الصعوبة في التنفس واحمرار والتهاب الجلد، ولُوحظ أنَّ النفتالين يؤدي إلى انحلال الدم، وتكسر خلايا الدم الحمراء (Volney et al., 2018). لقد بيّنت العديد من الدراسات أنَّ مركبات PAHs تُساهم في حدوث سرطان الجلد والمعدة، والكبد والرئة والمثانة والمجاري البولية، وقد كان ذلك واضحاً في سكان الولايات المتحدة الأمريكية في المناطق القريبة من المصانع الكيميائية؛ بسبب تعرضهم لهذه المركبات عن طريق استنشاق الهواء الملوث (Sharma et al., 2018).

تُسبب PAHs تغيرات تركيبية ووظيفية للغشاء وتؤثر على التوازن وكذلك تُعطل وظيفة الجهاز العصبي المركزي مما يؤدي في النهاية إلى موت الخلايا (Hac-Wydro et al., 2019). من المُمكن أن يؤدي التعرض لهذه المركبات في مكان العمل وفي البيئة إلى تطور الأمراض القلبية الوعائية، مثل الشريان التاجي وأمراض الشرايين الطرفية واحتشاء عضلة القلب والسكتة الدماغية (Mallah et al., 2022).

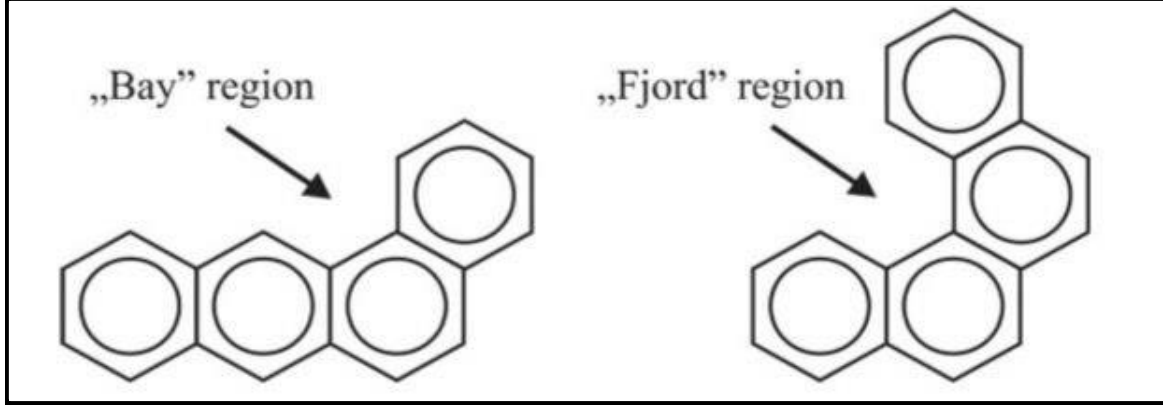
أوضح Chen et al. (2021) أنَّ التعرض لـ PAHs من المُمكن أن يضر بالسائل المنوي والهرمونات الذكرية، وبالتالي يُؤثر على القدرة الإنجابية للذكور، كما بيّن Zhang et al. (2022) أنَّ هذه المركبات تُؤثر على مستويات هرمونات التكاثر في الدم، مثل (Luteinizing, estradiol, testosterone hormone, prolactin)، إلى جانب ذلك وجد أنَّ تراكم B(a)P في أنسجة الغدد التناسلية الذكرية، يُولد طفرات في خلايا الحيوانات المنوية ويُضعف خصوبة الذكور.

8.2: آلية حدوث السرطان من قبل مركبات PAHs

Mechanism of carcinogenesis by PAHs

يؤدي التعرض لمركبات PAHs إلى تكوين معقدات مع الحامض النووي نتيجة للارتباط بواسطة أواصر تساهمية تتكون بين هذه المركبات والقواعد النيتروجينية في الحامض النووي أو مع البروتينات، ويُعزى ذلك إلى الخصائص التركيبية لهذه المركبات التي تشكل حلقاتها الأروماتية المتعددة زوايا مختلفة والتي تمتلك مواقع ذات تأثير كبير يُعبر عنها بـ fjord أو bay، كما في الشكل (2-5). من المعروف إنَّ التفاعل يعتمد بشكل مباشر على شحنة الالكترين، وبالرغم من ذلك تُؤثر الأشكال الهندسية في الجزيئات على توزيع الشحنة وأيضاً بشكل غير مباشر على تفاعلها في مواقع معينة،

المركبات ذات مناطق fjord ، مثل B(a)P غير مستوية بشكل عام وترتبط بشكل تفضيلي بنيوكليوتيدات الأدينين، في حين أن PAHs ذات مناطق bay مستوية وترتبط بنيوكليوتيدات الكوانين (Lakshman *et al.*, 2000; Muñoz and Albores, 2011).



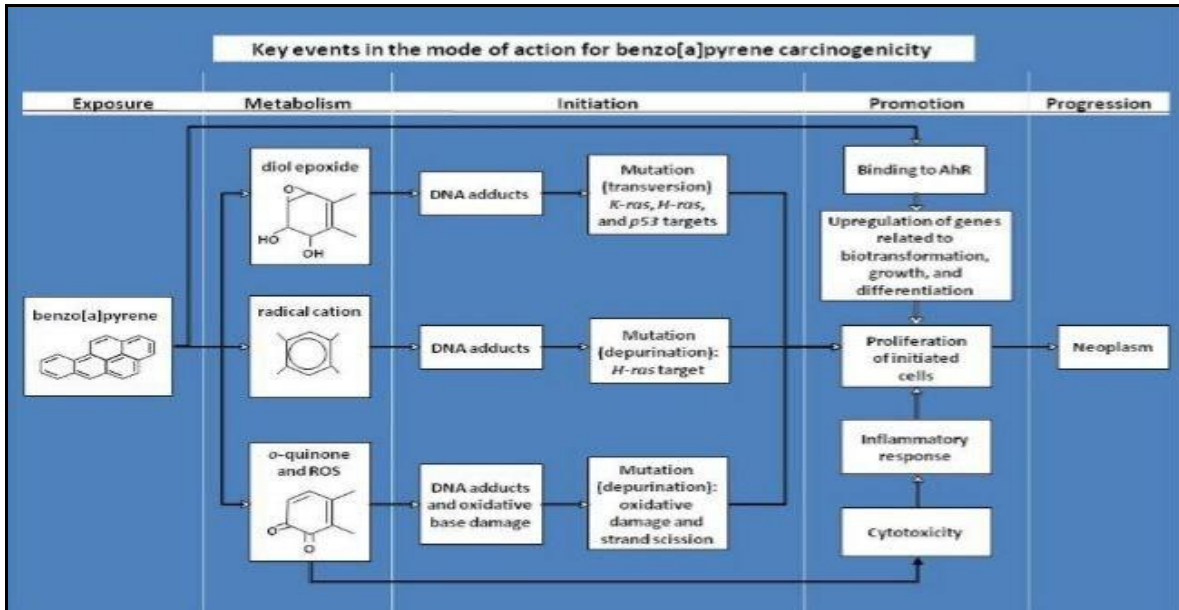
شكل (5-2) مناطق bay و fjord في PAHs (Ewa and Danuta, 2017)

يُمكن تمييز ثلاثة مسارات رئيسية لتنشيط هذه المركبات، الشكل (6-2):

أولاً: تكوين dihydrodiol epoxides مُحفراً بواسطة أنزيمات cytochrome P450 و epoxide hydrolase.

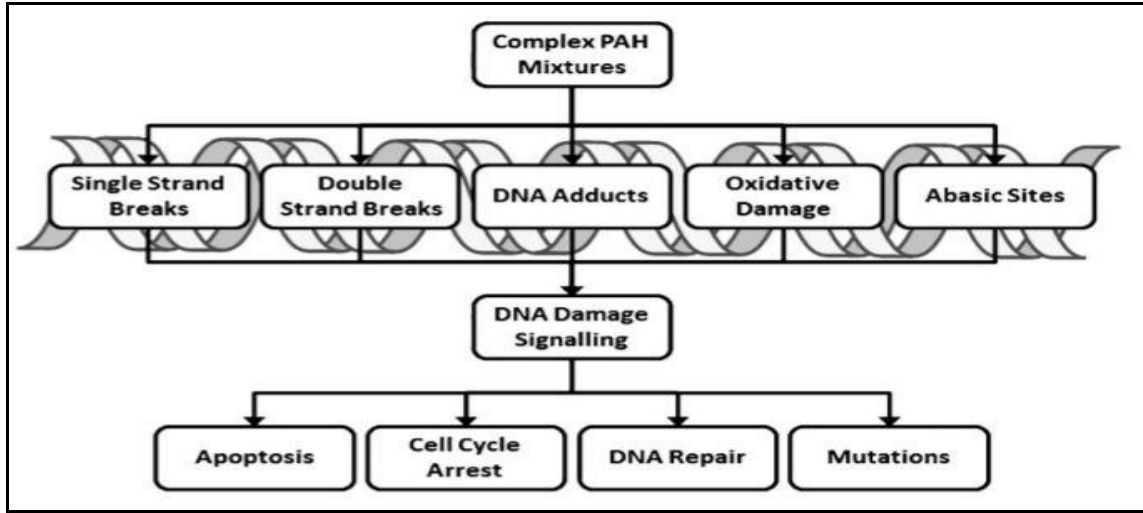
ثانياً: تكوين كاتيون جذري لـ PAHs بعملية الأكسدة الأيضية عن طريق النشاط cytochrome P450 peroxidase.

ثالثاً: تكوين ortho-quinones عن طريق أكسدة catechols بواسطة dihydrodiol dehydrogenase (Dharwadkar, 2011; Shimada, 2006).



شكل (6-2) مسارات التنشيط الأيضية المقترحة والأحداث الرئيسية في طريقة العمل المسرطنة لـ B(a)P (US EPA, 2017).

من الأمور الأساسية للاستجابة لمحفزات الضرر هي تلف الحامض النووي، الذي يؤدي إلى استجابات نهائية، مثل توقف دورة الخلية وإصلاح الحامض النووي (McCarrick *et al.*, 2019) في حين إن تلف الحامض النووي المفرط الذي لا يمكن إصلاحه يُمكن أن يؤدي إلى موت الخلايا المبرمج، كما موضح في الشكل (2-7)، يُعتبر كلا السيناريوهين استجابات إيجابية؛ لأنَّهما يَمنعان العملية المُسببة للسرطان (Jarvis *et al.*, 2014). العديد من الدراسات الوبائية والسُمية المختلفة أظهرت ارتباطاً معنوياً بين التعرض لـ PAHs وزيادة خطر الإصابة بالسرطان (Sarigiannis *et al.*, 2015).



شكل (2-7) الآثار المترتبة عن تعرض الحامض النووي لمخاليط مركبات PAHs (Jarvis *et al.*, 2014)

9.2: أهمية الثروة السمكية The importance of fisheries

الأسماك مجموعة واسعة من الفقاريات عددها أكبر من جميع الفقريات الأرضية معًا (Dighiesh *et al.*, 2019). جزء كبير من سكان العالم يعتمد على المأكولات البحرية، وخاصة الأسماك، فهي تُمثل مصدرًا غذائيًا في العديد من مناطق العالم (Assefa and Abunna, 2018;)، فهي تُلبي المتطلبات الغذائية الضرورية، فاستهلاك 150غم يُوفر حوالي 60% من احتياجات البروتين اليومية للبالغين (Yemmen and Gargouri, 2022)، يتم استهلاكها على نطاق واسع كمصدر مهم للبروتين والطاقة والفيتامينات والأحماض الدهنية المتعددة غير المشبعة والمعادن، والمعروفة بفوائدها الصحية ومع ذلك، فإنَّ الكائنات المائية الملوثة قد تُشكل خطرًا كبيرًا على صحة الإنسان (Kheiri *et al.*, 2022).

بيّن Tambalis and Arnaoutis (2022) إلى أنَّ الأحماض الأمينية الموجودة في عضلات الأسماك من أكثر المكملات الغذائية فاعلية في تحسين الأداء الصحي والرياضي.

تُستخدم الأسماك على نطاق واسع لقياس مدى تراكم التلوث وتأثيرات الحالة الصحية حيث تُعد الأسماك علامة تلوث ممتازة؛ لأنها تتفاعل بمرونة قوية مع تغيرات بيئة المياه (Kumari and Khare, 2018)، خضعت أنواع الأسماك المختلفة لمثل هذه الدراسات؛ لأنَّ الأسماك، مثل الحيوانات المائية، تتأثر بالملوثات البحرية، فضلاً عن ذلك، مثل الفقاريات أنظمتها الأيضية لها بعض أوجه التشابه مع نظمنا الأيضية (Rusni et al., 2022).

مُمكن استخدام المؤشرات الحيوية في الأسماك كعلامات إنذار مبكر لتدهور البيئات المائية الذي يَسمح للإدارة البيئية بالتخفيف من الآثار السلبية المحتملة على مستويات أعلى من التنظيم البيولوجي، تم استخدام تحريض CYP1A بواسطة PAHs في الأسماك كمؤشر حيوي للتعرض منذ منتصف السبعينات (Hassanin and Kaminishi, 2019).

10.2: الكارب الشائع Common carp

صُنفت أسماك الكارب الشائع بالاعتماد على (Coad 2010) :

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Subphylum: Vertebrata

Class: Actinopterygii

Subclass: Neopterygii

Order: Cypriniformes

Family: Cyprinidae

Genus: Cyprinus

Subject: Cyprinus carpio Linnaeus, 1758

ينتمي الكارب الشائع إلى عائلة Cyprinidae وهي أكبر عائلة من أسماك المياه العذبة وتنتشر على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم (Obaid et al., 2021). تُعد هذه السمكة في العراق من أغنى مصادر البروتين نظرًا لقيمتها الغذائية، تم إدخالها إلى العراق في الفترة من 1960 إلى 1972 (Jawad, 2003; Obaid et al., 2021). يُساهم الكارب بأكثر من 20 مليون طن من إنتاج الأسماك في جميع أنحاء العالم ويُمثل ما يقرب من 40% من إجمالي إنتاج تربية الأحياء المائية في العالم و 70% من إجمالي إنتاج تربية الأحياء المائية في المياه العذبة (Bostock et al., 2010; Xu et al., 2014). إلى جانب الأهمية الاقتصادية، يُعد الكارب الشائع (*Cyprinus carpio*) مناسبًا للغاية لإجراء دراسات مرضية و فسيولوجية مقارنة مع أسماك الزرد الحيوانية (*Danio*

(*rerio*)، إنها مرتبطة ارتباطاً وثيقاً وراثياً، ولكنها تُقدم فوائد تكميلية للبحوث الأساسية، حيث تُسهل كتلة الجسم الكبيرة من الكارب الشائع إمكانيات الحصول على مادة خلوية كافية للدراسات المخبرية (Kolder *et al.*, 2016).

1.10.2: الكروموسوم والجينوم في الكارب الشائع

أشارت الكثير من الدراسات إلى حدوث الازدواج الجينومي (Genome duplication)، وهي آلية رئيسية يتم من خلالها تكوين مادة وراثية جديدة في أثناء التطور الجزيئي في مرحلة النشوء نتيجة اندماج جين كل من الأبوين للأسماك الكاملة التعظم (Teleoste)، أو الازدواج الجينومي الكامل للأسماك (Fish specific genome duplication – FSGD) في معظم الأسماك شعاعية الزعانف (*Actinopterygii*) (Meyer and Van de Peer, 2005).

أيدت دراسات عدة أنّ ازدواج الجينوم ساعد في تطور الكارب الشائع حيث يبلغ عدد كروموسومات الكارب الشائع $2n = 100$ في حين في أنواع الكارب الأخرى $2n = 50$ ومحتواها من الحامض النووي DNA يكون أعلى، ويحتوي جينوم الكارب الشائع على (52610) من الجينات التي تعبر عن بروتينات متعددة ويتركز نحو 92.3 من المعلومات الوراثية الخاصة بها في الكروموسومات الرباعية (Xu *et al.*, 2014).

حُدّد ما يقارب 50 كروموسوم ثنائي التكافؤ بدلاً من رباعي التكافؤ في علاقة الانقسام الاختزالي للنواة (اختزال عدد الكروموسومات إلى النصف في الخلايا التناسلية)، بما يتوافق مع الحزم السابقة للأسماك رباعية تكافؤ الجينوم وهذا ينسجم مع ما تم التوصل إليه مسبقاً لجينوم الأسماك رباعية الصيغة الكروموسومية (Aljuboory and Al-Khshali, 2018; Amores *et al.*, 1998).

11.2: التباين الوراثي Genetic variation

يُعد الحفاظ على معلومات التسلسل الجينومي أمراً مهماً لاستمرار الحياة في الكائنات الحية، حيث إنّ الحامض النووي يُمثل الوحدة الأساسية للوراثة يتأثر بالتعديلات الكيميائية الناتجة عن العوامل الداخلية والخارجية (Chatterjee and Walker, 2017). إنّ حوالي 99.9% من الجينوم بين الأفراد متشابهة وإنّ 0.1% فقط منها يختلف في الكروموسوم، هذا التباين هو المسؤول عن التنوع في الأنماط الظاهرية وقبولها للتأثيرات البيئية. التشكل الوراثي البديل للجين الذي يحدث في الموقع نفسه على الكروموسومات المتجانسة يُسمى الأليل، يحمل اختلافاً طفيفاً في تسلسل الحامض

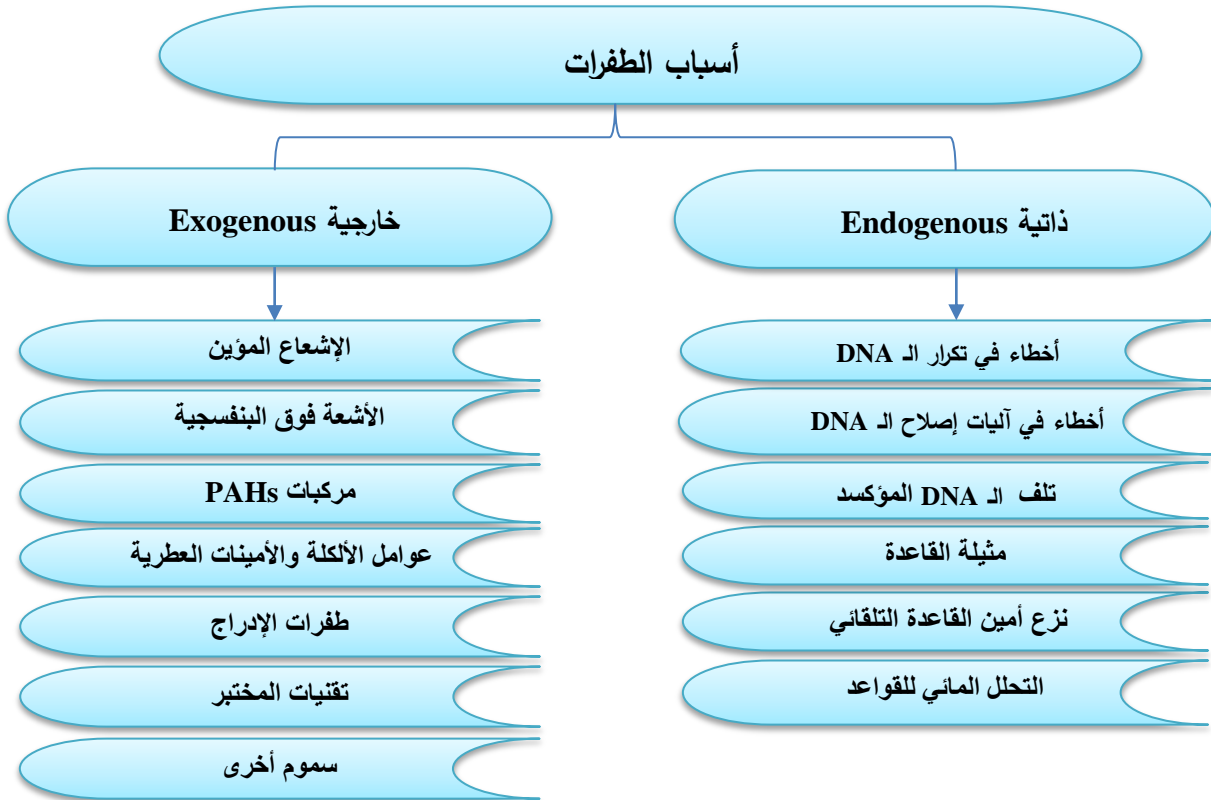
النووي ويساهم في الصفات الجسدية الفردية لكل شخص، يتم توريث أليل واحد لكل جين من كلا الأبوين (Al-Koofee and Mubarak, 2019).

يتم ترجمة المعلومات الوراثية المشفرة داخل تسلسل الحامض النووي إلى بروتين عن طريق الشفرة الوراثية، حيث إن كل ثلاثة نيوكليوتيدات تُسمى الكودون تشفير حامض أميني معين في البروتين (Nirenberg, 2004)، وإنّ التغير في تسلسل نيوكليوتيدات الحامض النووي قد يتسبب في إنتاج بروتين معطل أو مختلف أو عدم وجود بروتين، ومن ثم، فإنّ التغيرات في المادة الجينية قد تؤثر على نشاط الجين ووظيفته (Ribeil *et al.*, 2017).

12.2: الطفرات الوراثية Genetic mutation

تُمثل الطفرات مصدرًا مهمًا ومباشرًا في إحداث التباين الوراثي بين الأفراد، بالإمكان تحديدها كمتغيرات تحدث بتكرار أقل من 1% من السكان (Stenson *et al.*, 2009). قد تحدث على مستوى الكروموسوم وتُسبب تغييرًا في عدد وتركيب الكروموسومات عند إذ تُسمى بالطفرات الكروموسومية، كما يُمكن حدوثها على مستوى الجين، إذ تتسبب بتغيير قاعدة نيتروجينية واحدة أو أكثر (Van Laere *et al.*, 2003).

يُمكن تصنيف الطفرات على أساس نوع الخلية أما جنسية أو جسدية، الطفرات الجنسية موجودة في البويضة أو الحيوانات المنوية وموروثة من أحد الأبوين، في حين الطفرات الجسدية أو المكتسبة موجودة في خلايا معينة لا يُمكن نقلها إلى الذرية وتحدث بسبب العوامل البيئية، مثل المواد الكيميائية، أو الإشعاع، أو من خلال الأخطاء في انقسام الخلايا (Chandrasekaran and Elias, 2021; Gyasi, 2022)، تحدث طفرات الحامض النووي تلقائيًا في الطبيعة أو مستحثة نتيجة لمطفرات (عوامل ذات استعداد لتغيير الحامض النووي) (Durland and Ahmadian, 2021) كما موضح في المخطط (1-2).

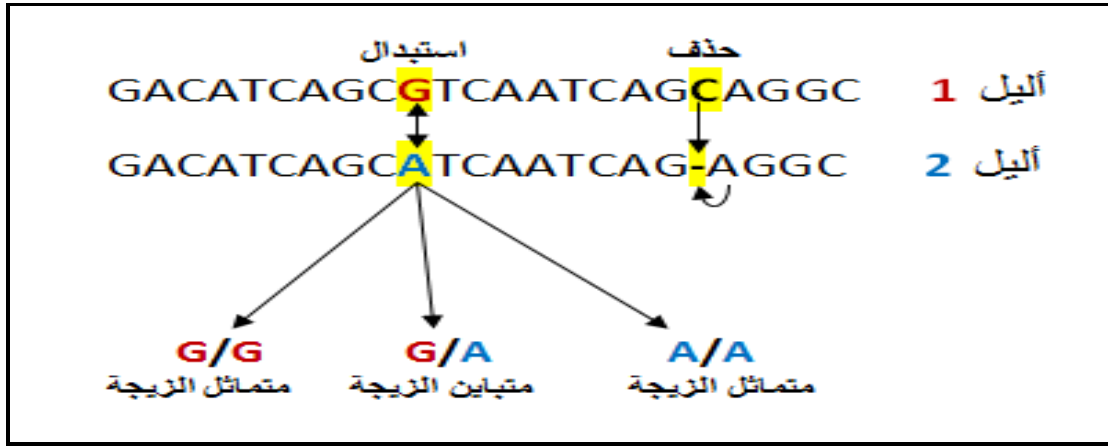


مخطط (1-2) أسباب الطفرات (Durland and Ahmadian-Moghadam, 2021)

1.12.2: تعدد أشكال النوكليوتيدات المفردة (SNPs)

هي اختلاف في تسلسل الحامض النووي وتحدث عندما يختلف نيوكليوتيد واحد في تسلسل المادة الوراثية وبتكرار 1% على الأقل من السكان، مثلاً يختلف نيوكليوتيد واحد (G,A,T,C) في الجين بين فردين من نفس النوع الحيوي أو بين الكروموسومات المزدوجة (Dhutmal *et al.*, 2018). يمكن الاستفادة من الـ SNP حيث تعمل كواسمات بيولوجية تُساعد الباحثين على تحديد الجينات المرتبطة بالمرض، فعندما يحدث SNP داخل الجين أو في منطقة تنظيمية بالقرب من الجين، فإنها تؤدي دوراً مباشراً في المرض من خلال التأثير على وظيفة الجين (Mishra *et al.*, 2017; Sukhumsirichart, 2018)، وتعد الـ SNP الأكثر حدوثاً من كل المتغيرات الجينية التي تحدث عادة في الحامض النووي للفرد، إنَّ نسبة حدوثها قريبة من 90% من المتغيرات الجينية البشرية. يُعرف تعدد الأشكال الوراثية للنوكليوتيدة المفردة SNP أنه موقع ضمن تتابع القواعد النيتروجينية لـ DNA من الممكن أن تشغله إحدى قاعدتين نيتروجينيتين، فنكون أليلاً معيناً وحينما تحل الثانية تكون الأليل الآخر والشكل (2-8) يوضح ذلك، إنَّ مثل هذا الموقع الذي يُحتمل فيه وجود قاعدتين

متبادلتين في كل أليل في الجينوم يتسبب في حصول اختلاف أليلي يُمكن وصفه بـ SNP (Yang *et al.*, 2013)، قد يكون هذا التغيير في أي منطقة من الجينوم سواء في المناطق المشفرة (أكسون) أو في المناطق غير المشفرة (أنترون)، أو في مناطق المشغل (Promoter) للجين، أو بين الجينات (Mishra *et al.*, 2017)، يتضمن هذا النوع من التعدد المظهري تغييراً في قاعدة نيتروجينية واحدة فقط استبدال أو إضافة أو حذف والأكثر شيوعاً هو الاستبدال للقواعد النيتروجينية ضمن الجينوم الواحد، إذ تشكل ثلثي تشكلات SNP (Zhao and Boerwinkle, 2002).



شكل (8-2) تعدد أشكال النيوكليوتيدات المفردة لأليلين (من تصميم الباحث)

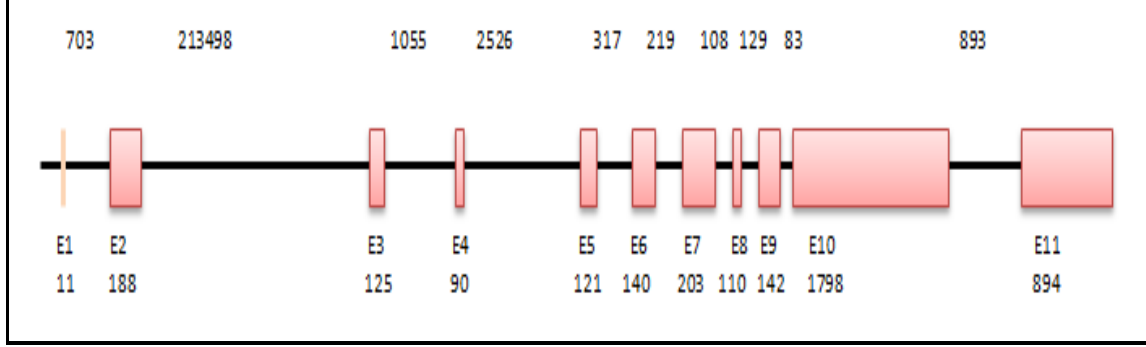
13.2: جين مستقبل الهيدروكربون أريل 2

The aryl hydrocarbon receptor 2 gene (*AhR2* gene)

عضو في عائلة عوامل النسخ اللولبية الحلزونية الأساسية (BHLH-PAS) basic helix-loop-helix per-Arnt-Sim ، وهو عامل نسخ منشط بواسطة رابط (ligand) (Dai *et al.*, 2022)، يستجيب *AhR2* لإشارات العديد من المركبات الكيميائية السامة، ويُعبّر عنه بشكل كبير في الأنسجة الطلائية الحاجزة؛ لذلك فهو مستشعر بيئي لمجموعة متنوعة من الملوثات بما في ذلك PAHs (Carambia and Schuran, 2021; Hammond *et al.*, 2022)، كما إنّه يعمل كمحول للأنزيمات، مثل Cytochrome p450 الذي يستقلب هذه المواد الكيميائية، كما يؤدي دوراً فسيولوجياً متنوع الأوجه كإشارة بيئية أو غذائية أو جرثومية (Kim *et al.*, 2022a).

يقع جين *AhR2* لأسماك الكارب الشائع على الكروموسوم B22، ويحتوي على 11 أكسوناً مفصلاً بـ 10 أنترونات، ويبلغ طوله حوالي 223353 زوج قاعدي يُشفر لبروتين يتكون من (1011) حامض أميني، يبلغ عدد القواعد النيتروجينية في الأكسونات (11، 188، 125، 90، 121، 140،

203، 110، 142، 1798، 894) على التوالي، وعدد القواعد النيروجينية للإنترونات (703، 213498، 1055، 2526، 317، 219، 108، 129، 83، 893) على التوالي (XM_042749540.1)، كما موضح في الشكل (9-2).



شكل (9-2) تركيب جين *Ahr2* في الكارب الشائع، الجزء الملون يمثل الأوكسون، والأرقام تشير إلى عدد القواعد النيروجينية (من تصميم الباحث).

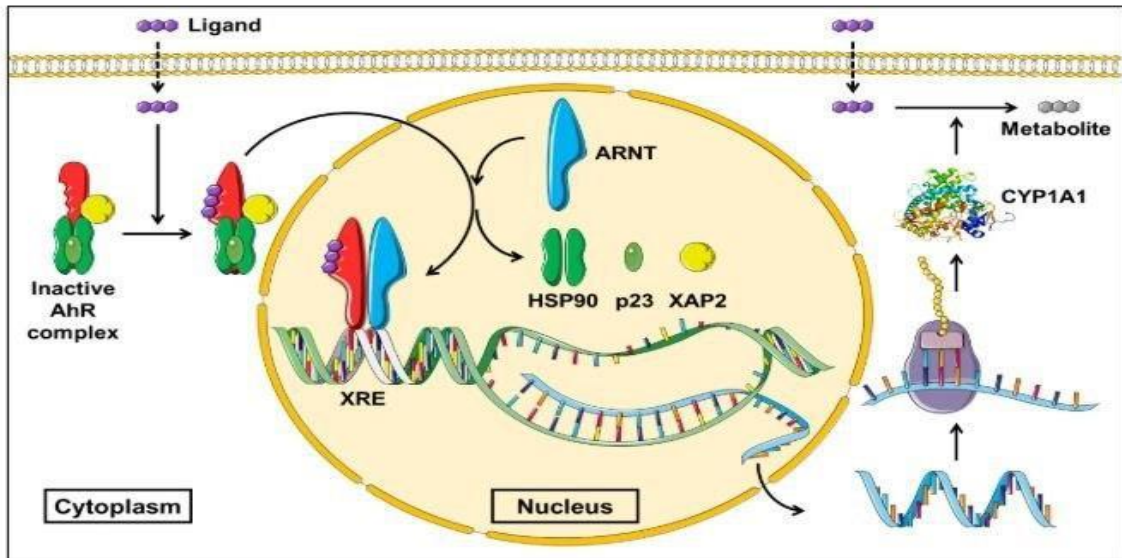
الفرق بين إشارات *Ahr* في الثدييات والأسماك هو إنَّ معظم الثدييات تمتلك جينًا واحدًا في حين إنَّ معظم الأسماك لها العديد من *Ahrs*، تمتلك الأسماك عادة أربعة جينات *Ahrs* زوجين من *Ahr1* وزوجين من *Ahr2* جنبًا إلى جنب، حدث ذلك بسبب ازدواج الجينوم الكامل الخاص بالأسماك والذي حدث منذ ما يقارب 350 مليون سنة (Glasauer and Neuhaus, 2014). يُعد الحفاظ على *Ahr* المتعددة في الأسماك الحديثة أمرًا مهمًا بالنظر إلى إنَّ أكثر من 80% من التكرارات الجينية التي تشكلت في أثناء تكرار الجينوم الكامل الخاص بالأسماك قد فقد فيما بعد، الفرضية السائدة للاحتفاظ بنسخ الجينات أنها أصبحت أكثر تخصصًا من خلال تقسيم الوظائف المتعددة لسلفها المشترك (الوظيفة الفرعية)، لذلك بالإمكان عدّ نماذج الأسماك بمثابة منصة مثالية لدراسة دور *Ahr* في كل من علم وظائف الأعضاء وعلم السموم (Shankar et al., 2020).

لقد ثبت أن *Ahr2* له وظائف هامة في تمايز العديد من عمليات التحسين (التطور) بما فيها تلك المتعلقة بتكوين الدم والجهاز اللمفاوي والخلايا التائية والخلايا الكبدية والخلايا العصبية والخلايا الجذعية المكونة للدم، مؤخرًا تم التعرف على *Ahr2* كمغير حاسم بتفاعلات البيئة المضيفة في الاستجابات المناعية والالتهابية (Gutiérrez-Vázquez and Quintana, 2018).

1.13.2: ميكانيقية عمل AhR2

AhR2 بروتين عصاري خلوي موجود بشكل أساسي في سيتوبلازم الخلايا حيث يوجد مرتبط بالعديد من العوامل المساعدة والبروتينات المرافقة بما في ذلك جزيئتين من بروتين الصدمة الحرارية 90 (Hsp90) Heat shock proteins 90 والجزيء المساعد P23 والبروتين المتفاعل (XAP2) X-associated protein 2 ويعرف أيضًا بـ (AIP) AH-interacting protein (Larigot *et al.*, 1976; Poland *et al.*, 2022)، يبدو أن XAP2 يُساعد في استقرار AhR2 والحفاظ على موقعه في السيتوبلازم ومنع انتشاره وتدهوره، كما إن Hsp90 يُحافظ على AhR في الشكل الذي يزيد من تقاربه مع الروابط (Wright *et al.*, 2017)، يبدو أن P23 يمنع AhR غير المرتبط مع ligand من تكوين ثنائي مع المترجم النووي لمستقبل الهيدروكربون أريل (Ah Receptor (Arnt) Nuclear Translocator، وهو أيضًا عضو في عائلة BHLH-PAS، كما تم افتراض أنه يُعزز حركة AHR المرتبط بـ ligand في النواة (Van Tiem, 2011).

عند ارتباط AhR بالرابط في السيتوبلازم يتم تنشيط AhR وينتقل مجمع AhR/HSP90 إلى النواة، حيث يتم استبدال Hsp90 بالبروتين المترجم Arnt ويتكون ثنائي AhR/Arnt الذي يتعرف على نسخ جينات وينظم عملية النسخ، مثل عائلة CYP450 ومثبط مستقبلات الهيدروكربون أريل (AhRR) عبر عناصر استجابة الهيدروكربون المعروف باسم عناصر الاستجابة للمركبات الغريبة الحيوية (XREs) xenobiotic response element في المناطق التنظيمية للجينات المستهدفة (Shankar *et al.*, 2020)، والشكل (10-2) يوضح ذلك.



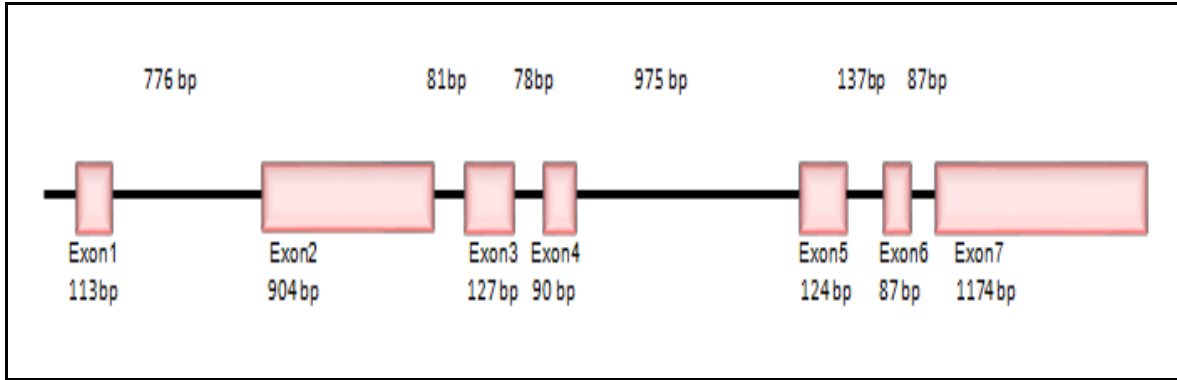
شكل (10-2) : مسار إشارات AhR (El-Ghiaty and El-Kadi, 2021).

14.2: جين السايوكروم (CYP1A)

ينتمي إلى العائلة الإنزيمية Cytochrome p450 التي تمثل فصيلة فائقة متنوعة وظيفيًا من الإنزيمات الأيضية الرئيسية المسؤولة عن العديد من المسارات الأيضية للمركبات الداخلية والخارجية في النباتات والحيوانات والكائنات الحية الدقيقة (Kuban and Daniel, 2021).

تُصنف هذه العائلة إلى عائلات رئيسة وعائلات فرعية بناءً على التطور المتباين وتسلسل الأحماض الأمينية وتمثل هذه العائلة الفائقة، حيث تتكون من أربع فصائل فرعية معروفة من أنواع الفقاريات *CYP1A* و *CYP1B* و *CYP1C* و *CYP1D*، تحتوي الثدييات على جيني *CYP1A* هما *CYP1A1* و *CYP1A2* في حين تحتوي معظم الأسماك على جين واحد هو *CYP1A*، أما جين *CYP1B* فهو واحد في جميع الفقاريات، في الأسماك يوجد نوعان من جينات *CYP1C* هما *CYP1C1* و *CYP1C2* (Tuan et al., 2014).

يقع جين *CYP1A* في سمك الكارب الشائع على الكرموسوم A18 ويحتوي على 7 أكسونات مفصولة بـ 6 أنترونات، ويبلغ طوله 4753 زوج قاعدي يُشفر لبروتين يتكون من 526 حامض أميني. يبلغ عدد القواعد النيتروجينية في الأكسونات (113، 904، 127، 90، 124، 87، 1174) على التوالي، وعدد القواعد النيتروجينية في الأنترونات (776، 81، 78، 975، 137، 87) على التوالي (XM_019064218.2) كما موضح في الشكل (11-2).

شكل (11-2) تركيب جين *CYP1A* في الكارب الشائع (من تصميم الباحث)

CYP1A هو أنزيم أبيض يوجد بشكل رئيسي في الكبد بالإضافة إلى الأنسجة الأخرى خارج الكبد، (Wang et al., 2021b)، وهو أحد أنزيمات المرحلة الأولى من التمثيل الغذائي، حيث يُشارك في الأكسدة الأيضية لعدد لا يُحصى من المركبات الذاتية، وكذلك المركبات الحيوية الغريبة، ونظرًا لدوره الكبير في التمثيل الغذائي، فإن نشاطه يُعتبر حاسمًا في التوازن الفسيولوجي، وكذلك لتعرض الجسم العام للمواد الكيميائية الغريبة، بناءً على ذلك يجب أن يكون لتغير هذا النشاط تأثير

مباشر على وظيفة الجسم الطبيعية وكذلك سلوك الكائنات الحية الغريبة داخل الجسم (El-Ghiaty and El-Kadi, 2021) ، وأثبت أنه أفضل علامة حيوية حساسة للكشف عن تلوث المياه (Andleeb *et al.*, 2022)؛ بسبب حساسيته لمعدلات منخفضة للغاية من الملوثات التي لا يمكن الكشف عنها بأي تقنية معملية أخرى (Fatima and Ahmad, 2006).

إنَّ تحفيز *CYP1A* الكبدي في الأسماك بفئات معينة من الملوثات يعمل كنظام إنذار مبكر واستجابة حيوية الأكثر حساسية لتحديد مستويات التلوث البيئي، ذلك له تأثير على تناول الأسماك وكذلك صحة الكائنات المائية، فهو نظام مُراقب بإحكام يُستخدم للقضاء على المواد الكيميائية من الجسم، وإنَّ دوره في إزالة السموم يجعل الإنزيم مفيداً في البيئات الملوثة (Andleeb *et al.*, 2022). في السنوات الأخيرة أصبح من الواضح أنه محور *AhR- CYP1A* مهم للتوازن الفسيولوجي عن طريق تنظيم عملية التمثيل الغذائي للعديد من الركائز الذاتية، مثل الهرمونات الجنسية والهرمونات الأمينية والأحماض الدهنية والليبيدات والفوسفاتية والفيتامينات (Lu *et al.*, 2020).

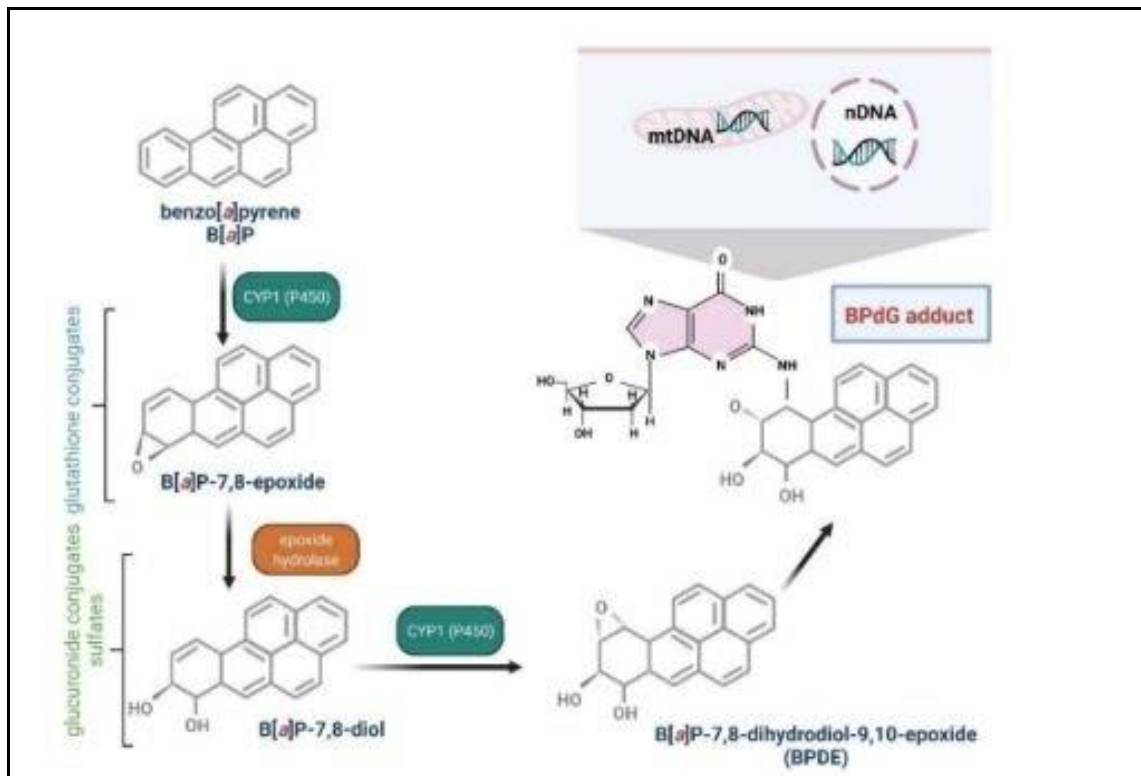
فيما يتعلق بالملوثات البيئية، تشمل الآثار الضارة للتعرض لروابط *AhR* البيئية المستمرة: الاضطرابات الإنجابية والنمائية، و قمع المناعة، وكذلك التنشيط الأيضي للمواد المسببة للسرطان والمطفرات، جميع هذه النتائج السلبية لها تعبير ونشاط *CYP1A* كآلية رئيسية للعمل (Reed *et al.*, 2018) علاوة على ذلك، كمؤشر على نشاط *AhR*، فإنَّ التعبير عن بروتين *CYP1A* ونشاطه الإنزيمي هي مؤشرات حيوية روتينية للتعرض لروابط *AhR* البيئية في الأنواع البيئية وبالمثل، فإنَّ انخفاض تعبير *CYP1A* في الأسماك أثناء التعرض لروابط *AhR* البيئية المعروفة هو مؤشر رئيسي للتكيف مع الملوثات في الموقع (Anderson *et al.*, 2022; Bello *et al.*, 2001).

1.14.2: ميكانيكية عمل *CYP1A*

يُشارك *CYP1A* في المرحلة الأولى من أيض مركبات PAHs، إذ يُضيف لها ذرة أوكسجين، مما يسمح للذوبان في الماء، يليه إفرازه من الجسم، ومع ذلك يُمكنه أيضًا أيض هذه السموم إلى شكلها المطفر، وبالتالي يُؤدي إلى تكوين الورم ومضاعفات أخرى داخل الأسماك (Williams *et al.*, 2022). على سبيل المثال يُمكن لـ *CYP1A* تحويل B(a)P إلى B(a)P-7,8-epoxide وهذا يُعد واحدًا من أخطر التفاعلات كونه ينتج مستقلبات سامة، ومن المثير للاهتمام إن أكسدة B(a)P في الموضعين 4 و5 تُؤدي إلى تكوين مُستقلب غير نشط يتخلص منه الكائن الحي (Bukowska, 2015) في حال B(a)P-7,8-epoxide يتحول بوجود epoxide hydrolase إلى B(a)P-7,8-

diol الذي يمثل ركيزة لتفاعل الأكسدة الثانية المعتمدة على CYP1A والتي تشكل B(a)P- 7,8- dihydrodiol-9,10 epoxide (BPDE) الذي يكون قادرًا على التفاعل مع DNA guanine وينتج عنه معقدات مع الـ DNA التي تؤدي إلى التضاعف الخاطئ والطفرات (Bukowska *et al.*, 2022) كما في الشكل (12-2).

يُقلل تعبير CYP1A المنخفض من احتمالية حدوث هذه الآثار السلبية وبالتالي يزيد من احتمالية بقاء الأسماك في بيئة ملوثة (Williams *et al.*, 2022)



الشكل (12-2) يوضح ميكانيكية عمل CYP1A في التمثيل الغذائي لـ B(a)P (Bukowska *et al.*, 2022).

الفصل الثالث

المواد وطرائق العمل

Materials and Methods

Collection of Samples

1.3: جمع العينات

تم جلب 60 سمكة كارب شائع من أحد المفاقر المحلية في قضاء المشرح أحد أقضية محافظة ميسان، (متوسط الوزن 35 غم/ سمكة) وتم نقلها إلى حوض ومعالجتها بمحلول ملحي (NaCl) بتركيز 0.5% لمدة نصف ساعة لقتل أي طفيليات ممكن تواجدها على الأسماك (Protection, 1997)، وبعدها نُقلت إلى الأحواض المُهيئة للتجربة وامتدت التجربة لمدة 30 يومًا من 2022/11/25 إلى 2022/12/24.

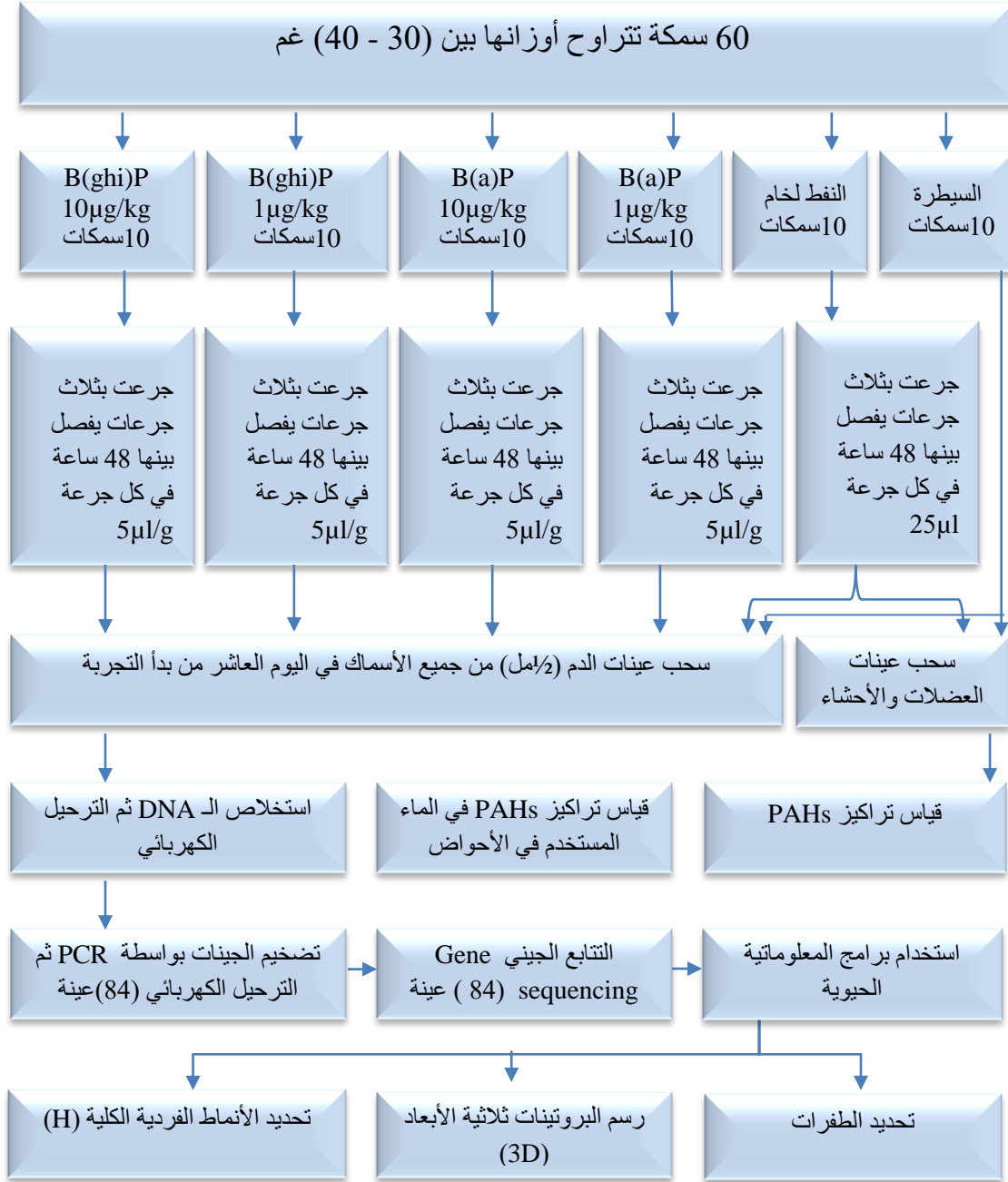
2.3: أحواض التجربة

صُممت أحواض زجاجية أبعادها (60 سم × 30 سم × 30 سم) عدد 6 وبسعة 50 لتر، كما في الصورة (1-3)، زُودت بمضخات تهوية تعمل على مدار 24 ساعة، فضلًا عن مقاييس درجة حرارة، ومُلئت بماء الإسالة منزوع الكلور، وتم استبدال مياهها بنسبة 50% يوميًا بمياه محفوظة في خزان كبير (سعة 1 م³) مُزود بسخان كهربائي منظم بعد ترك الماء لمدة 24 ساعة لضمان إزالة الكلور والحفاظ على درجة حرارة مناسبة لحياة ونمو الأسماك، كما تم الحفاظ على درجة الحرارة بما يقارب 24 ± 1 درجة وذلك بتدفئة الجو مركزياً، وكانت كمية الأوكسجين المذاب ما يقارب 5 ملغم في اللتر وبمعدل إضاءة 12 ساعة في اليوم، ونُظفت الفلاتر مرة واحدة يوميًا، وُعطي كل حوض من الأحواض بغطاء شبكي مستقل لضمان بقاء الأسماك في أحواضها المخصصة وعدم الانتقال إلى الأحواض المجاورة.



صورة (1-3) أحواض التجربة

3.3: تصميم التجربة



مخطط (1-3) أهم الخطوات المتبعة في هذه الدراسة

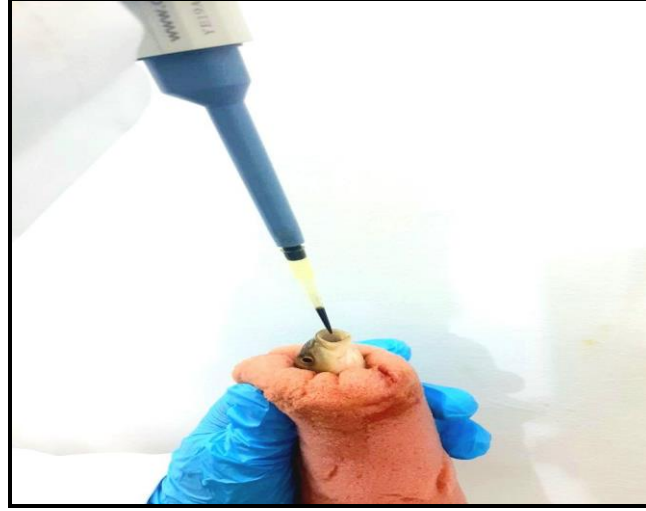
4.3: أقلمة الأسماك ومعالجتها Adaptation of fishes and their treatment

وزعت الأسماك بشكل متساوي وعشوائي على 6 أحواض بواقع 10 فرد لكل حوض، كما في الصورة (2-3) لغرض أقلمتها لمدة أسبوعين إلى ثلاثة أسابيع، تمت تغذيتها بنظام غذاء تجاري يُستخدم لأسماك الزينة بما يعادل 3% من وزن الجسم يوميًا، تم إيقاف التغذية قبل 24 ساعة من بدء التجربة حسب ما ورد عن (Olufayo, 2009)، وبعد انتهاء مدة الأقلمة بدأت عملية التجريع الفموي كما في الصورة (3-3) لكل المجاميع باستثناء مجموعة السيطرة لم تعالج بأي مادة، وحسب الآتي:

1. مجموعة النفط الخام: جُرعت الأسماك ثلاث جرعات يفصل بين جرعة وأخرى 48 ساعة أُعطيت في كل جرعة 25 مايكروليتر من النفط الخام الممزوج بزيت السمك بنسبة 50/50؛ وذلك لتقليل الألم المعوي من النفط الخام وحده (Nadler, 2017).
2. مجموعة B(a)P $\mu\text{g}/\text{kg}$: جُرعت الأسماك بثلاث جرعات يفصل بين جرعة وأخرى 48 ساعة أُعطيت في كل جرعة 5 مايكروليتر لكل غرام من وزن الجسم (Gerger and Weber, 2015).
3. مجموعة B(a)P $10\mu\text{g}/\text{kg}$: جُرعت الأسماك بثلاث جرعات يفصل بين جرعة وأخرى 48 ساعة أُعطيت في كل جرعة 5 مايكروليتر لكل غرام من وزن الجسم (Gerger and Weber, 2015).
4. مجموعة B(ghi)P $1\mu\text{g}/\text{kg}$: جُرعت الأسماك بثلاث جرعات يفصل بين جرعة وأخرى 48 ساعة أُعطيت في كل جرعة 5 مايكروليتر لكل غرام من وزن الجسم.
5. مجموعة B(ghi)P $10\mu\text{g}/\text{kg}$: جُرعت الأسماك بثلاث جرعات يفصل بين جرعة وأخرى 48 ساعة أُعطيت في كل جرعة 5 مايكروليتر لكل غرام من وزن الجسم.



الصورة (2-3) أسماك التجربة.



الصورة (3-3) التجريع الفموي للأسماك.

Blood and organs collection

5.3: جمع عينات الدم والأعضاء

في اليوم العاشر من بداية التجريع تم سحب 1/2 مل دم من الوريد الذيلي، كما في الصورة (4-3) لكل الأسماك البالغ عددها 60 سمكة بواسطة حقنة معقمة سعة 3 مل، ووضعت العينات في أنابيب سعة 2.5 مل مضاف لها مانع تخثر (Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA)، وتم ترقيم الأنابيب الحاوية على الدم، ومن ثم تجميدها عند درجة 18° - مئوية لحين الاستخلاص، كذلك تم فصل عينات النسيج العضلي والأحشاء لإسماك (مجموعة المقارنة والأسماك المعاملة بالنفط الخام)، ثم جُففت بواسطة فرن حراري oven وبعدها طُحنت بواسطة مطحنة كهربائية، ثم نُخلت باستخدام منخل معدني، ووضعت في عبوات زجاجية لحين استخدامها.



صورة (4-3) سحب عينات الدم

6.3: الأجهزة والأدوات والمواد المستعملة في الدراسة

جدول (1-3) الأجهزة والأدوات المستعملة في الدراسة

الشركة (المنشأ)	نوع الجهاز	ت
Sartorius (Germany)	Balance	1 ميزان حساس
Molinox (France)	Moline	2 مطحنة كهربائية
Memmert (Germany)	Oven	3 فرن حراري
Sai Enterprises (India)	جهاز الاستخلاص Soxhlet نوع 6 – 50 D مع جهاز تبريد نوع Julabo F 30 Heraeus	4
Humboldt Mfg (USA)	منخل Sieve Standard قياس 63 Micron	5
GFR(Germany)	جهاز HPLC	6
Indiamart (India)	Thermometer	7 محرار قياس درجة الحرارة
Dragon (China)	Winkler Bottles	8 قنينة ونكلر
GFR(Germany)	جهاز تقطير	9
Sartorius (China)	جهاز التوصيلية الكهربائية Electrical Conductivity Meter	10
WTW (Germany)	PH meter	11
تصنيع محلي	أحواض زجاجية عدد 6	12
Dragon (China)	ماصات أتوماتيكية	13
RS Electrical (China)	مضخات تهوية وترشيح	14
الريان (العراق)	خزان ماء سعة 1م ³	15
Bebo (China)	مضخات ملء وتفريغ ماء الأحواض عدد 2	16
China	شبكة صيد صغيرة	17
Reco (Italy)	سخان ماء كهربائي	18
تصنيع محلي	غطاء بلاستيك مشبك عدد 6	19

الريان (العراق)	أنابيب ماء بلاستيكية	20
Balsan (China)	مكيف هواء (سبلت)	21
Human Lab (Korea)	Biosafety cabinet الكابينة البايولوجية	22
Eppendorf (Germany)	Centrifuge جهاز الطرد المركزي المبرد	23
Hirayama (Japan)	Autoclave جهاز تعقيم	24
Biometra (Germany)	Gel documentation جهاز توثيق الهلامات	25
Bioneer (Korea)	جهاز الترحيل الكهربائي Gel electrophoresis Apparatus	26
Cleaver scientific (UK)	مجهر الطاقة الكهربائية المستمر Electrophoresis constant power supply	27
Binder (USA)	Incubator حاضنة	28
Sartorius (Germany)	ميزان الكتروني حساس Electrical sensitive Balance	29
Shonic (China)	Microwave Oven فرن الموجات الدقيقة	30
CYAN (Belgium)	Vortex جهاز رجاج	31
TECHNE prime(USA)	Thermal cycler المدور الحراري	32
Memmert (Germany)	Water bath حمام مائي	33
Dragon (China)	أطراف ماصة ميكروية Automatic Micropipettes	34
Promega (USA)	Eppendorf tube أنابيب أبندورف	35

جدول (2-3) المواد المستخدمة في الدراسة

الشركة (المنشأ)	المواد الكيميائية	ت
Shanghai Macklin Biochemical (China)	Benzo (a) pyrene	1
Shanghai Macklin Biochemical(China)	Benzo(ghi) perylene	2

Alpha Chemika (India)	Chloroform	الكلوروفورم	3
TOMAS BAKER (India)	Alumina Mesh 100-200	الالومينا	4
Alpha Chemika (India)	Benzen	البنزين	5
مجهز في المختبر	Distilled water	ماء مقطر	6
مجهز من شركة نفط ميسان	Crude oil	نفط خام	7
Oxford labchem (India)	KOH	هيدروكسيد البوتاسيوم	8
Merck (Germany)	Glass woo	صوف الزجاج	9
Alpha Chemika (India)	N-hexane	الهكسان الاعتيادي	10
Merck(Germany)	Thimble	كشتبان الاستخلاص	11
Alpha Chemika (India)	Methanol	الميثانول	12
Alpha Chemika (India)	Silica gel Mesh 100-200	سليكا جل	13
Alpha Chemika (India)	Sodium Anhydrate Na ₂ SO ₄	كبريتات الصوديوم اللامائية	14
Thomas baker(India)	MnSO ₄	كبريتات المنغنيز	15
Gainland Company	H ₂ SO ₄	حامض الكبريتيك المركز	16
Alpha Chemika (India)	KI	يودات البوتاسيوم	17
SIGMA	Na ₂ S ₂ O ₃	ثايوسلفات الصوديوم	18
Alpha Chemika (India)	Dimethyl sulfoxide (DMSO)		19
Oxiod	NaCl		20
-		محلول النشأ	21
Mera pharma (Poland)		زيت السمك	22
Geneaid (Taiwan)	gSYNC™ DNA Extraction Kit		23
Monlinex (China)	Agarose	الأكاروز	24
Jeitech (Korea)	Laminar flow cabinet	كحول الايثانول المطلق	25

Bioneer (Korea)	Buffer solution(TAE 10X) المحلول المنظم	26
Bioneer (Korea)	Diamond™ Nucleic Acid Dye	27
promega (USA)	Loading dye صبغة التحميل	28
Promega (USA)	Deionized water ماء منزوع الأيون	29
Promega (USA)	DNA Ladder (100)bp معلم الحجم	30
Macrogen (Korea)	Primers البادئات	31
Promega (USA)	GoTaq® Green Master Mix عدة تفاعل البلمرة	32

7.3: تحضير مركبات المعالجة Preparation of treatment compounds

تم الحصول على مركبي Benzo (a) pyrene و Benzo(ghi) perylene، بوزن 500 ملغم و 250 ملغم على التوالي من شركة Shanghai Macklin Biochemical الصينية، خُففت بمادة Dimethyl sulfoxide (DMSO) وُخُلِطت جيدًا باستعمال جهاز المازج Vortex لضمان إذابتها لتكوين محاليل بتركيزي (1 و 10 µg/kg) لكل منهما (Gerger and Weber, 2015)، وُخِفِظَت العينات في علب زجاجية لحين بدء عملية معالجة الأسماك، كما تم الحصول على النفط الخام من شركة نفط ميسان ومُزج مع زيت السمك بنسبة 50/50 بواسطة الجهاز المازج Vortex (Nadler, 2017).

8.3: قياس الأوكسجين المذاب Dissolved oxygen measurement

أُتُبِعَت طريقة تحور الأزيد Azid Modification لطريقة ونكلر (APHA, 2003)

لتحديد كمية الأوكسجين المذاب في المياه وحسب الخطوات التالية:

1. ملء قنينة ونكلر (250سم³) بالماء المراد فحصه وعند وضع غطاء القنينة الزجاجي سُمِحَ للماء أن يُزاح منها لطرده أي حجم للهواء الذي يكون موجودًا فيها مع ضرورة تجنب الإبقاء على أي فقاعة داخلها.
2. أُضِيفَ 1سم³ من كبريتات المنغنيز بواسطة ماصة (حجم 1 سم³) وتم التأكد من ملامسة نهايتها فُعِرَ القنينة.
3. أُضِيفَ 1سم³ من محلول اليوديد القاعدي.

4. سُدت فوهة القنينة بالسداد بشكل محكم ورُجبت بشكل جيد وُخِطت المحتويات خلطاً مُتجانساً وثُرُكت لمدة عشر دقائق إلى أن تكون راسب بُني وانفصل بشكل جيد عن بقية المحتويات.
5. أُضيفَ 1سم³ من H₂SO₄ المركز، ثم سُدت القنينة بأحكام ورُجبت بصورة جيدة إلى أن ذاب الراسب وتكون محلول رائق ذو لون برتقالي.
6. أُخذت عينة من القنينة بحجم 50 مل ووضعت في Conical Flask ثم سُحبت بثايوسلفات الصوديوم Na₂S₂O₃ إلى أن تغير لون المحلول إلى برتقالي فاتح.
7. أُضيفت قطرات من محلول النشأ وعند ظهور اللون الأزرق تم التسحيح مرة أخرى، استمر التسحيح إلى أن اختفى اللون الأزرق وسُجل حجم Na₂S₂O₃ المُستخدم قبل إضافة النشأ وبعده، ثم حُسبت كمية الأوكسجين المذاب من المعادلة التالية:

$$\text{كمية الأوكسجين المذاب (DO) ملغم/لتر} = \frac{\text{حجم } Na_2S_2O_3 \text{ المسححة} \times 100}{\text{حجم العينة}}$$

9.3: استخلاص الهيدروكربونات النفطية من المياه

Extraction of hydrocarbon compounds From water

- أُعدت طريقة (1989) UNEP الموصوفة من قبل برنامج الأمم المتحدة في استخلاص المركبات الهيدروكربونية من المياه كما يلي:
1. أُضيفَ 10 مل من الكلوروفورم لكل لتر من العينة ورُجبت جيداً لمدة نصف ساعة، ثم تُركت لفترة معينة لحين استقرارها.
 2. نُقلت المحتويات إلى قمع فصل بعد رجها حيث انفصلت الطبقة العضوية بسهولة عن الماء؛ لكونها أثقل منه.
 3. أُخذت الطبقة السفلى الحاوية على المركبات الهيدروكربونية ومُررت على عمود فصل يحتوي على صوف زجاجي في أسفله وتعلوه طبقة من كبريتات الصوديوم الامائية Na₂SO₄ لضمان التخلص من الماء في العينة، وُجمعت في دورق زجاجي وثُرُكت لحين الجفاف.
 4. أُذيبت هذه المركبات بـ 50 مل من الهكسان الاعتيادي، ومُررت على عمود فصل معبأ بالصوف الزجاجي في الأسفل، ثم طبقة من السليكا جل وطبقة من الامومينيا وطبقة من كبريتات

الصوديوم اللامائية ومُررت على العمود، ثم جُمعت في بيكر زجاجي للحصول على الجزء الأليفاتي.

5. أُضيف 30 مل من البنزين إلى نفس العمود وجمعت العينة للحصول على الجزء الأروماتي.
6. وضعت العينات في عبوة زجاجية مُعتمة ومُعقمة لتصبح جاهزة للقراءة باستخدام جهاز (HPLC) High performance liquid chromatography لتقدير مركبات PAHs في مركز علوم البحار/ جامعة البصرة.

10.3: استخلاص الهيدروكربونات النفطية من أنسجة الأسماك

Extraction of hydrocarbon compounds from tissues of fish

أتبعت طريقة (Grimalt and Olivé (1993) لاستخلاص الهيدروكربونات النفطية من أنسجة الأسماك المدروسة وحسب الخطوات التالية:

1. أخذ 5 غرام من عينات الأسماك المجففة والمطحونة ووضعت في جهاز الاستخلاص.
2. أُضيف لها خليط من الميثانول: البنزين (1:1)، وأُجريت عملية الاستخلاص المتقطع لمدة 24 - 36 ساعة على درجة حرارة 35 مئوية.
3. أُجريت عملية الصوبنة للمستخلص بإضافة المحلول المائي لهيدروكسيد البوتاسيوم الميثانولي ولمدة ساعتين وبدرجة حرارة 40 مئوية.
4. تُرك المستخلص لكي يبرد، ثم نُقل إلى قمع الفصل وأُضيف 50 مل من الهكسان الاعتيادي ورجت العينة بقوة وتُركت للاستقرار ولُوحظ تكون طبقتين طبقة مصوبنة وطبقة غير مصوبنة تحتوي على الهيدروكربونات المذابة في الهكسان.
5. مُررت العينات على عمود الفصل كروماتوغرافي المكون من صوف الزجاج في الأسفل تعلوه طبقة من السليكا جل وطبقة من الألومينا، ثم طبقة من كبريتات الصوديوم اللامائية للحصول على الجزء الأليفاتي.
6. أُضيف 30 مل من البنزين للحصول على الجزء الأروماتي، ثم وضعت في عبوات زجاجية صغيرة معتمة ومُعقمة لتصبح جاهزة للقراءة بواسطة جهاز HPLC لتقدير مركبات PAHs.

11.3: استخلاص الحامض النووي DNA من دم الأسماك باستخدام**(gSYNC™ DNA Extraction Kit)**

1. أُذيبت عينات الدم المأخوذة من الأسماك (المجمدة مسبقاً)، ثم مُزجت بواسطة جهاز الرجّاج Vortex لدقيقة واحدة.
2. أُخذ 10 مايكروليتر من الدم بواسطة ماصة دقيقة (micro pipette)، ووضعت في أنبوب أبندورف سعة 1.5 مل بعد تعليمه.
3. أُضيف 190 مايكروليتر من محلول Phosphate buffered saline (PBS).
4. أُضيف 20 مايكروليتر من Proteinase K بتركيز (20mg/ml).
5. مُزجت العينات بواسطة جهاز المازج الهزاز (Vortex) وحُضنت لمدة 10 دقائق في الحمام المائي بدرجة 60 م مع التقليب الهادئ كل دقيقتين.
6. أُضيف 200 مايكروليتر من محلول Genomic lysis / Gel Sample Buffer (GSB) Binding buffer وُزجت بجهاز المازج لمدة دقيقة واحدة، ثم حُضنت لمدة 10 دقائق في الحمام المائي بدرجة 60 م مع التقليب الهادئ كل دقيقتين.
7. أُضيف 100 مايكروليتر من Ethanol Absolute تركيز 100%، ثم رُجت بجهاز المازج لمدة دقيقة واحدة.
8. أُخذ أنبوب ترشيح GS column ورقم بأرقام عينات الدم المأخوذة، ثم وُضع داخل أنبوب الجمع (Collection tube) وبعدها أُضيف الخليط إلى أنبوب الترشيح ومن، ثم وُضع بجهاز الطرد المركزي 14000 دورة/دقيقة وتم التخلص من الراشح.
9. أُضيف 400 مايكروليتر محلول Wash Buffer1 مع طرد مركزي 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية، ثم نُزع الأنبوب الجامع والتخلص من الراشح.
10. أُضيف 600 مايكروليتر من محلول Wash Buffer 2 مع طرد مركزي 14000 دورة/دقيقة لمدة 30 ثانية، ثم نُزع الأنبوب الجامع و التخلص من الراشح.
11. وُضع أنابيب الترشيح GS column الموضوعة في أنابيب التجميع في جهاز الطرد المركزي 14000 دورة/دقيقة لمدة ثلاث دقائق لغرض التجفيف.

12. أخذ أنبوب أبندورف جديد سعة 1.5 مل والذي رُقْم مع أرقام العينات المأخوذة ووضع فيه أنبوب الترشيح، ثم أُضيف 200 مايكروليتر من محلول Elution Buffer المخزن مسبقاً على درجة حرارة 60 م، ومن ثم عمل طرد مركزي 14000 دورة/ دقيقة لمدة 30 ثانية.
13. تم نزع أنبوب الترشيح وأهمل وأغلق الأنبوب الحاوي على DNA وحُفظ بالتجميد على درجة -20 لحين إجراء الفحوصات الجزيئية اللاحقة.
- بعد ذلك تم فحص عينات الـ DNA المستخلصة باستخدام الترحيل الكهربائي حيث استخدم هلام الأكاروز بتركيز 1%.

12.3: الكشف عن وجود المادة الوراثية DNA

أُعدت طريقة (Sambrook *et al.*, 2006) للترحيل الكهربائي للكشف عن وجود الـ DNA وحسب الخطوات التالية:

1. أُستخدم المحلول المنظم لـ TAE (Tris Acetate EDTA) ذو تركيز X 10 والمجهز من شركة Bioneer حيث أُضيف لكل 100 مل من المحلول المنظم TAE 900 مل ماء مقطر استخدمت في تجهيز محلول X 1 لتحضير هلام الأكاروز، وكذلك لملء حوض جهاز الترحيل الكهربائي .
2. أُضيف 30 مل من محلول (TAE) ذو تركيز X 1 دورق زجاجي مخروطي يتحمل درجة الحرارة العالية، وأُضيف إليه 0.3 غم من الأكاروز (نسبة الأكاروز 1%)، وغُلقت فوهة الدورق بقطعة من القصدير ووضعت في جهاز (Microwave) لمدة دقيقتين لتسخين المزيج ليصل إلى درجة الغليان و الانتظار حتى تذوب دقائق الأكاروز حتى ينتج محلولاً شفافاً.
3. تُرك المحلول يبرد قليلاً وحُضر القالب الذي يُصب فيه الأكاروز بوضع المشط الخاص لإحداث حُفَر هلام الأكاروز في المكان المخصص لها في طرف الحوض .
4. أُضيف مزيج الأكاروز ليغطي كل مساحة الحوض ومن أجل عدم التسبب بإحداث فقاعات.
5. تُرك المزيج حتى تصلب الأكاروز وأزيل المشط بعناية من دون إحداث تمزق في الهلام.
6. وضع الهلام المستند على الصفيحة في المكان المخصص له داخل جهاز الترحيل الكهربائي.
7. مُلء حوض جهاز الترحيل الكهربائي بالمحلول (TAE) المنظم للحد الذي يَمَلأ حفر التحميل وبالقدر الذي يرتفع فيه منسوب المحلول المنظم عن هلام الأكاروز بحدود 3 ملم.

13.3: تحميل عينات الحامض النووي DNA

مُزجت 4 مايكروليتر من DNA مع 1 مايكروليتر من صبغة التحميل Loading Dye والمجهزة من شركة Promega الأمريكية بالإضافة إلى 1 مايكروليتر من صبغة Diamond™ Nucleic Acid Dye والمخففة بواسطة (TE) Tris EDTA (TE) بنسبة تخفيف (1 مايكروليتر صبغة إلى 100 مايكروليتر من محلول TE) ومُزج الخليط جيدًا باستخدام الماصة الدقيقة Micro pipette على شريط بلاستيكي (Film Laboratory)، ثم حُمِلت العينات إلى داخل حفر هلام الأكاروز المحضر بعد تحميل كل العينات إلى الحفر وضع الغطاء البلاستيكي الشفاف و رُبطت الأقطاب الكهربائية بمزود الطاقة Power Splay باستخدام 70 فولت و85 ملي امبير لمدة نصف ساعة، وتم فحص هلام الأكاروز بعد انتهاء وقت الترحيل باستخدام جهاز UV Gel Documentation وأُخذت صور الترحيل باستخدام الكاميرا المثبتة والمخصصة لهذا الغرض.

14.3: تجهيز البادئات Primers

تم تجهيز البادئات الخاصة بجيني *AhR2* و *CYP1A* على شكل مسحوق مجفد من بادئين مفصولين عن بعضهم كل بادئ منهما موضوع في أنبوب خاص عليه ملصق يبين تسلسل القواعد النايتروجينية وحُضرت البادئات بإضافة 250 مايكروليتر من الماء المقطر DD Water ليصبح البادئ بتركيز 100 بيكومول وهذا يُعتبر Stock Solution، وتم أخذ 10 مايكروليتر منه وأُضيف مرة أخرى 90 مايكروليتر من الماء المقطر DD Water ليصبح تركيز البادئ 10 بيكومول وهو التركيز المطلوب لإجراء تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل والجدول (3-3) يوضح تتابعات البادئات وأحجام القطع والمصادر المعتمدة منها.

جدول (3-3) يوضح البادئات المستخدمة لجيني *AhR2* و *CYP1A*

المصدر	حجم القطعة	تتابعات البادئات (5' → 3')	الجين
الدراسة الحالية >NC 056618.1	665 bp	F: GATATACCCACCCGCACCTG	<i>AhR2</i>
		R: CTTTTAGCTGCCCACTGGA	
Kang et al.,) (2022	503 bp	F: CTGAGCCTGACCGCTATGAG	<i>CYP1A</i>
		R: CCGCTTCCTACGATCTTCCC	

15.3: تفاعل انزيم البلمرة المتسلسل (PCR)

جُهزت المواد الخاصة بتقنية PCR وحُضر مزيج التفاعل في مكان نظيف ومعقم مع مراعاة تعقيم الماصات والاطراف الماصة الميكروية وارتداء القفازات الطبية خلال العمل، حيث تم حل قالب الحامض النووي والبادئات أولاً، ولتحضير حجم تفاعل 25 ميكرو لتر تمت إضافة قالب DNA والبادئات ومادة Master Mix والماء منزوع الأيونات إلى أنابيب الـ PCR، كما مبين في الجدول (4-3).

الجدول (4-3) المواد المستخدمة في تقنية الـ PCR وكمياتها

الحجم النهائي	ماء مقطر	البادئات		قالب DNA تركيز (100 نانوغرام)	Master Mix	المادة الكيميائية
		Reverse	Forward			
25	6	1	1	4	13	الحجم (مايكرو لتر)

ثم دُمجت مكونات انبوبة PCR بشكل مثالي عن طريق تدويرها للأعلى وللأسفل باستخدام ماصة، وبعدها تم طردها بالطرد المركزي لمدة 10 ثوانٍ أو أكثر باستخدام جهاز طرد مركزي صغير، ثم وضعت أنابيب الـ PCR في جهاز المدور الحراري، وضُبِطت درجة الحرارة، ووقت ودرجة حرارة التلدين وبعد معرفة درجة الحرارة المثالية لعمل كل بادئ، وثقت مع عدد الدورات، كما موضح في الجدول (5-3).

الجدول (5-3) برنامج تضخيم جيني *Ahr2* و *CYP1A* في تقنية الـ PCR

عدد الدورات	الوقت (دقائق)	درجات الحرارة	المراحل
1	5	95°C	المسخ الأولي Initial Denaturation
35	0.30	95°C	المسخ Denaturation
	0.45	55 C°	الالتحام Annealing
	0.45	72C°	الاستطالة Extension

1	10	72C°	Final Extension	الاستطالة النهائية
—	—	4C°	Final hold	الحرارة النهائية

16.3: التحري عن ناتج PCR

تم تحضير هلام الأكاروز بنفس خطوات الفقرة (12.3) التي رُحلت بها مادة الحامض النووي DNA للعينات لكن تركيز الأكاروز المحضر لترحيل عينات ناتج PCR يكون 1.5% حيث أُضيف 0.45 غم من الأكاروز إلى 30 مل من محلول TAE ذو تركيز X1 ، حُمِل 5 مايكروليتر من منتج PCR مع 2 مايكروليتر من صبغة Diamond™ Nucleic Acid Dye المخففة إلى كل حفرة على هلام الأكاروز وأُستخدمت حفرة معلمة لتحميل 5 مايكرو ليتر من (DNA Ladder) مع الصبغة وضُبط برنامج الترحيل باستخدام 70 فولت و 85 ملي أمبير لمدة 45 دقيقة وبعد انتهاء عملية الترحيل لناتج PCR تم أخذ صور باستخدام جهاز UV Gel Documentation للتأكد من نجاح التضخيم ولمعرفة حجم الحزم في هلام الأكاروز.

17.3: تحليل تسلسل القواعد النيوكليوتيدية للDNA Sequencing

بعد التأكد من حجم ناتج PCR المتخصص للجين المدروس بمقارنته مع شريط DNA القياسي DNA Ladder ،أُرسل 20 مايكروليتر لكل عينة من منتج PCR إلى شركة Macrogen الكورية، حيث أُجريت للعينات تنقية وبعدها عملية تحليل تسلسل القواعد باستخدام تقنية Sanger sequencing ، وأُستلمت نتائج تسلسل القواعد وحُللت باستخدام أدوات BLAST بموقع البنك الجيني الدولي NCBI مع استخدام بعض برامج المعلومات الحيوية Bioinformatics.

18.3: التنوع الوراثي Genetic diversity

جرى اصطفاف Alignment التسلسلات ومحاذاتها باستخدام برنامج BioEdit، وحُسب كل من عدد المواقع Number of site والأنماط الفردية (H) Haplotype والتشكل الوراثي Number of polymorphic (NH) وتنوع النمط الفردي (HD) Haplotype diversity وتنوع النيوكليوتيدات (Nucleotide diversity (π)) باستخدام برنامج (DnaSP v5.10).

19.3: شبكة الأنماط الفردية Haplotypes network

رُسمت شبكة الأنماط الفردية وفقاً إلى خوارزمية وسيط الارتباطات (Median Joining (MJ باستخدام برنامج Network 5.0.0.0 (Bandelt *et al.*, 1999)، حيث إنَّ كل تسلسل محدد من الحامض النووي المشاهد في العشيرة يُعرف بأنه نمط فردي (Budowle *et al.*, 2003). تتجمع الأنماط الفردية المتشابهة وتكون على شكل شبكة، ويُشار إلى مجموعة الأنماط الفردية المشتركة في الطفرات الشائعة باسم مجموعة الأنماط الفردية Haplogroup (Behar *et al.*, 2008).

20.3: رسم البروتين ثلاثي الأبعاد Three dimension protein

رُسم البروتين الثلاثي الأبعاد حسب الخطوات الآتية:

1. حُولت تتابعات الـ DNA بصيغة FASTA إلى تتابعات أحماض أمينية بنفس الصيغة باستخدام برنامج blast في موقع NCBI على شبكة الانترنت.
2. أُستخدم برنامج PHYRE2 V.2.0 لتحويل تتابعات الأحماض الأمينية من صيغة FASTA إلى صيغة PDB مع التنبؤ بشكل البروتين ثلاثي الأبعاد في وقت يتراوح بين (2 - 6 ساعة) (Kelley *et al.*, 2015).
3. أُستخدم برنامج EzMol V.1.22 لرسم أشكال البروتين ثلاثية الأبعاد وتحديد مكان تغير الطفرة الوراثية على البروتين (Reynolds *et al.*, 2018).

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1.4: العوامل البيئية لمياه الأحواض

قيست بعض العوامل البيئية في أثناء مدة التجربة، إذ تراوحت درجة حرارة مياه الأحواض بين 23 - 25 م°، كما سُجلت قيم متقاربة جدًا للأوكسجين المذاب في أحواض تربية الأسماك كافة طيلة مدة التجربة تتراوح بين 5-5.2 ملغم/ لتر وهي كمية مناسبة لنمو الكارب الشائع حسب ما ورد عن Peteri, (2004)، وكانت قيم الأس الهيدروجيني ما يقارب 7.1 و متوسط قيم المواد الصلبة الذائبة الكلية 602 ملغم/لتر، أن هذه المديات تقع ضمن المستويات الآمنة لنمو وبقاء الكارب الشائع، أظهرت نتائج هذه الدراسة قيم متوسطة للأوكسجين المذاب في المياه المدروسة، حيث من المتعارف إن درجات الحرارة المنخفضة في فصل الشتاء (وقت التجربة) تسبب زيادة ذوبان الغاز من جهة وانخفاض مستوى تحلل الفضلات العضوية من جهة أخرى، إلا إن صغر الأحواض وعدم وجود النباتات فيها حد من زيادة الأوكسجين المذاب فوق القيم المسجلة (Alshaaban and Al-Hejuje, 2021)، يُعزى تشابه قيم الأوكسجين المذاب في الأحواض كافة إلى الظروف الموحدة لها من درجة الحرارة والتهوية وتبديل الماء والتنظيف اليومي للفلاتر.

2.4: تراكيز مركبات PAHs في الماء وأنسجة الأسماك لمجموعي النفط الخام والسيطرة

يبين الجدول (1-4) تراكيز مركبات PAHs في ماء الإسالة المستعمل في تربية الأسماك حيث أظهرت النتائج خلو عينات الماء من هذه المركبات باستثناء الـ Phenanthrene، كما تبين خلو أنسجة العضلات والأحشاء لمجموعة السيطرة من هذه المركبات، بينما تم الكشف عن وجود 6 مركبات في أنسجة العضلات و 11 مركبًا في أنسجة الأحشاء لأسماك مجموعة النفط الخام من أصل 16 مركبًا مسجلة كملوثات ذات أولوية من قبل وكالة حماية البيئة الأمريكية (USEPA)، وكانت التراكيز الكلية لـ PAHs (182.299 و 525.765 ng/g d.w) في أنسجة العضلات والأحشاء على التوالي.

جدول (1-4) تراكيز مركبات PAHs في الماء (ng/l) و أنسجة العضلات والأحشاء (ng/g d.w) للأسماك المعرضة النفط الخام و مجموعة السيطرة.

أسماء العينات					اسم المركب
ماء ng/l	النفط الخام ng/g		السيطرة ng/g		
	أحشاء	عضلات	أحشاء	عضلات	
0	1.395	40.697	ND	ND	Naphtalene*
0	0	63.749	ND	ND	Acenaphthylene*
0	97.909	0	ND	ND	Acenaphthene*
0	0	4.539	ND	ND	Fluorene*
5.531	58.533	0	ND	ND	Phenanthrene**
0	0	0	ND	ND	Anthracene**
0	0	0	ND	ND	Fluoranthene**
0	1.397	0	ND	ND	Pyrene**
0	122.275	0	ND	ND	Benzo[a]anthracene**
0	3.114	0	ND	ND	Chrysene**
0	4.754	0	ND	ND	Benzo[b]fluoranthene**
0	0	49.937	ND	ND	Benzo[k]fluoranthene**
0	2.946	23.149	ND	ND	Benzo[a]pyrene**
0	22.249	0	ND	ND	Dibenzo[a,h]anthracene**
0	6.491	0.228	ND	ND	Benzo[g,h,i]perylene**
0	204.702	0	ND	ND	Indeno[1,2,3-c,d]pyrene**
5.531	525.765	182.299	-	-	المجموع

N.D: لم يتم الكشف عنها، *: ذات وزن جزيئي واطئ، **: ذات وزن جزيئي عالي

بيّنت النتائج أنّ التراكيز الكلية لـ PAHs في العضلات أقلّ عمومًا من تلك التي تم الحصول عليها في الأحشاء، ويُفسر ذلك بالدور الفسيولوجي المهم الذي تؤديه أنسجة الأحشاء في امتصاص ومعالجة نفايات الجسم، مثل إزالة السموم من المستقلبات الذاتية والملوثات المشتقة من الغذاء بعملية التمثيل الغذائي في الأسماك (Murtala *et al.*, 2012; Triebkorn *et al.*, 1997)، هذا التراكم العالي في الأحشاء الداخلية يتوافق مع النتائج التي تم الحصول عليها في دراسات أخرى (Bandowe *et al.*, 2014; Hellou and Warren, 1997; Xu *et al.*, 2011)، بالإضافة إلى

ذلك يُمكن التحكم في اختلاف محتويات هذه المركبات في الأعضاء من خلال الخواص الفيزيائية والكيميائية لهذه المركبات ومحتويات الدهون والقدرة الأيضية لكل عضو (Xu *et al.*, 2011)، كما أوضحت النتائج المسجلة وجود 6 مركبات من PAHs في أنسجة العضلات (3) منها ذات أوزان جزيئية واطئة و (3) ذات أوزان جزيئية عالية، كما تبيّن وجود 11 مركبًا في أنسجة الأحشاء (3) منها ذات وزن جزيئي واطئ و (8) من ذات الأوزان الجزيئية العالية وكانت تراكيز PAHs-LMW في أنسجة العضلات والأحشاء معًا (266.822 ng/g d.w) أما تراكيز PAHs-HMW ، فكانت (441.242 ng/g d.w) يتضح من ذلك سيادة كبيرة للمركبات ذات الأوزان الجزيئية العالية، ويعود السبب في ذلك إلى أنّ الأسماك تمتلك قدرة عالية على استقلاب مركبات PAHs ذات الوزن الجزيئي الواطئ مقارنة بذات الوزن الجزيئي العالي (Al-Khion *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2006). وقد يُعزى غياب الكشف عن مركبي Anthracene و Fluoranthene في عينات الأسماك إلى التبخر السريع و التحول الأحيائي (Biotransformation) (Deb *et al.*, 2000). كما أظهرت النتائج أنّ مجموع تراكيز B(a)P في أنسجة العضلات والأحشاء كانت (26.095 ng/g d.w)، بينما مجموع التراكيز لـ B(ghi)P (6.719 ng/g d.w) ، قد يُعزى ذلك إلى اختلاف تركيزي هذين المركبين في تركيب النفط الخام المستخدم في تجريع أسماك التجربة (Silverio and Szklo, 2012).

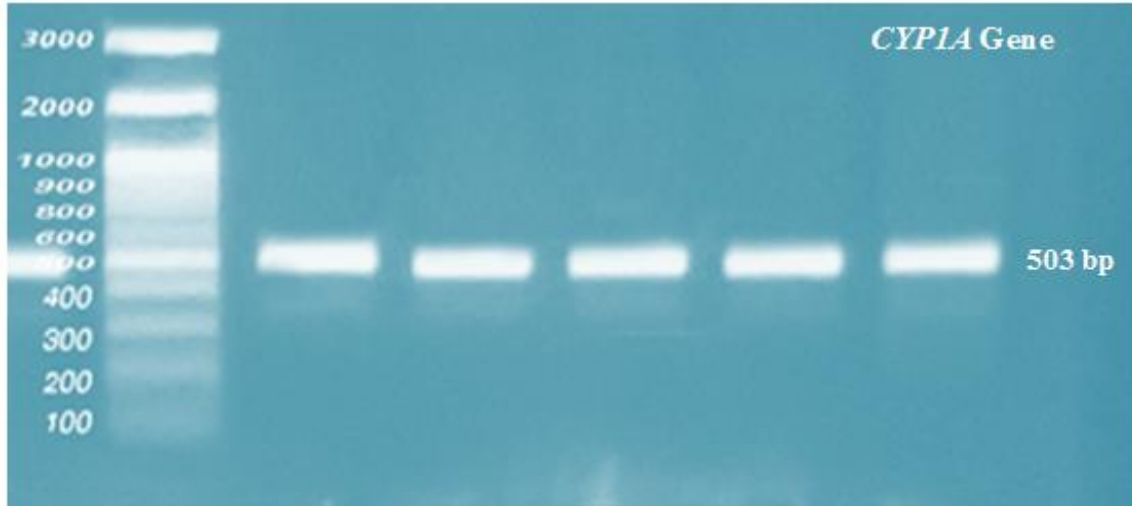
بيّنت النتائج وفرة مركب Phenanthrene في عينات ماء الإسالة المستخدم في أحواض تربية الأسماك، قد يرتبط ذلك بوفرة إطلاق نفايات الوقود وزيوت المحركات في المياه من المصانع القريبة بالإضافة إلى الترسيب الجوي لغازات عوادم السيارات التي تجرفها الأمطار إلى المسطحات المائية (Ouro-Sama *et al.*, 2023)، لوحظت هذه الوفرة أيضًا في دراسات أخرى لـ (Akhbarizadeh *et al.*, 2019; Bandowe *et al.*, 2014; Cheung *et al.*, 2007).

3.4: استخلاص وتضخيم الحامض النووي منقوص الأوكسجين DNA

بيّنت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكرورز بتركيز 1% نجاح عملية تضخيم الـ DNA، كما بيّنت نتائج الترحيل الكهربائي على هلام الأكرورز بتركيز 1.5% نجاح عملية تضخيم الـ PCR لجيني *Ahr2* و *CYP1A* إذ أعطى البادىء *Ahr2* حزمة بحجم 665 زوج قاعدي وأعطى البادىء *CYP1A* حزمة بحجم 503 زوج قاعدي كما في الصورتين (1-4) و(2-4)، وتبيّن الملاحق (5 و6) نتائج تحليل التسلسلات للجينين المدروسين.



صورة (1-4) الترحيل الكهربائي لمنتج PCR لجين *Ahr2* بحجم (665 زوج قاعدي) باستخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5% بمقدار فولتية 70 فولت و85 ملي أمبير.



صورة (2-4) الترحيل الكهربائي لمنتج PCR لجين *CYP1A* بحجم (503 زوج قاعدي) باستخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5% بمقدار فولتية 70 فولت و85 ملي أمبير.

4.4: تسجيل تتابعات الجينات المدروسة (*Ahr2* و *CYP1A*) في بنوك الجينات العالمية NCBI و DDBJ و EMBL

لغرض توثيق تسلسلات الجينات المدروسة ولكي يتمكن أي باحث من الاستفادة منها أو المقارنة بها تم تسجيل بعض تتابعات الجينين المدروسين، والتي تم الحصول عليها بتقنية تحليل التتابع للقواعد النروجينية وبرامج المعلوماتية الحيوية التي شملت منطقة الأوكسون العاشر لجين *Ahr2* و الأوكسون الثاني لجين *CYP1A*، إذ تم تسجيلها في بنك الجينات الياباني (DDBJ) DNA Data Bank of Japan وبنك الجينات الأمريكي (المركز الوطني لمعلومات التكنولوجيا الحيوية) National Center for Biotechnology Information (NCBI) وبنك الجينات الأوروبي (مختبر البيولوجيا الجزيئي الأوروبي) European Molecular Biology Laboratory (EMBL)

جدول (2-4) أرقام انضمام تتابعات الجينات *Ahr2* و *CYP1A* في بنوك الجينات العالمية DDBJ و NCBI و EMBL

الجين	موقع الجزء المدروس	حجم القطعة	رقم الانضمام
<i>Ahr2</i>	الأوكسون 10	560 bp	LC768696
			LC768697
			LC768698
			LC768699
			LC768700
<i>CYP1A</i>	الأوكسون 2	450 bp	LC768701
			LC768702
			LC768703
			LC768704
			LC768705

5.4: التنوع الوراثي Genetic diversity

1.5.4: التنوع الوراثي لجين *Ahr2*

يبين الجدول (3-4) نتائج التنوع الوراثي لجين *Ahr2* إذ أظهرت نتائج مجموعة النفط الخام أنّ عدد المواقع 560 زوجاً قاعدياً وعدد الأنماط الفردية الكلية (H) 4 نتج عنها 10 تشكيلات وراثية (NH) وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.818 و 0.00731 على التوالي، أما مجموعة B(a)P 1µg/kg فكان عدد المواقع 560 زوجاً قاعدياً وعدد الأنماط الفردية الكلية (H) 4 نتج عنها 11 تشكلاً وراثياً (NH) وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم

تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.8181 و 0.00877 على التوالي، و أما مجموعة B(a)P 10 μ g/kg فكان عدد المواقع 560 زوجًا قاعديًا وعدد الأنماط الفردية الكلية (H) 4 نتج عنها 13 تشكلاً وراثيًا (NH)، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.819 و 0.00974 على التوالي، أما مجموعة B(ghi)P 1 μ g/kg فكان عدد المواقع 560 زوجًا قاعديًا وكان عدد الأنماط الفردية الكلية (H) 4 نتج عنها 4 تشكلات وراثية (NH) وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.818 و 0.00317 على التوالي، كما أظهرت نتائج التنوع الوراثي لمجموعة B(ghi)P 10 μ g/kg أن عدد المواقع 560 زوجًا قاعديًا وكان عدد الأنماط الفردية الكلية (H) 4 نتج عنها 4 تشكلات وراثية (NH) وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.818 و 0.00317 على التوالي، أما مجموعة السيطرة، فلم تظهر أي تغيير في تسلسل القواعد النيتروجينية.

جدول (3-4) التنوع الوراثي لجين *Ahr2* بين مجاميع الأسماك المعاملة بالنفط الخام وبمركبي B(a)P و B(ghi)P بتركيزي (1, 10 μ g/kg) لكل مركب.

المركب	السيطرة	نفط خام	B(a)P 1 μ g/kg	B(a)P 10 μ g/kg	B(ghi)P 1 μ g/kg	B(ghi)P 10 μ g/kg	الكلبي
عدد المواقع Number of site	560	560	560	560	560	560	560
النمط الفردي Haplotype (H)	1	4	4	4	4	4	13
عدد التشكلات الوراثية Number of polymorphic (NH)	1	10	11	13	4	4	29
تنوع النمط الفردي Haplotype diversity (HD)	0	0.818	0.8181	0.819	0.818	0.818	0.818
تنوع النيوكليوتيدات Nucleotide diversity (π)	0	0.00731	0.00877	0.00974	0.00317	0.00317	0.00781

2.5.4: التنوع الوراثي لجين *CYP1A*

يبين الجدول (4-4) نتائج التنوع الوراثي لجين *CYP1A* إذ أظهرت مجموعة $B(a)P$ $1\mu g/kg$ أن عدد المواقع 449 زوجًا قاعديًا وعدد الأنماط الفردية الكلية (H) 5 نتج عنها 8 تشكلات وراثية (NH)، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.933 و 0.00848 على التوالي، أما مجموعة $B(a)P$ $10\mu g/kg$ فكان عدد المواقع 448 زوجًا قاعديًا وعدد الأنماط الفردية الكلية (H) 7 نتج عنها 21 تشكلاً وراثياً (NH)، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.900 و 0.01435 على التوالي، أما مجموعة $B(ghi)P$ $1\mu g/kg$ فكان عدد المواقع 448 زوجًا قاعديًا وعدد الأنماط الفردية الكلية (H) 6 نتج عنها 10 تشكلات وراثية (NH) وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.893 و 0.00985 على التوالي، كما بينت نتائج التنوع الوراثي لمجموعة $B(ghi)P$ $10\mu g/kg$ أن عدد المواقع 448 زوجًا قاعديًا وكان عدد الأنماط الفردية الكلية (H) 6 نتج عنها 13 تشكلاً وراثياً (NH)، وكانت قيم تنوع النمط الفردي (HD) وقيم تنوع النيوكليوتيدات (π) 0.882 و 0.00974 على التوالي، أما مجموعة السيطرة والنفط الخام فلم يظهر أي تغيير في تسلسل القواعد النيتروجينية.

جدول (4-4) التنوع الوراثي لجين *CYP1A* بين مجاميع الأسماك المعاملة بمركبي $B(a)P$ و $B(ghi)P$ بتركيزي $(1, 10\mu g/kg)$ لكل مركب.

الكلبي	$B(ghi)P$ $10\mu g/kg$	$B(ghi)P$ $1\mu g/kg$	$B(a)P$ $10\mu g/kg$	$B(a)P$ $1\mu g/kg$	النفط الخام	السيطرة	المركب
449	450	448	448	449	450	450	عدد المواقع Number of Site
20	6	6	7	5	1	1	النمط الفردي Haplotype (H)
24	13	10	21	8	1	1	عدد التشكلات الوراثية Number of polymorphic (NH)
0.825	0.882	0.893	0.900	0.933	0	0	تنوع النمط الفردي Haplotype diversity (HD)
0.0152	0.00974	0.00985	0.01435	0.00848	0	0	تنوع النيوكليوتيدات Nucleotide diversity (π)

6.4: تعدد اشكال النيوكليوتيدات المفردة Single nucleotide polymorphisms

1.6.4: جين AhR2

1.1.6.4: مجموعة النفط الخام

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة النفط الخام وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون العاشر وتحديداً في المواقع 1218 و 1537 و 1557 و 1586 و 1591 و 1613 و 1650 و 1652 و 1711 و 1712 من جين AhR2 إذ تغيرت القاعدة C إلى T في الموقعين (C1218T) و (C1537T) و C إلى G (C1557G) و C إلى T في الموقعين (C1586T) و (C1591T) و A إلى C (A1613C) و C إلى T في الموقعين (C1650T) و (C1652T) و A إلى T (A1711T) و G إلى C (G1712C)، وكما مبين في جدول (4-5) وشكل (4-1)، كذلك أوضح الجدول (4-5) أن التشكلات C1537T و C1557G و C1586T و C1591T و A1613C و C1652T أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية، مما أدى إلى تغيير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من ليوسين (L) إلى فينل الانين (F) ومن حامض الأسبارتك (D) إلى حامض الكليوتامك (E) ومن الانين (A) إلى فالين (V) ومن ليوسين (L) إلى فينل الانين (F) ومن حامض الكليوتامك (E) إلى الانين (A) ومن سيرين (S) إلى فينل الانين (F) على التوالي وكانت الطفرات مؤثرة A missense mutation وفيها يتم استبدال لقاعدة نيتروجينية واحدة ترمز لحامض أميني آخر مختلف عنه كيميائياً، وبالتالي يُمكن أن تُؤدي إلى تغير وظيفة البروتين المنتج كونها تحدث في المناطق المشفرة للبروتين (الأكسونات) (Ribeil et al., 2017).

أما C1218T و C1650T و (G1712C-A1711T)، فعلى الرغم من تغير الشفرات الوراثية فيها من ACC إلى ACT ومن CTC إلى CTT ومن AGC إلى TCC إلا أنها أعطت الحوامض الأمينية نفسها الثريونين (T) و الليوسين (L) والسيرين (S) على التوالي أي أنّ الطفرة صامتة ASilent mutation هذا النوع من الطفرات لا يُؤثر على سلسلة الأحماض الأمينية، فعلى الرغم من تغير قاعدة نيتروجينية في تسلسل الحامض النووي وتغير الشفرة الوراثية إلا أنها أعطت نفس الحامض الأميني (Ribeil et al., 2017) ويعود السبب في ذلك إلى أنّ هذه الحوامض الأمينية تمتلك أكثر من شفرة وراثية.

إنَّ تغيرات حدوث SNP تعتمد أساسًا على نوع الطفرة التي تكون على نوعين: الأولى تُسمى طفرت الاستبدال المتماثل (التبديلات Transition)، وفيها يتم تحويل القاعدة النيتروجينية إلى قاعدة أخرى من النوع نفسه بيورين - بيورين (A ↔ G) أو بايريميدين - بايريميدين (C ↔ T)، والنوع الثاني هي طفرة الاستبدال المختلف (التحولات Transversion) ويتم فيها تغيير القاعدة النيتروجينية بأخرى من نوع آخر بيورين - بايريميدين، أو العكس مثل (A-G ↔ C) (Wang et al., 1998).

جدول (4-5) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *Ahr2* لمجموعة النفط الخام.

الجيل	موقع الـ SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>Ahr2</i>	1218	C>T	ACC>ACT	T>T	Transition	Silent	80	20	-	-
	1537	C>T	CTT>TTT	L>F	Transition	Missense				
	1557	C>G	GAC>GAG	D>E	Transversion	Missense				
	1586	C>T	GCT>GTT	A<V	Transition	Missense				
	1591	C>T	CTC>TTC	L>F	Transition	Missense				
	1613	A>C	GAA>GCA	E>A	Transversion	Missense				
	1650	C>T	CTC>CTT	L>L	Transition	Silent				
	1652	C>T	TCT>TTT	S>F	Transition	Missense				
	1711	A>T	-	-	Transversion	Missense				
	1712	G>C	AGC>TCC	S>S	Transversion	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *Ahr2* بناء على الرقم التسلسلي XM_042749540.1 الذي تم الحصول عليه من NCBI

SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ;G : Guanine; T: Threonine; L:leucine; F: Phenylalanine; D: Aspartic acid; A: Alanine; V: Valine; E: Glutamic Acid; S: Serine.

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CACTGGAGAG	GGTGTCTTGT	ATGAGACCGG	CCCCACACTG	GACATCGCTG	ACATCCAAAA	TCCCAGCAAG
A14 Ahr2-FT.....
A15 Ahr2-F
A17 Ahr2-F
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GGCCAGAAGA	TGCACAAACC	TCCATCTCTG	GACCCAGATT	CTCTTCTTGG	CTGCATGCTG	AAACAGGATC
A14 Ahr2-F
A15 Ahr2-F
A17 Ahr2-F
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	ATTCTGTCTA	CACCAACAAC	AATGACCCCA	ATTCCAGTT	TACCCCTGAC	AAGGCTTICA	GGGATAGCCA
A14 Ahr2-F
A15 Ahr2-F
A17 Ahr2-F
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGCCCTGCTC	AATGTCCCTG	GGAACAACCTG	GCAGCCGTCA	GCCTGAACA	CTGTGGCTGG	GATAAAGGAG
A14 Ahr2-F
A15 Ahr2-F
A17 Ahr2-F
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GAAAGTGTGG	TAAAGGACAT	GATGGAAAGC	TTGCAACAGA	TTATTGGTGA	CACAGTATT	TGTGGCCTTC
A14 Ahr2-F
A15 Ahr2-FT.....
A17 Ahr2-F
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AGGATTTTGA	TGTGGACGAA	TCGGACCTGA	AGGAGTGGGA	GAATGCTCTG	CTCAGGATGA	ACTACAACAA
A14 Ahr2-F
A15 Ahr2-FG.....T.....T.....
A17 Ahr2-F
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGAAATGGAA	CTTAACGAAA	TCATCACCGA	CGACATCCTC	TCTTATGTCG	AGGATGCACT	TTTTAAGGGA
A14 Ahr2-FT.....T.....
A15 Ahr2-FC.....
A17 Ahr2-F
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AATGGTATTC	AATTGCCTGA	ACRACTCAAG	AGCCAGGGTT	CATTTGTTGA	GGTGCCTGAG	TGTCCTCCAG
A14 Ahr2-F
A15 Ahr2-F
A17 Ahr2-FTC.....

شكل (1-4) مقارنة تتابعات جين *Ahr2* لمجموعة النفط الخام مع رقم الانضمام XM_042749540.1

أظهر النفط الخام قدرة تطفيرية عالية في جين *Ahr2* حيث تسبب بحدوث 10 طفرات يعود السبب في ذلك لوجود مركبات PAHs في النفط الخام التي تمتاز بقدرتها على تكوين هياكل المعقدات داخل الحامض النووي والتي يُمكن أن تُؤدي إلى طفرات نقطية وبشكل عام عدم الاستقرار الجيني (Nadler, 2017)، إذ إنَّ خليط مركبات PAHs في النفط الخام حتى إن كان بتراكيز

منخفضة قد يؤدي إلى تأثيرات بيولوجية غير متوقعة، ويُحدث تغيرات على المستوى الجزيئي، ويُساهم في زيادة التأثيرات السامة للجينات (Bramatti et al., 2023).

تتوافق نتائج دراستنا مع دراستين لـ (Maria et al., 2004; Nigro et al., 2002) على أسماك ثعبان البحر (*Anguilla anguilla*) ظهر فيهما مؤشرات عالية لتلف الحامض النووي في كريات الدم الحمراء لهذه الأسماك بعد معالجتها بالمختبر بمركبات PAHs ، كذلك تم الإبلاغ عن مؤشرات تلف عالية في الحامض النووي لكريات الدم الحمراء في أسماك *Zoarces viviparus* جُمعت من مُصب نهر في سويسرا حيث تلوثت الرواسب بعدة مركبات منها PAHs (Frenzilli et al., 2004) ، كما تتوافق مع دراسة مختبرية أجراها (Vanzella et al., 2007) على أسماك *Prochilodus lineatus* إذ تبين حدوث أضرار سامة وراثية ومطفرة في كريات الدم الحمراء للأسماك بعد تعرضها للنفط الخام تحت التعرض الحاد (24,6 , 96 ساعة) ودون المزمّن (15 يوم)، كما لوحظت آثار لتلف الحامض النووي في عديد من الدراسات للأحياء المائية المعرضة للنفط الخام أو بيانات المراقبة الملوثة بمخلفات البترول الصناعية السائلة حيث تبين أنّ المركبات المشتقة من البترول تسبب في ارتفاع مؤشرات تلف الحامض النووي (Balk et al., 2011; Holth et al., 2009).

إنّ عملية التحول الأحيائي لمركبات PAHs في الأسماك على عكس التي تحدث في معظم المركبات الكيميائية إذ غالبًا ما تُحول هذه المركبات إلى مواد وسيطة شديدة السمية والتي تسبب أضرار تأكسدية للحامض النووي، وقد تسبب التأثيرات الجينية، مثل تكسر شرائط الحامض النووي ووجود النوى الدقيقة في حدوث الطفرات والسرطنة وتسبب في التشوه والتغيرات السكانية اللاحقة (Van der Oost et al., 2003)، كما وجد (Pilcher et al., 2014) في دراسة له على أسماك Killifish زيادة كبيرة في أعداد الجينات غير المنتظمة في الأجنة واليرقات بعد التعرض للنفط الخام مما يؤثر على الاستجابات على المستوى الجزيئي.

2.1.6.4: مجموعة B(a)P 1µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(a)P 1µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون العاشر وتحديداً في المواقع 1218 و 1279 و 1334 و 1335 و 1395 و 1493 و 1537 و 1602 و 1694 و 1712 و 1725 من جين *AhR2* أذ تغيرت القاعدة C إلى T (C1218T) و C إلى A (C1279A) و C إلى T (C1334T) و T إلى C في الموقعين (T1335C) و (T1395C) و T إلى A (T1493A) و C إلى T في الموقعين (C1537T) و (C1602T) و T إلى G (T1694G) و G إلى C (G1712C) و T إلى G (T1725G)، وكما مبين في جدول (6-4) وشكل (2-4)، كذلك أوضح الجدول (4-6) أنّ التشكلات C1279A و (T1335C- C1334T) و T1493A و T1694G و C1537T و G1712C و T1725G أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية، مما أدى إلى تغيير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من بروتين (P) إلى ثيونين (T) ومن سيرين (S) إلى فينل الانين (F) ومن ميثونين (M) إلى لايسين (K) ومن ليوسين (L) إلى فينل الانين (F) ومن ليوسين (L) إلى تربتوفان (W) ومن سيرين (S) إلى ثيونين (T) ومن فينل الانين (F) إلى ليوسين (L) على التوالي وكانت الطفرات مؤثرة، أما C1218T و T1395C و C1602T، فعلى الرغم من تغير الشفرات الوراثية فيها من ACC إلى ACT ومن GAT إلى GAC ومن AAC إلى AAT على التوالي إلا أنّها أعطت الحوامض الأمينية نفسها ثيونين (T) و حامض الأسبارتك (D) و أسبارجين (N) على التوالي أي إنّ الطفرات صامتة، ويعود السبب في ذلك إلى أنّ هذه الحوامض الأمينية تمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-6) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *Ahr2* لمجموعة *B(a)P* 1µg/kg.

الجين	موقع الـ SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>Ahr2</i>	1218	C>T	ACC>ACT	T>T	Transition	Silent	73	27	-	-
	1279	C>A	CCT>ACT	P>T	Transversion	Missense				
	1334	C>T	-	-	Transition	Missense				
	1335	T>C	TCT>TTC	S>F	Transition	Missense				
	1395	T>C	GAT>GAC	D>D	Transition	Silent				
	1493	T>A	ATG>AAG	M>K	Transversion	Missense				
	1537	C>T	CTT>TTT	L>F	Transition	Missense				
	1602	C>T	AAC>AAT	N>N	Transition	Silent				
	1694	T>G	TTG>TGG	L>W	Transversion	Missense				
	1712	G>C	AGC>ACC	S>T	Transversion	Missense				
	1725	T>G	TTT>TTG	F>L	Transversion	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *Ahr2* بناء على الرقم التسلسلي XM_042749540.1 الذي تم الحصول عليه من NCBI
 SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ;G : Guanine; T: Threonine; P: Proline; S: Serine; F: Phenylalanine; D: Aspartic acid; M: Methionine; K: Lysine; L: leucine; N: Asparagine; W: Trytophan.

أوضحت النتائج قدرة عالية لمركب *B(a)P* على إحداث الطفرات، حيث تبين حدوث 11 طفرة، ويعود السبب في ذلك الى قدره النواتج الأيضية لمركب *B(a)P* على التفاعل مع الحامض النووي وتكوين المعقدات التي تمثل التغيرات ما قبل الطفرة والتي في معظم الحالات يتم التعرف عليها ومعالجتها بواسطة أنظمة الإصلاح وفي حال حدوث عقبات ولم يتم ازالتها تبدأ طفرة نقطية في شكل استبدال أو حذف، حيث يُمكن لمعقدات الحامض النووي تحريض الطفرات (Melendez-Colon *et al.*, 1999). ترتبط المركبات الأيضية الوسيطة الناتجة عن التمثيل الغذائي لـ *B(a)P* مع الحامض النووي، مما يؤدي إلى السمية الخلوية والطفرات (Alexandrov and Thompson, 1977) وتحول الخلايا في المختبر وتحريض السرطان في حيوانات التجارب، إذ بينت دراسات مختبرية جُرعت فيها فئران بمادة *B(a)P* عن طريق الفم أو النظام الغذائي زيادة في حدوث الأورام في

أعضاء مختلفة، مثل اللسان والكبد والرئة والمعدة والمريء والأنسجة للمفاوية والأنسجة المكونة للدم (Agrawal *et al.*, 2018; Estensen *et al.*, 2004). تتوافق نتائجنا مع دراسة لـ (Yadatie *et al.*, 2018)، التي أكد فيها زيادة التعبير عن جين *Ahr2* بشكل رئيسي في نظام القلب والأوعية الدموية لأجنة ويرقات سمك القد الأطلسي (*Gadus morhua*) بعد تعريضها لـ B(a)P.

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CACTGGAGAG	GGTGTCTTGT	ATGAGACCGG	CCCCACACTG	GACATCGCTG	ACATCCAAA	TCCAGCAAG
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-FT.....
A26 Ahr2-FT.....
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GGCCAGAAGA	TGCACAAACC	TCCATCTCTG	GACCCAGATT	CTCTTCTTGG	CTGCATGCTG	AAACAGGATC
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-FA.....
A26 Ahr2-FA.....
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	ATCTGTCTA	CACCAACAAC	AATGACCCCA	ATCCCACTT	TACCCCTGAC	AAGGCTTTC	GGGATAGCCA
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-FC.....
A26 Ahr2-F
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGCCCTGCTC	AATGTCCCTG	GGAAACAATG	GACGCCGTC	GCCCTGAACA	CTGTGGCTGG	GATAAAGGAG
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-F
A26 Ahr2-F
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GAAAGTGTGG	TAAAGGACAT	GATGAAAGC	TTGCAACAGA	TTATTGGTGA	CAACAGTATT	TGTGGCCTTC
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-FA.....T.....
A26 Ahr2-F
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AGGATTTTGA	TGTGGACGAA	TCGGACCTGA	AGGAGTGGGA	GAATGCTCTG	CTCAGGATGA	ACTACAACAA
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-FT.....
A26 Ahr2-F
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGAAATGGAA	CTTAACGAAA	TCATCACCGA	CGACATCCTC	TCTTATGTCG	AGGATGCACT	TTTTAAGGGA
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-F
A26 Ahr2-F
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AATGGTATTC	AATGCTCTGA	ACAACTCAAG	AGCCAGGGTT	CATTGCTTGA	GGTGCTGAG	TGCTTCCGT
A21 Ahr2-F
A22 Ahr2-FC.....
A26 Ahr2-FG.....G.....

شكل (2-4) مقارنة تتابعات جين *Ahr2* لمجموعة B(a)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1

1.6.4.: مجموعة B(a)P 10µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(a)P 10µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون العاشر وتحديداً في المواقع 1238 و 1310 و 1387 و 1401 و 1457 و 1466 و 1493 و 1497 و 1507 و 1510 و 1530 و 1537 و 1694 من جين *Ahr2* إذ تغيرت القاعدة من C إلى G (C1238G) ومن G إلى T (G1310T) ومن T إلى A (T1387A) ومن C إلى A (C1401A) ومن C إلى T (C1457T) ومن A إلى C (A1466C) ومن T إلى A (T1493A) ومن A إلى T (A1497T) ومن C إلى A (C1507A) ومن A إلى T (A1510T) ومن T إلى C (T1530C) ومن C إلى T (C1537T) ومن T إلى G (T1694G)، وكما مبين في جدول (4-7) وشكل (4-3).

كذلك أوضح الجدول (4-7) أنَّ التشكلات C1238G و G1310T و T1387A و C1401C و A1466C و T1493A و A1497T و C1507A و A1510T و C1537T و T1694G أدت إلى تغير الشفرات الوراثية مما أدى إلى تغير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من الانين (A) إلى كلايسين (G) ومن كلايسين (G) إلى فالين (V) ومن فينل الانين (F) إلى ايزوليوسين (I) ومن هستدين (H) إلى كليوتامين (Q) ومن الانين (A) إلى فالين (V) ومن لايسين (K) إلى ثريونين (T) ومن ميثونين (M) إلى لايسين (K) ومن حامض الكليوتامك (E) إلى حامض الأسبارتك (D) ومن كليوتامين (Q) إلى لايسين (K) ومن ايزوليوسين (I) إلى فينل الانين (F) ومن ليوسين (L) إلى فينل الانين (F) ومن ليوسين (L) إلى تربتوفان (W) على التوالي وكانت الطفرات مؤثرة، أما T1530C ، فعلى الرغم من تغير الشفرة الوراثية فيها من ATT إلى ATC إلا أنَّها أعطت الحامض الأميني نفسه (ايزوليوسين) أي أنَّ الطفرة صامتة ويعود ذلك إلى أنَّ الحامض الأميني ايزوليوسين (I) يمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-7) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *AhR2* لمجموعة B(a)P 10 µg/kg.

الجين	موقع SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>AhR2</i>	1238	C>G	GCT>GGT	A>G	Transversion	Missense	92	8	-	-
	1310	G>T	GGC>GTC	G>V	Transversion	Missense				
	1387	T>A	TTC>ATC	F>I	Transversion	Missense				
	1401	C>A	CAC>CAA	H>Q	Transversion	Missense				
	1457	C>T	GCT>GTT	A>V	Transition	Missense				
	1466	A>C	AAG>ACG	K>T	Transversion	Missense				
	1493	T>A	ATG>AAG	M>K	Transversion	Missense				
	1497	A>T	GAA>GAT	E>D	Transversion	Missense				
	1507	C>A	CAG>AAG	Q>K	Transversion	Missense				
	1510	A>T	ATT>TTT	I>F	Transversion	Missense				
	1530	T>C	ATT>ATC	I>I	Transition	Silent				
	1537	C>T	CTT>TTT	L>F	Transition	Missense				
	1694	T>G	TTG>TGG	L>W	Transversion	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *AhR2* بناء على الرقم التسلسلي XM_042749540.1 الذي تم الحصول عليه من NCBI
 SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ;G : Guanine; G: Glycine; A: Alanine; V: Valine; F: Phenylalanine; I:Isoleucine; H: Histidine; Q: Glutamine; K: Lysine; M: Methionine; T: Threonine; E: Glutamic Acid; D: Aspartic acid; L:leucine; W :Trytophan.

بيّنت النتائج زيادة عدد الطفرات بزيادة التركيز من 1 إلى 10 µg/kg حيث ازداد عدد الطفرات من 11 وكان منها (7) مؤثرة إلى 13 وكان منها (12) مؤثرة، وهذا يتوافق مع ما توصل إليه (Esmailbeigi et al., 2021) من زيادة تلف الحامض النووي بزيادة التراكيز عند دراسته لأسماك قزوين البيضاء كنموذج بيئي. كما لوحظت تأثيرات مماثلة من قبل (Kim and Hyun, 2006) اللذان أشارا إلى أنّ تأثير B(a)P يزداد بازدياد الوقت والتركيز عند دراستهما لسمكتي التراوت rainbow trout والكارب الشائع، وهذا ما أكدّه أيضًا (Costa et al., 2011) عند دراسته لتأثير B(a)P على سمك البلطي النيلي.

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CACTGGAGAG	GGTGTCTTGT	ATGAGACCGG	CCCCACACTG	GACATCGCTG	ACATCCAAA	TCCAGCAAG
A37 Ahr2-F
A39 Ahr2-F
A41 Ahr2-FG.....
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GGCCAGAAGA	TGCACAAACC	TCCATCTCTG	GACCCAGATT	CTCTCTTGG	CTGCATGCTG	AAACAGGATC
A37 Ahr2-F
A39 Ahr2-F
A41 Ahr2-FT.....
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	ATTCTGTCTA	CACCAACAAC	AATGACCCCA	ATGCCAGTT	TACCTTGAC	AAGGCTTCA	GGGATGCCA
A37 Ahr2-F
A39 Ahr2-F
A41 Ahr2-FA.....
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGCCCTGCTC	AATGTCCCTG	GGAAACAATG	GCGCCGTCA	GCCCTGAACA	CTGTGGCTGG	GATAAAGGAG
A37 Ahr2-F
A39 Ahr2-FT.....C.....
A41 Ahr2-F	A.....
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GAAAGTGTGG	TAAAGGACAT	GATGGAAAGC	TTGCAACAGA	TTATTGGTGA	CAACAGTATT	TGTGGCCTTC
A37 Ahr2-FA.....T.....
A39 Ahr2-FA.....A..T.....C.....T.....
A41 Ahr2-FA..T.....A.....T.....
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AGGATTTTGA	TGTGGACGAA	TCGGACCTGA	AGGAGTGGGA	GAATGCTCTG	CTCAGGATGA	ACTACAACAA
A37 Ahr2-F
A39 Ahr2-F
A41 Ahr2-F
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGAAATGGAA	CTTAACGAAA	TCATCACCGA	CGACATCCCTC	TCTTATGTCG	AGGATGCACT	TTTAAAGGGA
A37 Ahr2-F
A39 Ahr2-F
A41 Ahr2-F
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AATGGTATTC	AATGCTCTG	ACAACTCAAG	AGCCAGGGTT	CATTGTTGA	GGTGCCTGAG	TGCTTCCAG
A37 Ahr2-FG.....
A39 Ahr2-FG.....
A41 Ahr2-FG.....

شكل (3-4) مقارنة تنابعات جين *Ahr2* لمجموعة B(a)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1

4.1.6.4: مجموعة B(ghi)P 1µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تنابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون العاشر وتحديداً في المواقع 1218 و 1393 و 1694 و 1712 من جين *Ahr2* إذ تغيرت القاعدة من C إلى T (C1218T) ومن G إلى C (G1393C) و من T إلى G (T1694G) ومن G إلى C (G1712C) كما مبين في جدول (4-8) وشكل (4-4)، كذلك أوضح الجدول (4-8) أنّ التشكلات 1393 و 1694 و 1712 أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية،

مما أدى إلى تغيير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من حامض الأسبارتك (D) إلى هستدين (H) ومن ليوسين (L) إلى تربتوفان (W) ومن سيرين (S) إلى ثريونين (T) ، وكانت الطفرات مؤثرة ، أما C1218T ، فعلى الرغم من تغيير الشفرة الوراثية فيها من ACC إلى ACT إلا أنها أعطت الحامض الأميني نفسه (الثريونين) أي أن الطفرة صامتة ويعود ذلك إلى أن الحامض الأميني الثريونين (T) يمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-8) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *AhR2* لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg.

الجين	موقع الـ SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>AhR2</i>	1218	C>T	ACC>ACT	T>T	Transition	Silent	75	25	-	-
	1393	G>C	GAT>CAT	D>H	Transversion	Missense				
	1694	T>G	TTG>TGG	L>W	Transversion	Missense				
	1712	G>C	AGC>ACC	S>T	Transversion	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *AhR2* بناء على الرقم التسلسلي XM_042749540.1 الذي تم الحصول عليه من NCBI
 SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T: Thymine; A: Adenine ;G : Guanine;
 T: Threonine; D: Aspartic acid; H: Histidine; L:leucine; W :Tryotophan; S: Serine.

أوضحت النتائج قدرة B(ghi)P على التطهير حيث تبين وجود 4 طفرات ثلاث منها كانت مؤثرة، وهذا يتوافق مع العديد من الدراسات التي قدمت الأدلة على قدرة B(ghi)P على تكوين معقدات الحامض النووي في المختبر وفي الجسم الحي منها (Cherng *et al.*, 2001; Dai *et al.*, 2022; Hughes and Phillips, 1993; Labib *et al.*, 2016; Long *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2008; Platt *et al.*, 2013; Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2022)، كما يتوافق مع دراسة لـ (Zaragoza-Ojeda *et al.*, 2022) أكد فيها حدوث تلف الحامض النووي في خلايا الشعب الهوائية البشرية بعد ثلاث ساعات من التعرض لـ B(ghi)P ومن خلال تحريض مسار مستقبل الهيدروكاربون أريل AHR.

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CACTGGAGAG	GGTGTCTTGT	ATGAGACCGG	CCCCACACTG	GACATCGCTG	ACATCCAAAA	TCCCAGCAAG
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-FT.....
A55 Ahr2-F
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GGCCAGAAGA	TGCACAAACC	TCCATCTCTG	GACCCAGATT	CTCTTCTTGG	CTGCATGCTG	AAACAGGATC
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-F
A55 Ahr2-F
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	ATTCTGTCTA	CACCAACAAC	AATGACCCCA	ATCCCAAGTT	TACCCCTGAC	AAGGCTTCA	GGGATAGCCA
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-F
A55 Ahr2-FC.....
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGCCCTGCTC	AATGTCCCTG	GGAACAACATG	GAGCCCTCA	GCCCTGAACA	CTGTGGCTGG	GATAAAGGAG
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-F
A55 Ahr2-F
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GAAAGTGTGG	TAAAGGACAT	GATGGAAAGC	TGCAACAGA	TTATGGTGA	CAACAGTATT	TGTGGCCTTC
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-F
A55 Ahr2-F
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AGGATTTTGA	TGTGGACGAA	TCGGACCTGA	AGGAGTGGGA	GAATGCTCTG	CTCAGGATGA	ACTACAACAA
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-F
A55 Ahr2-F
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGAAATGGAA	CTTAACGAAA	TCATCACCGA	CGACATCCTC	TCTTATGTCTG	AGGATGCACCT	TTTTAAGGGA
A44 Ahr2-F
A50 Ahr2-F
A55 Ahr2-F
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AATGGTATTC	AATGCTCTGA	ACAACCTAAG	AGCCAGGGTT	CATTGTTGA	GGTGCCTGAG	TGTCTTCCAG
A44 Ahr2-FG.....C.....
A50 Ahr2-FG.....C.....
A55 Ahr2-FG.....

شكل (4-4) مقارنة تنابعات جين *Ahr2* لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1

5.1.6.4: مجموعة B(ghi)P 10µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الألكسون العاشر وتحديداً في المواقع 1218 و 1493 و 1547 و 1694 من جين *Ahr2* إذ تغيرت القاعدة من C إلى T (C1218T) ومن T إلى A في الموقعين (T1493A) و (T1547A) ومن T إلى G (T1694G) وكما مبين في جدول (4-9) وشكل (4-5). كذلك أوضح الجدول (4-9) أنّ التشكلات 1493 و 1547 و 1694 أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية، مما أدى إلى تغير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من ميثونين (M) إلى لايسين (K) ومن فينل الانين (F) إلى ثايروسين (Y) ومن ليوسين (L) إلى تربتوفان (W) وكانت الطفرات مؤثرة، أما C1218T، فعلى الرغم من تغيير الشفرة الوراثية فيها من ACC إلى ACT إلا أنّها أعطت الحامض الأميني نفسه (الثريونين) أي أنّ الطفرة صامتة ويعود ذلك إلى أنّ الحامض الأميني الثريونين (T) يمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-9) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *Ahr2* لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg.

الجين	موقع الـ SNP	التبوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>Ahr2</i>	1218	C>T	ACC>ACT	T>T	Transition	Silent	75	25	-	-
	1493	T>A	ATG>AAG	M>K	Transversion	Missense				
	1547	T>A	TTT>TAT	F>Y	Transversion	Missense				
	1694	T>G	TTG>TGG	L>W	Transversion	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *Ahr2* بناء على الرقم التسلسلي XM_042749540.1 الذي تم الحصول عليه من NCBI

SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ;G : Guanine; T: Threonine; M: Methionine; K: Lysine; F: Phenylalanine; Y: Tyrosine; L:leucine; W :Tryptophan.

	1200	1210	1220	1230	1240	1250	1260
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CACTGGAGAG	GGTGTCTTGT	ATGAGACCGG	CCCCACACTG	GACATCGCTG	ACATCCAAAA	TCCAGCAAG
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1270	1280	1290	1300	1310	1320	1330
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GGCCAGAAGA	TGCACAAACC	TCCATCTCTG	GACCCAGATT	CTCTTCTTGG	CTGCATGCTG	AAACAGGATC
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1340	1350	1360	1370	1380	1390	1400
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	ATTCTGTCTA	CACCAACAAC	AATGACCCCA	ATTCCCAGTT	TACCCCTGAC	AAGGCTTCA	GGGATAGCCA
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1410	1420	1430	1440	1450	1460	1470
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGCCCTGCTC	AATGTCCCTG	GGAAACAACG	GAGCCCTCA	GCCCTGAACA	CTGTGGCTGG	GATAAAGGAG
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1480	1490	1500	1510	1520	1530	1540
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	GAAAGTGTGG	TAAAGGACAT	GATGGAAAGC	TGCAACAGA	TTATGGTGA	CAACAGTATT	TGTGGCCTTC
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1550	1560	1570	1580	1590	1600	1610
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AGGATTTTGA	TGTGGACGAA	TCGGACCTGA	AGGAGTGGGA	GAATGCTCTG	CTCAGGATGA	ACTACAACAA
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	CGAAATGGAA	CTTAACGAAA	TCATCACCGA	CGACATCCTC	TCTTATGTCG	AGGATGCACT	TTTTAAGGGA
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F
	1690	1700	1710	1720	1730	1740	1750
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio a</i>	AATGGTATTC	AATGCTCGA	ACAACCAAG	AGCCAGGGTT	CATTGTTGA	GGTGCCTGAG	TGTCTTCCAG
A56 Ahr2-F
A62 Ahr2-F
A65 Ahr2-F

شكل (5-4) مقارنة تتابعات جين *Ahr2* لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_042749540.1

2.6.4: جين CYP1A**1.2.6.4: مجموعة النفط الخام**

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة النفط الخام عدم حدوث أي تغيير في تسلسل القواعد النيتروجينية في الجزء المضخم من جين *CYP1A* ، قد يعود السبب في ذلك إلى أنّ مخاليط مركبات PAHs في النفط الخام تثبتت مسار AhR2، وفُسر ذلك بدور جين *AhRR* (مثبط مستقبل الهيدروكربون أريل) الذي يرتبط مع ARNT (المرجم النووي لمستقبل أريل) ويُشكل الثنائي AhRR/ARNT الذي يقوم بقمع مسار AhR2 (Harris et al., 2020; Zajda et al., 2019).

تتوافق نتائج دراستنا مع دراسة لـ (Harris et al., 2020) على أسماك Killifish الأطلسية، حيث أشار إلى أنّ عدم استحداث جين *CYP1A* في الأسماك هو علامة على تثبيط مسار AhR بدلاً من التكيف التطوري مع السمية الناجمة عن PAHs.

2.2.6.4: مجموعة B(a)P 1µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(a)P 1µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون الثاني وتحديداً في المواقع 519 و 527 و 528 و 530 و 546 و 619 و 795 و 838 من جين *CYP1A* أذ تغيرت القاعدة G إلى C في الموقعين (G519C) و (G527C) و C إلى T (C528T) و G إلى A (G530A) و C إلى A في الموقعين (C546A) و (C619A) و A إلى T (A795T) و G إلى A (G838A) وكما مبيّن في جدول (10-4) وشكل (4-6)، كذلك أوضح الجدول (4-10) أنّ التشكلات G527C و (G527C - (C528T) و G530A و G838A أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية، مما أدى إلى تغيير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من سيرين (S) إلى ثريونين (T) وسيرين (S) إلى ثريونين (T) وأرجنين (R) إلى لايسين (K) وكلايسين (G) إلى سيرين (S) على التوالي وكانت الطفرات مؤثرة، أما G519C و C546A و C619A و A795T، فعلى الرغم من تغيير الشفرات الوراثية فيها من CTC إلى GGC ومن GGA إلى CGA ومن AGA إلى ATA إلى ATT على التوالي إلا أنّها أعطت الحوامض الأمينية نفسها، ليوسين (L) و كلايسين (G) و أرجنين (R) و

ايزوليوسين (I) على التوالي أي أنّ الطفرات صامتة ويعود السبب في ذلك إلى أنّ هذه الحوامض الأمينية تمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-10) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *CYP1A* لمجموعة B(a)P 1µg/kg.

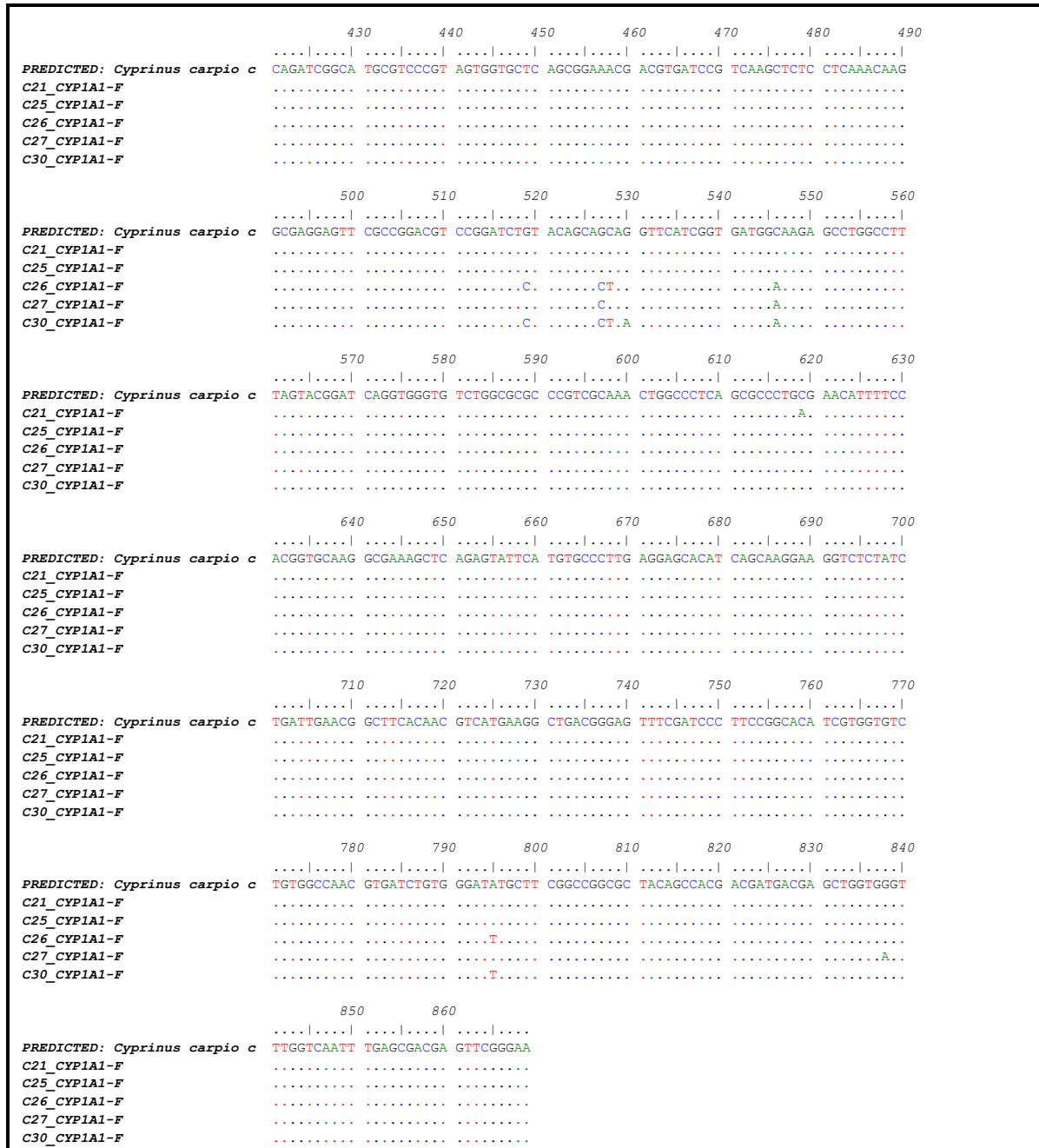
الجين	موقع الـ SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>CYP1A</i>	519	G>C	CTG>CTC	L>L	Transversion	Silent	50	50	-	-
	527	G>C	AGC>ACC	S>T	Transversion	Missense				
	528	C>T	AGC>ACT	S>T	Transition	Missense				
	530	G>A	AGG>AAG	R>K	Transition	Missense				
	546	C>A	GGC>GGA	G>G	Transversion	Silent				
	619	C>A	CGA>AGA	R>R	Transversion	Silent				
	795	A>T	ATA>ATT	I>I	Transversion	Silent				
	838	G>A	GGT>AGT	G>S	Transition	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *CYP1A* بناء على الرقم التسلسلي XM_019064218.2 الذي تم الحصول عليه من NCBI

SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ; G : Guanine; L:leucine; S: Serine; T: Threonine; K: Lysine; R: Arginine; G: Glycine; I:Isoleucine; C: Cysteine.

بيّنت النتائج حدوث 8 طفرات في الجزء المضخم من جين *CYP1A* وهذا يتوافق مع دراسة مختبرية أجراها (Hassanin et al., 2009) على أسماك البلطي (*Oreochromis niloticus*) حيث ازداد تعبير *CYP1A* mRNA في كبد وأمعاء الأسماك بعد حقنها بمركب B(a)P داخل الصفاق، كما يتوافق مع دراسة جزيئية لـ Yuan et al., (2013) على أسماك المنوة النادرة (*Gobiocypris rarus*) أشار فيها إلى أنّ B(a)P تسبب بزيادة تعبير جين *CYP1A* في أنسجة الكبد والخياشيم والأمعاء بعد التعرض لمدة 12 يوماً، كما أشارت العديد من الدراسات السابقة إلى ارتفاع تعبير جين *CYP1A* في الأسماك والفئران والثدييات بعد التعرض لـ B(a)P (Erdogan et al., 2011; Gao et al., 2011; Jönsson et al., 2010; Uno et al., 2014; Zanette et al., 2009)، كما تم الإبلاغ عن حدوث طفرات في دراسات متعددة على القوارض بعد التعرض لـ B(a)P (Labib et al., 2012; Malik et al., 2012; Sakai et al., 2014) في الإنسان.

أيضًا تم الكشف عن معقدات BPDE-DNA وطفرات عديدة في الجين المثبط للورم p53 لرئة الاشخاص المدخين وكذلك لدى الاشخاص غير المدخنين المتعرضين لـ B(a)P (DeMarini *et al.*, 2001; Denissenko *et al.*, 1996; Reeves, 2015; Waters *et al.*, 2010)



شكل (6-4) مقارنة تتابعات جين CYP1A لمجموعة B(a)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2

3.2.6.4: مجموعة B(a)P 10µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(a)P 10µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون الثاني وتحديداً في المواقع 463 و 466 و 485 و 519 و 523 و 527 و 528 و 530 و 540 و 541 و 546 و 588 و 599 و 600 و 611 و 619 و 709 و 795 و 804 و 838 من جين *CYP1A* إذ تغيرت القاعدة G إلى A (G463A) و A إلى G في الموقعين (A466G) و (A485G) و G إلى C (G519C) و A إلى C (A523C) و G إلى C (G527C) و C إلى T (C528T) و G إلى A (G530A) و T إلى C (T540C) و G إلى A (G541A) و C إلى A (C546A) و C إلى T (C588T) و A إلى G في الموقعين (A599G) و (A600G) و A إلى - (A600-) و G إلى T (G611T) و C إلى A في الموقعين (C619A) و (C709A) و A إلى T (A795T) و C إلى G (C804G) و G إلى A (G833A) وكما مبين في جدول (4-11) وشكل (4-7) كذلك أوضح الجدول (4-11) أنّ التشكلات A485G و A466G و A523C و G527C و (G527C و C528T) و G530A و G541A و (A600G - A599G) و G611T و G833A أدت إلى تغير الشفرات الوراثية مما أدى إلى تغير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من فالين (V) إلى ميثونين (M) ومن ايزوليوسين (I) إلى فالين (V) ومن لايسين (K) إلى أرجنين (R) ومن سيرين (S) إلى أرجنين (R) ومن سيرين (S) إلى ثيونين (T) ومن سيرين (S) إلى ثيونين (T) ومن أرجنين (R) إلى لايسين (K) ومن حامض الأسبارتك (D) إلى أسبارجين (N) ومن لايسين (K) إلى أرجنين (R) ومن سيرين (S) إلى ايزوليوسين (I) ومن كلايسين (G) إلى سيرين (S) على التوالي وكانت الطفرات مؤثرة ، أما G519C و T540C و C546A و C588T و C619A و C709A و A795T و C804G، فعلى الرغم من تغير الشفرات الوراثية فيها من CTG إلى CTC ومن GGT إلى GGC ومن GGC إلى GGA ومن CGC إلى CGT ومن CGA إلى AGA ومن CCG إلى AGG ومن ATA إلى ATT ومن GGC إلى GGG على التوالي إلا أنّها أعطت الحوامض الأمينية نفسها، ليوسين (L) و كلايسين (G) و كلايسين (G) و أرجنين (R) و أرجنين (R) و أرجنين (R) و ايزوليسين (I) و كلايسين (G) أي أنّ الطفرات صامتة ويعود ذلك إلى أنّ هذه الحوامض الأمينية تمتلك أكثر من شفرة وراثية. كما تبين حدوث طفرة أنزياح الأطار A Frameshift mutation في الموقع 600، تحدث هذه الطفرات بسبب إضافة أو حذف جزء صغير من المادة الوراثية، مما يؤدي إلى قراءة خاطئة للقواعد النيتروجينية

النهائية، وبالتالي ينتج عنها بروتينات أقصر أو أطول، وقد تتعطل أو تتغير وظيفة البروتين (Chen and Guo, 2020; Tabebordbar *et al.*, 2016).

جدول (4-11) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *CYP1A* لمجموعة B(a)P 10µg/kg.

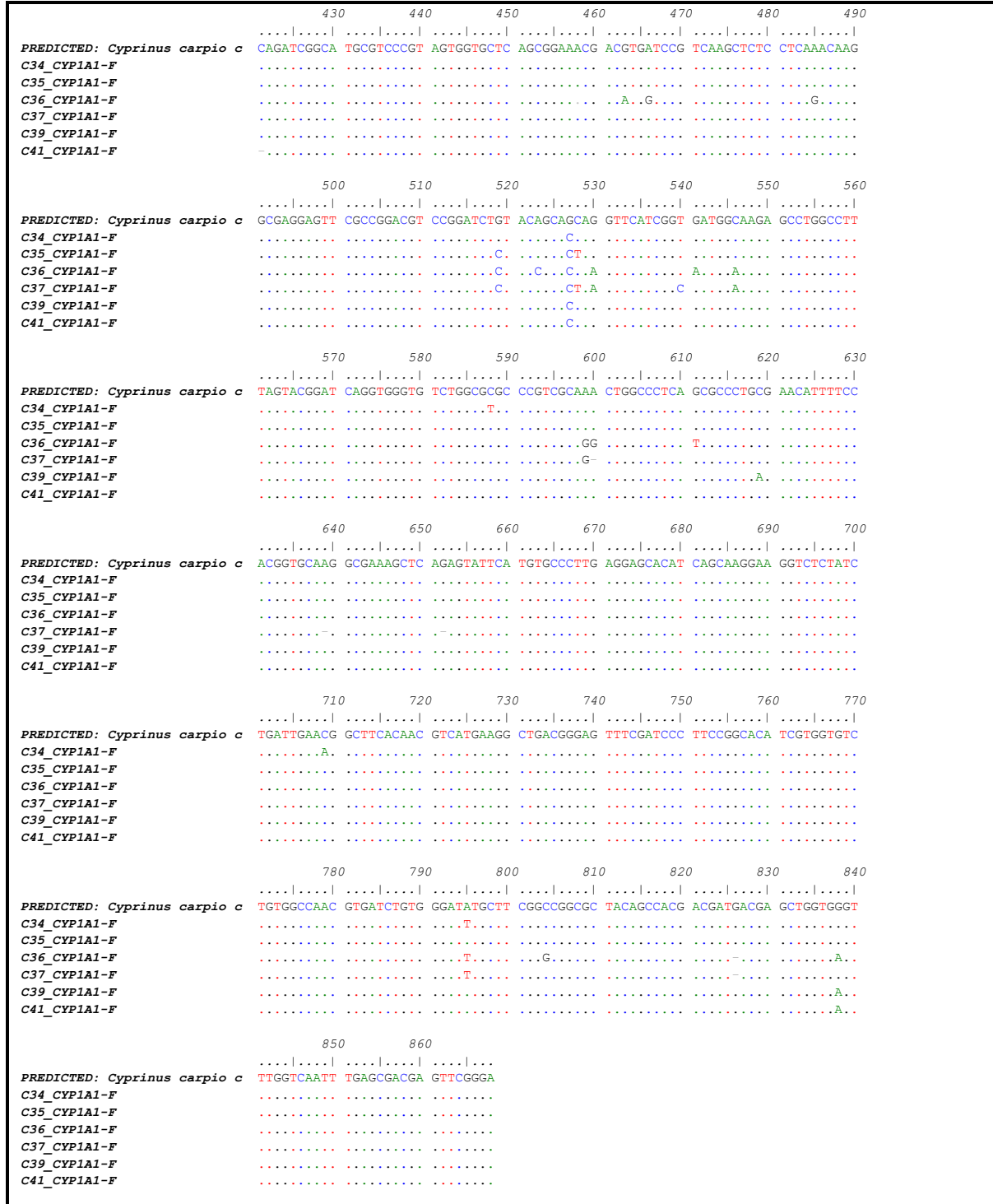
الجين	موقع الـ SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>CYP1A</i>	463	G>A	GTG>ATG	V>M	Transition	Missense	57	38	-	5
	466	A>G	ATC>GTC	I>V	Transition	Missense				
	485	A>G	AAA>AGA	K>R	Transition	Missense				
	519	G>C	CTG>CTC	L>L	Transversion	Silent				
	523	A>C	AGC>CGC	S>R	Transversion	Missense				
	527	G>C	AGC>ACC	S>T	Transversion	Missense				
	528	C>T	AGC>ACT	S>T	Transition	Missense				
	530	G>A	AGG>AAG	R>K	Transition	Missense				
	540	T>C	GGT>GGC	G>G	Transition	Silent				
	541	G>A	GAT>AAT	D>N	Transition	Missense				
	546	C>A	GGC>GGA	G>G	Transversion	Silent				
	588	C>T	CGC>CGT	R>R	Transition	Silent				
	599	A>G	AAA>AGA	---	Transition	Missense				
	600	A>G	AAA>AGG	K>R	Transition	Missense				
	600	A>-	-	-	Deletion	Frameshift				
	611	G>T	AGC>ATC	S>I	Transversion	Missense				
	619	C>A	CGA>AGA	R>R	Transversion	Silent				
	709	C>A	CCG>AGG	R>R	Transversion	Silent				
	795	A>T	ATA>ATT	I>I	Transversion	Silent				
	804	C>G	GGC>GGG	G>G	Transversion	Silent				
838	G>A	GGT>AGT	G>S	Transition	Missense					

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *CYP1A* بناء على الرقم التسلسلي XM_019064218.2 الذي تم الحصول عليه من NCBI

SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ;G : Guanine; V: Valine; M: Methionine; N :Asparagine; I:Isoleucine; K: Lysine; R: Arginine; L:leucine; S: Serine; T: Threonine; G: Glycine; D: Aspartic acid.

بيّنت النتائج زيادة كبيرة في عدد الطفرات بزيادة التركيز من 1 إلى 10 (µg/kg)، حيث ازداد عدد الطفرات من 8 إلى 21 طفرة، وهذا يتفق مع دراسة مختبرية أجراها (Gerger and Weber, 2015) على أسماك الزرد (*Danio rerio*) البالغة حيث ازداد تعبير جين *CYP1A* بزيادة تركيز B(a)P بالحقن داخل الصفاق (0.1,10,1000 µg/kg) أو تعرضها مائياً (16.2,162 µg/l) لمدة يومين.

كما اتفقت مع دراسة مختبرية أجراها Soltani *et al.*, (2019) على أسماك (*Liza klunzingeri*) حيث ازاد تعبير جين *CYP1A1* بزيادة تركيز B(a)P بالحقن داخل الصفاق (5,10,50 mg/kg)، الذي أشار إلى ارتباط ذلك بتلف الحامض النووي.



شكل (7-4) مقارنة تتابعات جين *CYP1A1* لمجموعة B(a)P 10µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2

4.2.6.4: مجموعة B(ghi)P 1µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون الثاني وتحديداً في المواقع 492 و 519 و 527 و 528 و 546 و 600 و 619 و 795 و 825 و 838 من جين *CYP1A* إذ تغيرت القاعدة C إلى T و (C492T) و G إلى C في الموقعين (G519C) و (G527C) و C إلى T (C528T) و C إلى A (C546A) و A إلى G (A600G) و C إلى A (C619A) و A إلى T (A795T) و C إلى T (T825C) و G إلى A (G838A) وكما مبيّن في جدول (4-12) و شكل (4-8).

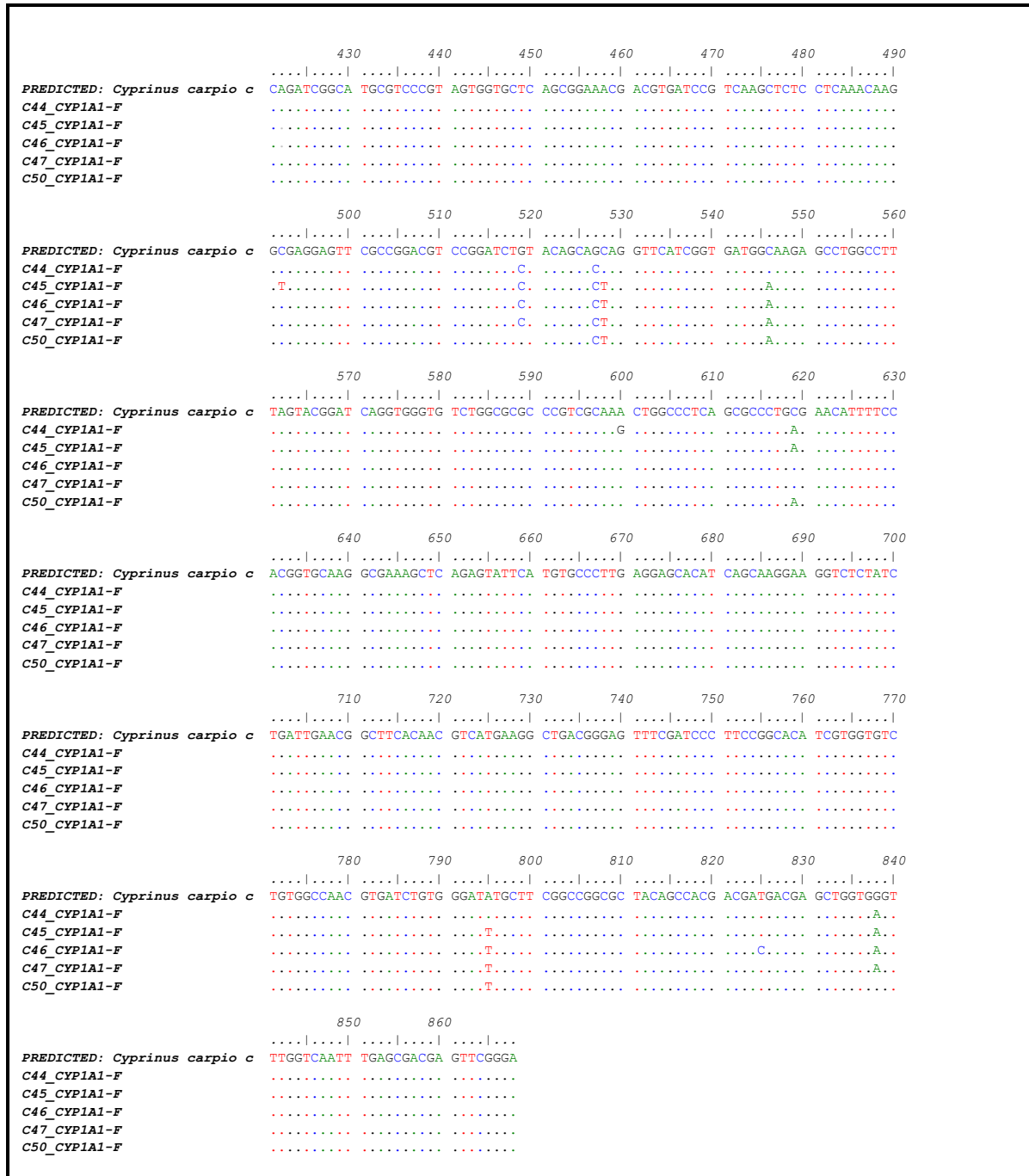
كذلك أوضح الجدول (4-12) أنّ التشكلات G527C و (G527C و C528T) و G838A أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية، مما أدى إلى تغيير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من سيرين (S) إلى ثريونين (T) ومن سيرين (S) إلى ثريونين (T) ومن كلابسين (G) إلى سيرين (S) على التوالي، وكانت الطفرات مؤثرة ، أما C492T و G519C و C546A و A600G و C619A و A795T و T825C، فعلى الرغم من تغيير الشفرات الوراثية فيها من GGC إلى GGT ومن CTC إلى CTG ومن GGC إلى GGA ومن AAA إلى AAG ومن CGA إلى AGA ومن ATA إلى ATT ومن GAT إلى GAC على التوالي إلا أنّها أعطت الحوامض الأمينية نفسها، كلابسين (G) و ليوسين (L) و كلابسين (G) و ليوسين (L) و أرجنين (R) و ايزوليوسين (I) و حامض الأسبارتك (D) على التوالي أي أنّ الطفرات صامتة ويعود السبب في ذلك إلى أنّ هذه الحوامض الأمينية تمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-12) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *CYP1A* لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg.

الجين	موقع الـ SNP ^a	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>CYP1A</i>	492	C>T	GGC>GGT	G>G	Transition	Silent	30	70	-	-
	519	G>C	CTG>CTC	L>L	Transversion	Silent				
	527	G>C	AGC>ACC	S>T	Transversion	Missense				
	528	C>T	AGC>ACT	S>T	Transversion	Missense				
	546	C>A	GGC>GGA	G>G	Transversion	Silent				
	600	A>G	AAA>AAG	L>L	Transition	Silent				
	619	C>A	CGA>AGA	R>R	Transversion	Silent				
	795	A>T	ATA>ATT	I>I	Transversion	Silent				
	825	T>C	GAT>GAC	D>D	Transition	Silent				
	838	G>A	GGT>AGT	G>S	Transition	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *CYP1A* بناء على الرقم التسلسلي XM_019064218.2 الذي تم الحصول عليه من NCBI
 SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ; G : Guanine;
 G: Glycine; L:leucine; S: Serine; T: Threonine; R: Arginine; I:Isoleucine; D: Aspartic acid.

أوضحت النتائج قدرة B(ghi)P على التطهير حيث تبين وجود 10 طفرات ثلاث منها مؤثرة، وهذا يتوافق مع دراسة مختبرية أجراها (Cherng *et al.*, 2001) على خلايا الكبد البشرية حيث تسبب B(ghi)P باستحثاث التعبير الجيني لـ *CYP1A1* بواسطة مسار مستقبل الهيدروكربون أريل AHR.



شكل (8-4) مقارنة تنابعات جين *CYP1A* لمجموعة B(ghi)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2

5.2.6.4: مجموعة B(ghi)P 10µg/kg

أظهرت نتائج تحليل تتابع النيوكليوتيدات (Sequencing) لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg وجود تغيرات في القواعد النيتروجينية في الأكسون الثاني وتحديداً في المواقع 519 و 527 و 546 و 588 و 600 و 611 و 619 و 795 و 804 و 838 و 840 و 849 و 850 من جين *CYP1A* إذ تغيرت القاعدة G إلى C في الموقعين (G519C) و (G527C) و C إلى A (C546A) و C إلى T (C588T) و A إلى G (A600G) و G إلى T (G611T) و C إلى A (C619A) و A إلى T (A795T) و C إلى G (C804G) و G إلى A (G838A) و T إلى C في الموقعين (T840C) و (T849C) و T إلى A (T850A) وكما مبيّن في جدول (4-13) وشكل (4-9).

كذلك أوضح الجدول (4-13) أنّ التشكلات G527C و G611T و G838A و T840C و T850A أدت إلى تغيير الشفرات الوراثية، مما أدى إلى تغير الأحماض الأمينية على مستوى البروتين الناتج من سيرين (S) إلى ثريونين (T) ومن سيرين (S) إلى ايزوليوسين (I) ومن كلايسين (G) إلى سيرين (S) ومن ليوسين (L) إلى ميثونين (M) على التوالي، وكانت الطفرات مؤثرة أما G519C و C546A و C588T و A600G و C619A و A795T و C804G و 849C، فعلى الرغم من تغير الشفرات الوراثية فيها من CTG إلى CTC ومن GGC إلى GGA ومن CGC إلى CTG ومن AAA إلى AAG ومن CGA إلى AGA ومن ATA إلى ATT ومن GGC إلى GGG ومن AAT إلى AAC على التوالي إلا أنّها أعطت الحوامض الأمينية نفسها، ليوسين (L) و كلايسين (G) و أرجنين (R) وليوسين (L) و أرجنين (R) و ايزوليوسين (I) وكلايسين (G) و أسبارجين (N) على التوالي أي أنّ الطفرات صامتة ويعود السبب في ذلك إلى أنّ هذه الحوامض الأمينية تمتلك أكثر من شفرة وراثية.

جدول (4-13) تغيرات النيوكليوتيدات ونوع الطفرات وتغيرات الأحماض الأمينية الناتجة وتأثيرها في عملية ترجمة جين *CYP1A* لمجموعة B(ghi)P 10µg/kg.

الجين	موقع ^a SNP	النيوكليوتيدات (SNPs)	الكود الثلاثي	أحماض أمينية	نوع الطفرة	تأثير الطفرة على الترجمة	Missense mutation %	Silent mutation %	Non-sense mutation %	Frameshift mutation %
<i>CYP1A</i>	519	G>C	CTG>CTC	L>L	Transversion	Silent	38	62	-	-
	527	G>C	AGC>ACC	S>T	Transversion	Missense				
	546	C>A	GGC>GGA	G>G	Transversion	Silent				
	588	C>T	CGC>CTG	R>R	Transition	Silent				
	600	A>G	AAA>AAG	L>L	Transition	Silent				
	611	G>T	AGC>ATC	S>I	Transition	Missense				
	619	C>A	CGA>AGA	R>R	Transversion	Silent				
	795	A>T	ATA>ATT	I>I	Transversion	Silent				
	804	C>G	GGC>GGG	G>G	Transversion	Silent				
	838	G>A	---	--	Transition	Missense				
	840	T>C	GGT>AGC	G>S	Transition	Missense				
	849	T>C	AAT>AAC	N>N	Transition	Silent				
	850	T>A	TTG>ATG	L>M	Transversion	Missense				

a: مواقع النيوكليوتيدات لجين *CYP1A* بناء على الرقم التسلسلي XM_019064218.2 الذي تم الحصول عليه من NCBI
 SNP: single nucleotide polymorphism; C: Cytosine; T:Thymine; A: Adenine ; G : Guanine; L:leucine; S: Serine; T: Threonine; G: Glycine; R: Arginine; I:Isoleucine; N :Asparagine; M: Methionine.

بيّنت النتائج زيادة في عدد الطفرات بزيادة التركيز من 1 إلى 10 (µg/kg)، حيث ازداد عدد الطفرات من 10 إلى 13 طفرة. سبع من هذه الطفرات التي تم الحصول عليها كانت طفرات تحويل Transversion، تغيرت فيها القواعد النيتروجينية من البيورين إلى مجموعة البايريمدين أو العكس ، أما الطفرات الست الأخرى فكانت طفرات استبدال Transition تحولت فيها القواعد النيتروجينية من قاعدة إلى أخرى من نفس النوع (بيورين – بيورين) أو (بايريمدين – بايريمدين).

	430	440	450	460	470	480	490
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	CAGATCGGCA	TGCGTCCCGT	AGTGGTGCTC	AGCGGAAACG	ACGTGATCCG	TCAAGCTCTC	CTCAAAACAAG
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F
	500	510	520	530	540	550	560
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	GCGAGGAGTT	CGCCGGACGT	CCGGATCTGT	ACAGCAGCAG	GTTTCATCGGT	GATGGCAAGA	GCCTGGCCTT
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F
	570	580	590	600	610	620	630
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	TAGTACGGAT	CAGGTGGGTG	TCTGGCGCGC	CCGTCGCAAA	CTGGCCCTCA	GCGCCCTCGG	AACATTTTCC
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F
	640	650	660	670	680	690	700
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	ACGGTGAAG	GCGAAAGCTC	AGAGTATICA	TGTGCCCTTG	AGGAGCACAT	CAGCAAGGAA	GGTCTCTATC
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F
	710	720	730	740	750	760	770
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	TGATTGAACG	GCTTCACAAC	GTGATGAAGG	CTGACGGGAG	TTTCGATCCC	TTCCGGCACA	TGCTGGTGTG
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F
	780	790	800	810	820	830	840
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	TGTGGCCAAC	GTGATCTGTG	GGATATGCTT	CGGCCGGCGC	TACAGCCACG	ACGATGACGA	GCTGGTGGGT
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F
	850	860	870				
PREDICTED: <i>Cyprinus carpio</i> c	TTGGTCAATT	TGAGCCGACGA	GTTCGGGAAG				
C56_CYP1A1-F
C57_CYP1A1-F
C61_CYP1A1-F
C62_CYP1A1-F
C65_CYP1A1-F

شكل (9-4) مقارنة تنابعات جين *CYP1A* لمجموعة $10\mu\text{g/kg}$ B(ghi)P مع رقم الانضمام

XM_019064218.2

بيّنت النتائج النهائية لهذه الدراسة أنّ مركب B(a)P أعلى قدرة تطفيرية من B(ghi)P وفي كلا التركيزين ($1,10\mu\text{g/kg}$) حيث كان عدد الطفرات لـ B(a)P 24 و 31 طفرة في جيني *AhR2* و *CYP1A* على التوالي، بينما كان عدد الطفرات الكلية لـ B(ghi)P 8 و 23 طفرة في جيني *AhR2* و *CYP1A* على التوالي، وقد يعود السبب في ذلك إلى اختلاف التركيب الهيكلي للمركبين، حيث

يملك B(a)P منطقة bay ، بينما B(ghi)P يفتقر إلى منطقة bay ، ويمتلك بدلاً عنها منطقة K، وبالتالي لا يُمكن تحويله بشكل استقلابي، مثل B(a)P إلى dihydrodiol poxides التي تُعد مستقلبات نهائية مُسببة للطفرات، وبدلاً منها يتم تحويل مناطق K من B(ghi)P إلى arene oxides ، مما ينتج عنه 3,4- oxide و 3,4,11,12 bisoxides ، إذ يلعب 3,4- oxide دوراً مهماً باعتباره المستقلب المطفر النهائي لـ B(ghi)P (Pan *et al.*, 2013; Platt and Grupe, 2005) وهذا يتوافق مع دراسة لـ Pan *et al.*, (2013) بين فيها أنّ النواتج الأيضية لـ B(ghi)P تتلف الحامض النووي بمقدار أقل من النواتج الأيضية لـ B(a)P .

لُوحظ من نتائج الدراسة أنّ جين *CYP1A* أكثر تأثراً بمركبي B(a)P و B(ghi)P وفي كلا التركيزين من جين *Ahr2* حيث كان عدد الطفرات الكلية فيه 29 و 23 طفرة على التوالي، بينما كان عدد طفرات جين *Ahr2* 24 و 8 على التوالي، قد يعود السبب في ذلك إلى وظيفته المباشرة في أيض هذه المركبات، حيث أظهرت العديد من الدراسات قدرته الاستقلابية الفاعلة في توليد المستقلبات النهائية المسببة للطفرات (Hodek *et al.*, 2013; Williams *et al.*, 2022).

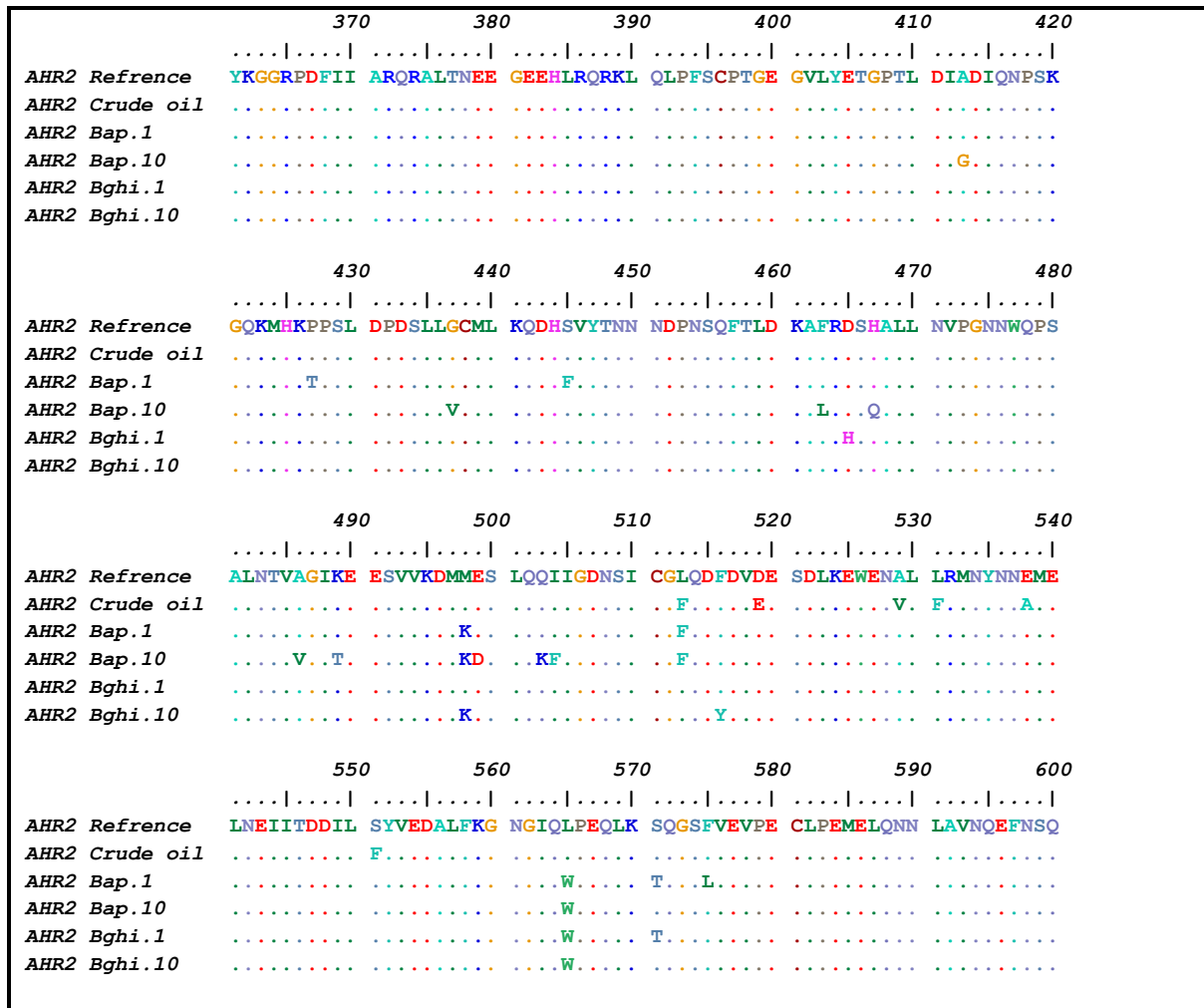
أحد التفسيرات المحتملة لظهور الطفرات للحامض النووي في الخلايا غير المعرضة بصورة مباشرة لـ PAHs ، هو أنّ بعض مستقلبات هذا المركبات المتكونة في الكبد وكذلك المركبات غير الأيضية قد تم إفرازها بواسطة بروتين ناقل المرحلة الثالثة وبالتالي وصلت إلى هذه المناطق، مما تسبب في تلف الحامض النووي وزيادة نشاط وتعبير *CYP1A*، بروتينات ناقل الغشاء المسماة ABC هي المسؤولة عن تدفق مستقلبات التحول الأحيائي التي تُميز مرحلة التحول الأحيائي الثالثة (Ferreira *et al.*, 2014) وهي في الأسماك تعزز قذف المواد الحيوية الغريبة والمستقلبات غير المعدلة الناتجة عن المرحلة الأولى أو المرحلة الثانية (Paetzold *et al.*, 2009).

7.4: تركيب البروتين ثلاثي الأبعاد 3-D protein structure

1.7.4: تركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لجين *Ahr2*

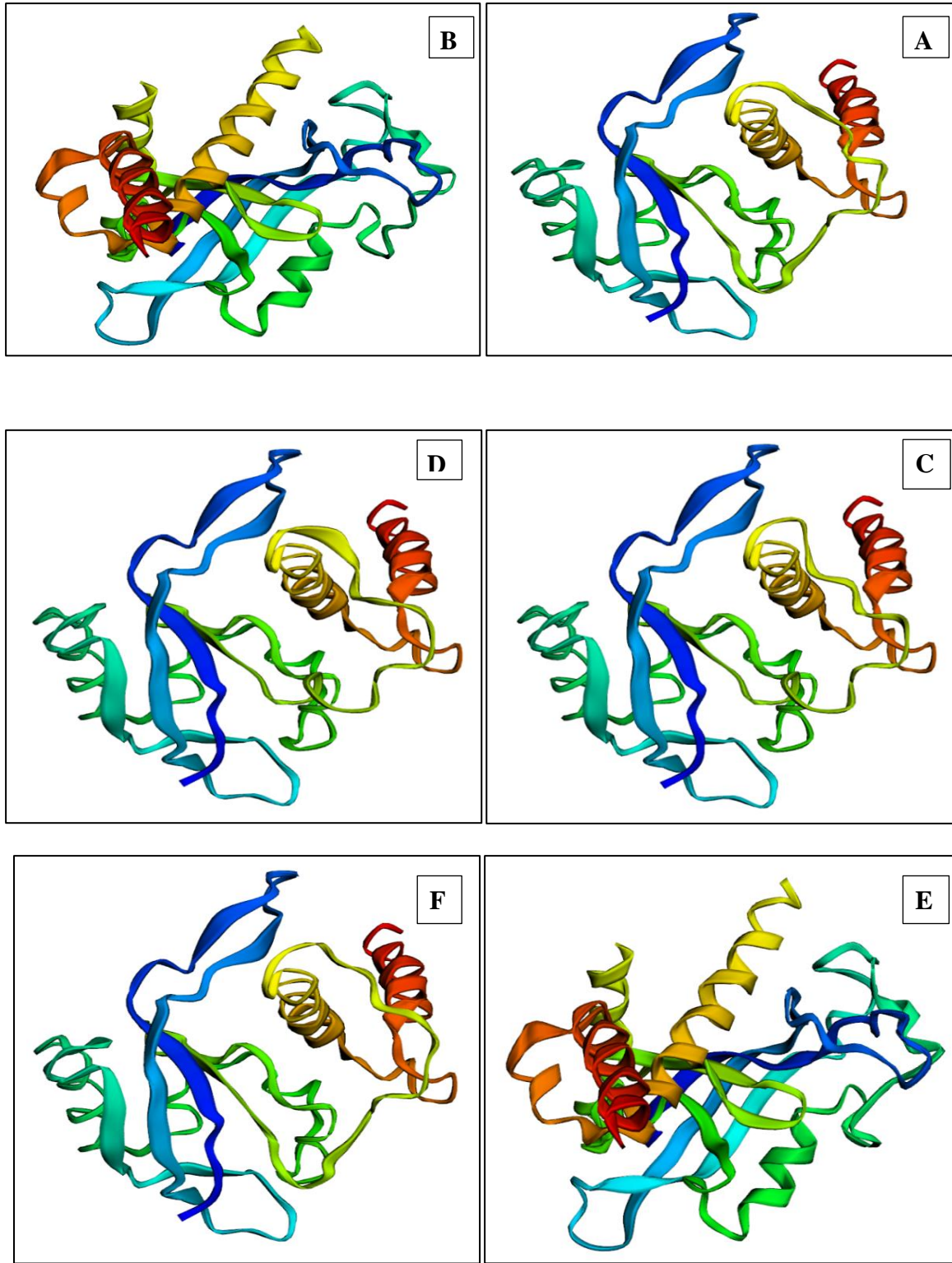
بيّنت محاذاة تتابع الأحماض الأمينية في جين *Ahr2* لمجاميع [Crude oil ، B(a)P /kg ، 1µg B(a)P 10µg/kg ، B(ghi)P 1µg/kg ، B(ghi)P 10µg/kg] مع رقم الانضمام XM_042749540.1 (علما ان تتابع مجموعة السيطرة متطابق تماما مع رقم الانضمام المذكور أنفا) الشكل (4-10) وجود طفرات وراثية أدت إلى تغيير الأحماض الأمينية إذ تم الكشف عن 6

تغيرات في مجموعة النفط الخام و 7 تغيرات في مجموعة B(a)P 1µg/kg ، و 12 تغيرًا في مجموعة B(a)P 10µg/kg ، 3 تغيرات لكل من مجموعتي B(ghi)P 1µg/kg و B(ghi)P 10µg/kg . إنَّ تواجد SNP في منطقة الأكسون قد يُؤدي إلى تغيير في الشفرة الوراثية (Codon) لـ mRNA ، وبالتالي قد تغيير الأحماض الأمينية في أثناء عملية الترجمة، ثم تغيير في هيكل وشكل سلسلة الببتيد مما يُحدث خللاً أو تغييرًا في وظيفة البروتين الناتج (Kimchi-Sarfaty et al., 2007)، أُستخدمت برامج المعلوماتية الحيوية للتنبؤ بتركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لتحديد مكان تغيير الأحماض الأمينية في بروتين AhR2 في المجاميع المذكورة آنفًا الشكل (4-10)، إذ أدت هذه التشكلات إلى تغيرات في بنية البروتين الذي يحتوي على مناطق مختلفة ذات أهمية من الناحية الوظيفية، كما موضح في الشكل (4-11).



شكل (4-10) مقارنة تتابع الأحماض الأمينية في جين *Ahr2* لمجاميع (Crude oil ، B(a)P 1µg/kg ، kg/kg)

XM_042749540.1 مع رقم الانضمام (B(ghi)P 10µg/kg ، B(ghi)P 1µg/kg ، B(a)P 10µg

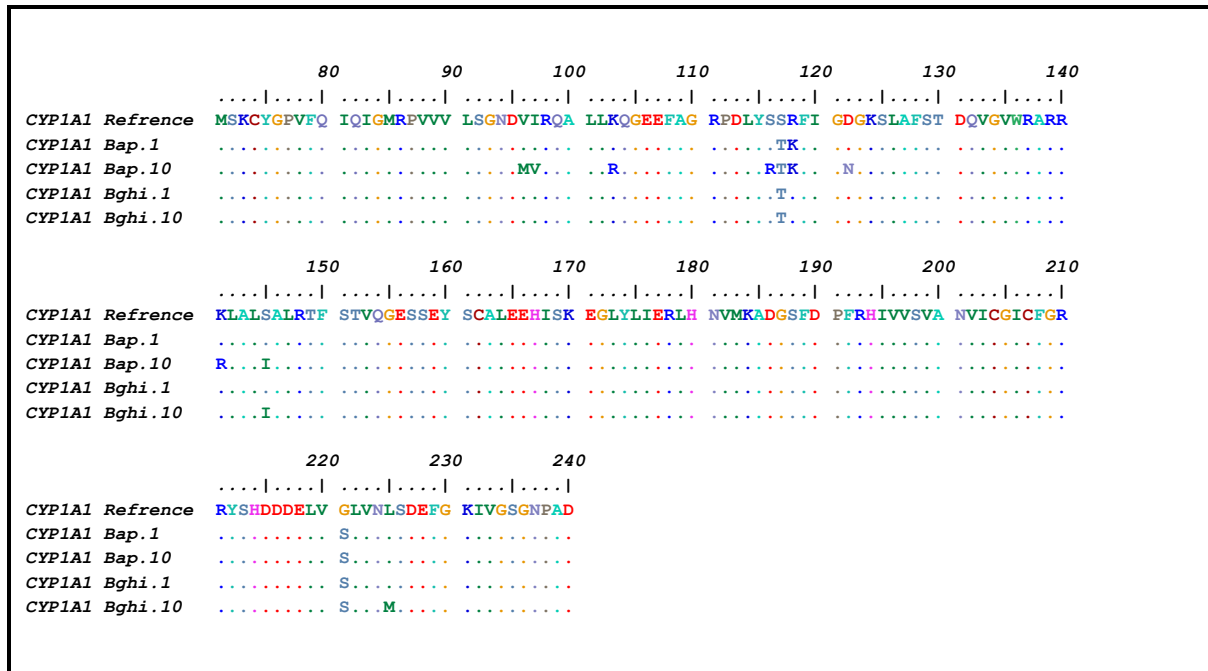


شكل (4-11) الأشكال ثلاثية الأبعاد لبروتين *AhR2* في رقم الانضمام XM_042749540.1، (B) النفط الخام، (C) B(a)P 1µg/kg (D) B(a)P 10µg/kg (E) B(ghi)P 1µg/kg (F) B(ghi)P 10µg/kg

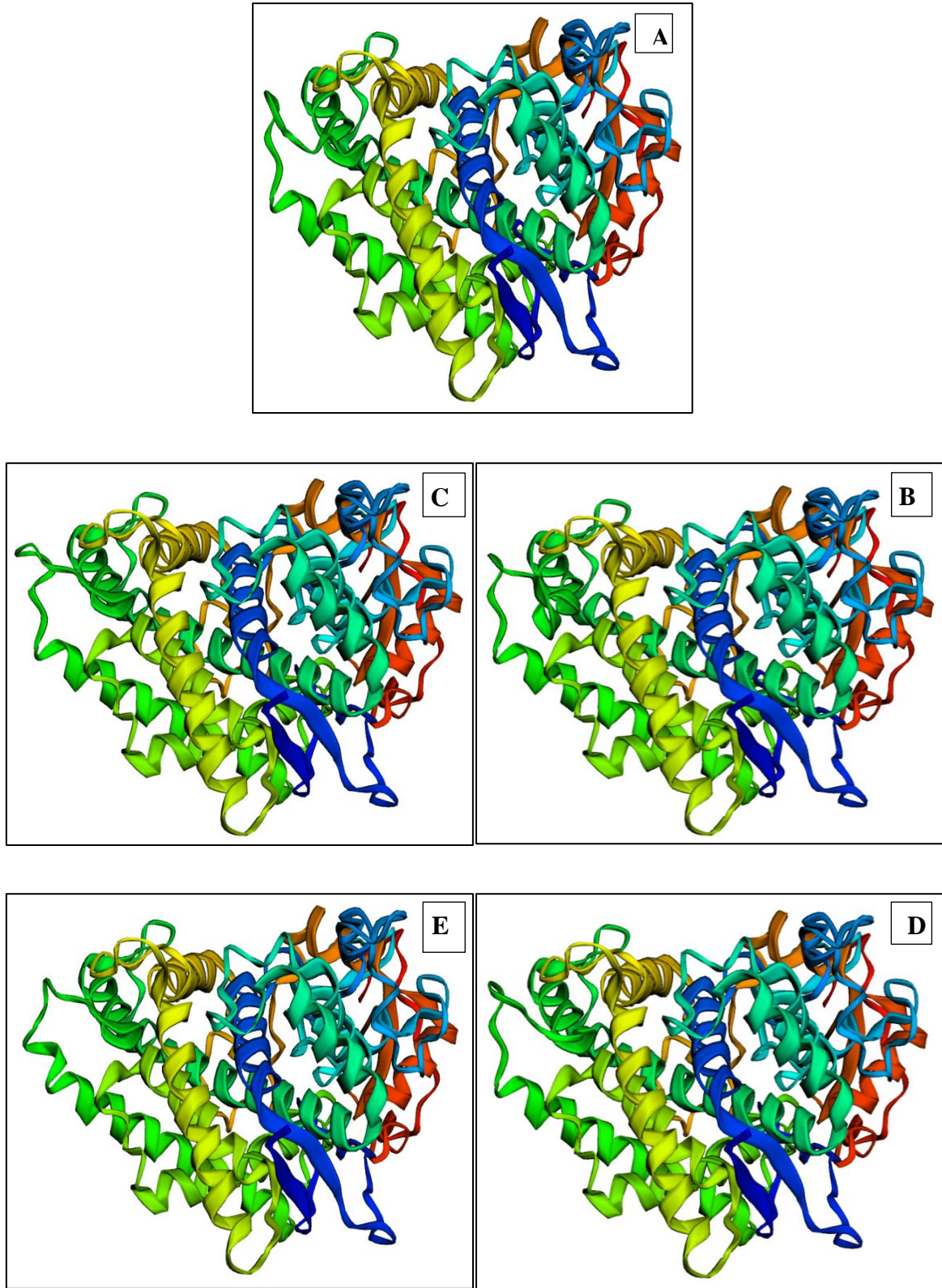
2.7.4: تركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لجين *CYP1A1*

كشفت محاذاة تتابع الأحماض الأمينية في جين *CYP1A1* لمجاميع [B(a)P 10µg/kg ، B(a)P 1µg/kg ، B(ghi)P 10µg/kg ، B(ghi)P 1µg/kg] مع رقم الانضمام XM_019064218.2 (علما ان تتابع مجموعة السيطرة متطابق تماما مع رقم الانضمام المذكور أنفا) الشكل (12-4) عن وجود طفرات وراثية أدت إلى تغيير الأحماض الأمينية إذ تم الكشف عن 3 تغييرات في مجموعة B(a)P 1µg/kg ، و 10 تغييرات في مجموعة B(a)P 10µg/kg ، وتغيرين اثنين في مجموعة B(ghi)P 1µg/kg و 4 تغييرات في مجموعة B(ghi)P 10µg/kg.

أستخدمت برامج المعلوماتية الحيوية للتنبؤ بتركيب البروتين ثلاثي الأبعاد لتحديد مكان تغيير الأحماض الأمينية في بروتين *CYP1A1* في المجاميع المذكورة أنفا الشكل (12-4)، إذ أدت هذه التشكلات إلى تغييرات في بنية البروتين الذي يحتوي على مناطق مختلفة ذات أهمية من الناحية الوظيفية، كما موضح في الشكل (13-4).



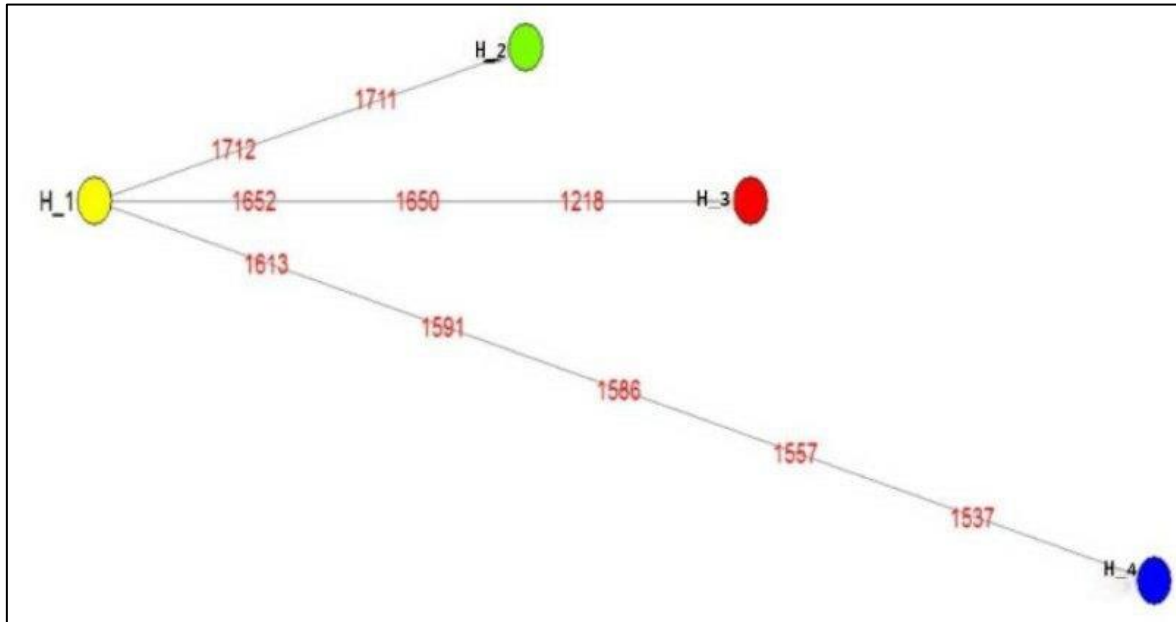
شكل (12-4) مقارنة تتابع الأحماض الأمينية لمجاميع جين *CYP1A1* ، B(a)P 10µg/kg ، B(a)P 1µg/kg ، B(ghi)P 10µg/kg ، B(ghi)P 1µg/kg مع رقم الانضمام XM_019064218.2



شكل (4-13) الأشكال ثلاثية الأبعاد لبروتين *CYP1A* في (A) رقم الانضمام XM_019064218.2، (B) B(a)P 1µg/kg (C) B(a)P 1µg/kg (D) B(ghi)P 1µg/kg (E) B(ghi)P 10µg/kg

8.4: شبكة الأنماط الفردية Haplotypes network**1.8.4: جين AhR2****1.1.8.4: مجموعة النفط الخام**

أظهرت النتائج أن عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *AhR2* في مجموعة النفط الخام تساوي 4 أنماط فردية كما في الشكل (4-14)، وقد اختلف النمط الفردي H-2 عن النمط الوراثي H-1 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1711 و 1712)، كذلك اختلف النمط الفردي H-3 عن النمط الوراثي H-1 بالقواعد النيتروجينية (1218 و 1650 و 1652 و 1613)، كما اختلف النمط الفردي H-4 عن النمط الوراثي H-1 بالقواعد النيتروجينية (1537 و 1557 و 1586 و 1591 و 1612).

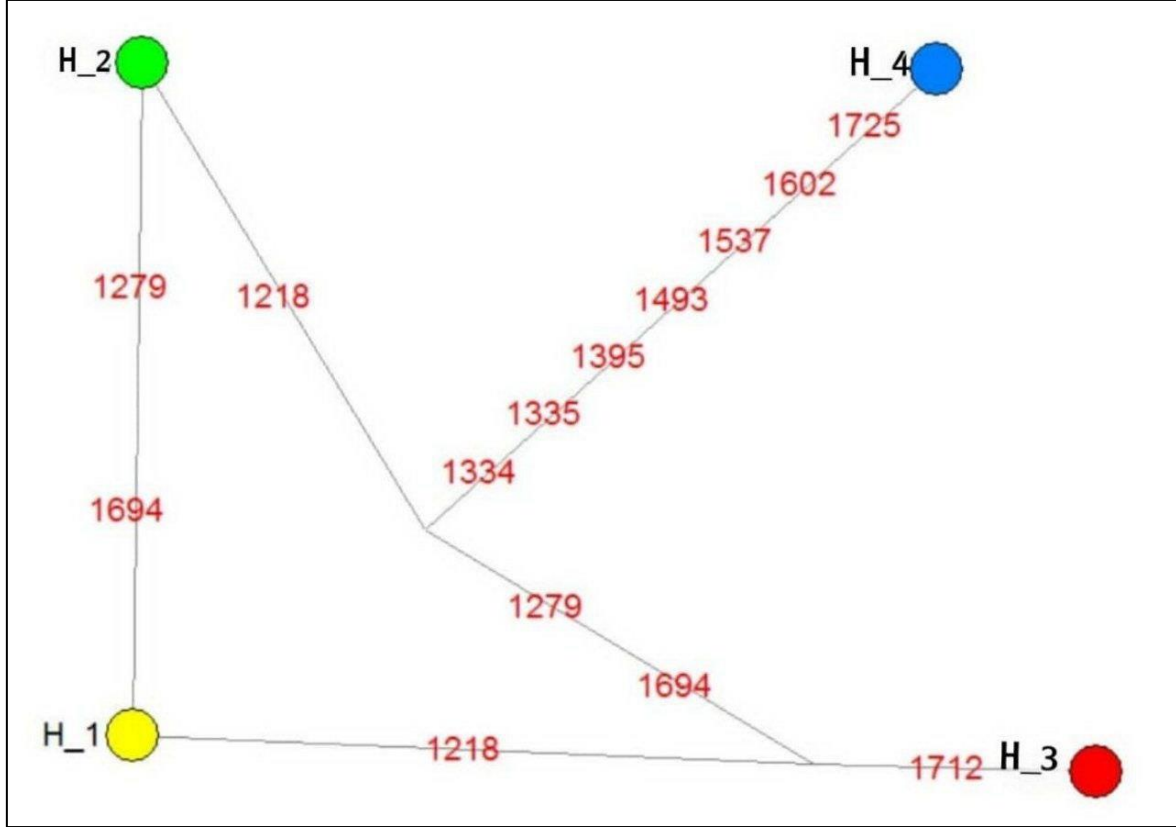


شكل (4-14) شبكة الأنماط الفردية لجين *AhR2* لمجموعة النفط الخام

2.1.8.4: مجموعة B(a)P 1µg/kg

أظهرت النتائج أن عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *AhR2* في مجموعة 1 µg/kg B(a)P تساوي 4 أنماط فردية، كما في الشكل (4-15)، وقد اشترك النمط الفردي H-3 مع النمط الوراثي H-1 بالقاعدة النيتروجينية 1218، كما انفرد هذا النمط بالقاعدة النيتروجينية (1712). اشترك النمط الفردي H-4 مع النمط الفردي H-2 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1279 و 1694)، كما انفرد هذا النمط بالقواعد النيتروجينية (1334 و 1335 و 1395 و 1493 و 1537 و 1602 و 1725). اختلف النمط الفردي H-2 مع النمط الوراثي H-1 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1279 و

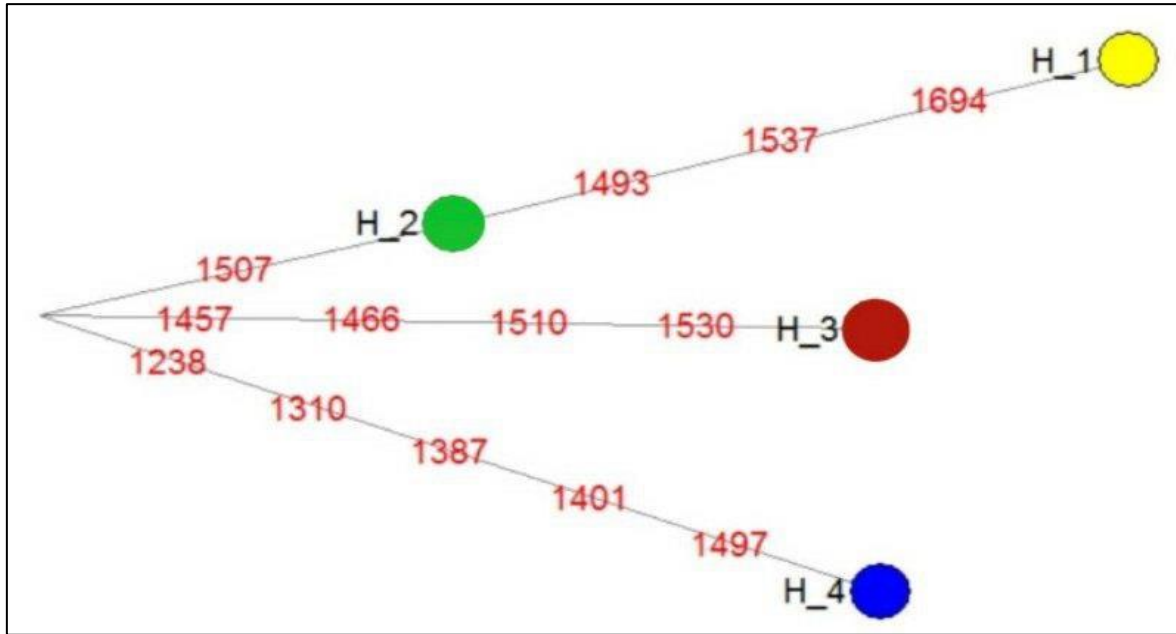
(1694)، كذلك اختلف النمط الفردي H-3 مع النمط الوراثي H-1 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1218 و1712).



شكل (4-15) شبكة الأنماط الفردية لجين *AhR2* لمجموعة B(a)P 1µg/kg

3.1.8.4: مجموعة B(a)P 10µg/kg

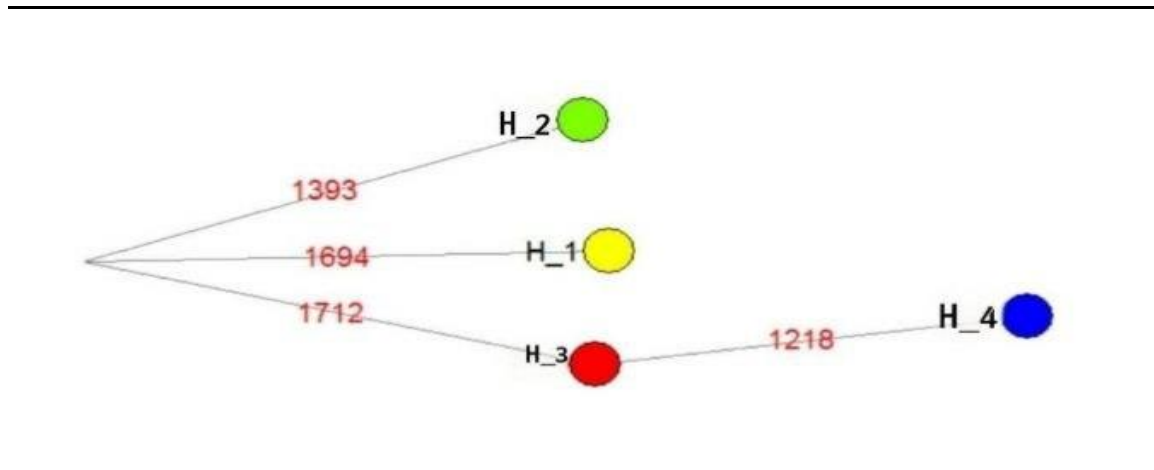
أظهرت النتائج أنّ عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *AhR2* في مجموعة B(a)P 10µg/kg تساوي 4 أنماط فردية كما في الشكل (4-16)، وقد اشتركت الأنماط الفردية H-2 وH-3 وH-4 بالقواعد النيتروجينية 1493 و1537 و1694 وهي ذاتها تمثل نقاط الاختلاف بين النمط الفردي H-2 والنمط الوراثي H-1، كذلك اشترك النمطان الفرديان H-3 وH-4 بالقاعدة النيتروجينية 1507. انفرد النمط الفردي H-3 بالقواعد النيتروجينية (1447 و1466 و1510 و1530)، كما انفرد النمط الفردي H-4 بالقواعد النيتروجينية (1238 و1310 و1387 و1401 و1497).



شكل (4-16) شبكة الأنماط الفردية لجين *AhR2* لمجموعة B(a)P 10µg/kg

4.1.8.4: مجموعة B(ghi)P 1µg/kg

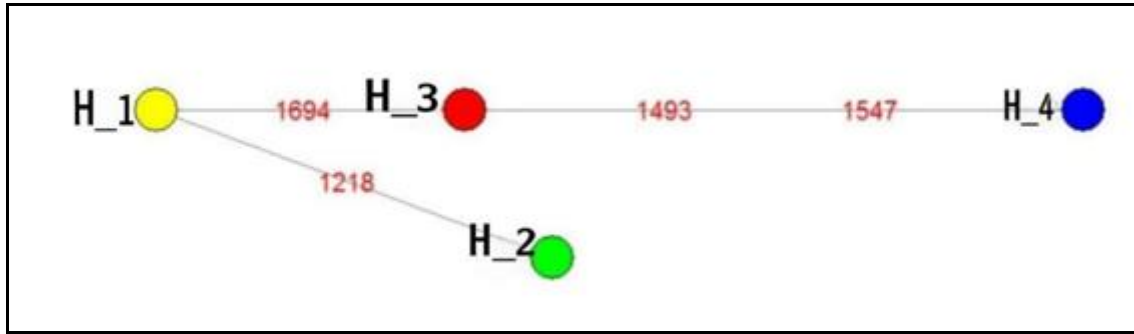
أظهرت النتائج أن عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *AhR2* في مجموعة B(a)P 1µg/kg تساوي 4 أنماط فردية، كما في الشكل (4-17)، وقد اشتركت الأنماط الفردية H-2 و H-3 و H-4 بالقاعدة النيتروجينية 1694، كما اشترك النمطان الفرديان H-3 و H-4 بالقاعدة النيتروجينية (1712). اختلف النمط الفردي H-3 عن النمط الوراثي H-1 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1694 و 1712)، كما اختلف النمط الفردي H-2 عن النمط الوراثي H-1 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1694 و 1393)، هذا وقد اختلف النمط الفردي H-4 عن النمط الوراثي H-3 بالقاعدة النيتروجينية (1218).



شكل (4-17) شبكة الأنماط الفردية لجين *AhR2* في مجموعة B(ghi)P 1µg/kg

5.1.8.4: مجموعة B(ghi)P 10µg/kg

أظهرت النتائج أنّ عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *Ahr2* في مجموعة /kg H-3 و H-4 بالقاعدة النيتروجينية 1694 وهي موقع الاختلاف الوحيد بين النمط الفردي H-3 والنمط الوراثي H-1 ، كما اختلف النمط الفردي H-2 عن النمط الوراثي H-1 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (1218)، كذلك اختلف النمط الفردي H-4 عن H-3 بالقاعدتين النيتروجينيتين (1493 و 1547).

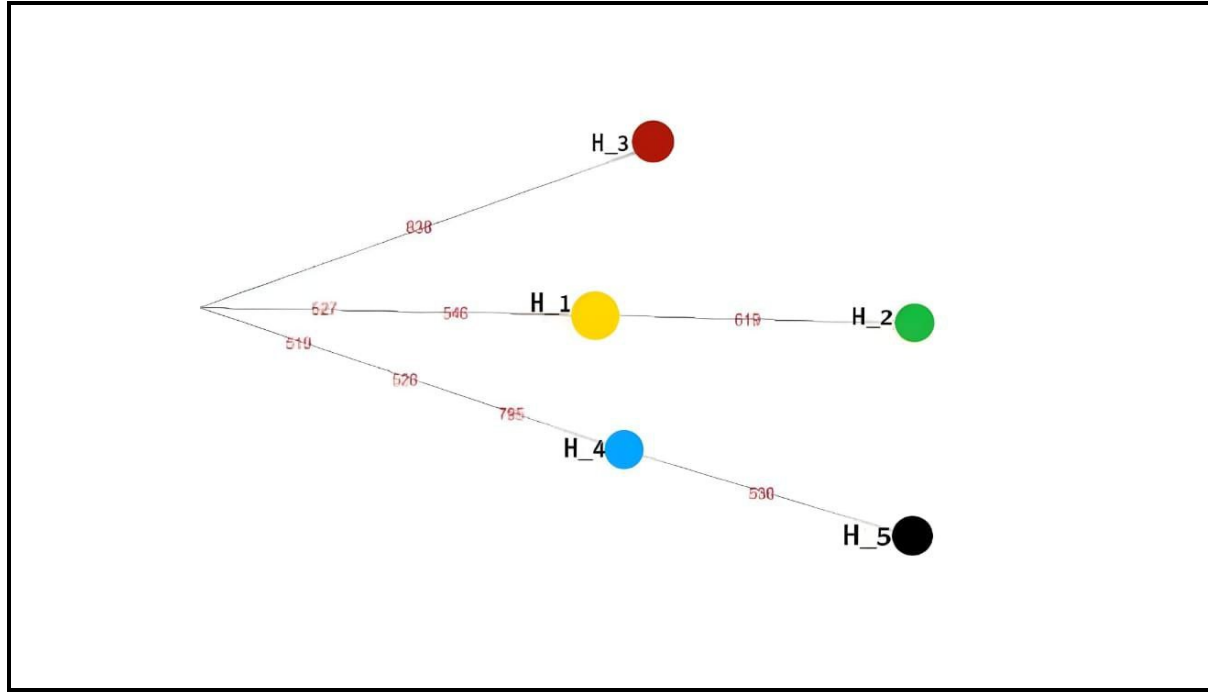


شكل (18-4) شبكة الأنماط الفردية لجين *Ahr2* في مجموعة B(ghi)P 10µg/kg

2.8.4: جين *CYP1A***1.2.8.4: مجموعة B(a)P 1µg/kg**

أظهرت النتائج أنّ عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *CYP1A* في مجموعة B(a)P 1µg/kg تساوي 5 أنماط فردية كما في الشكل (19-4)، اشتركت الأنماط الفردية H-3 و H-4 و H-5 بقاعدتين نيتروجينيتين هما (527 و 546)، كما اشتركت الأنماط الفردية H-4 و H-5 بالقواعد النيتروجينية (519 و 528 و 795).

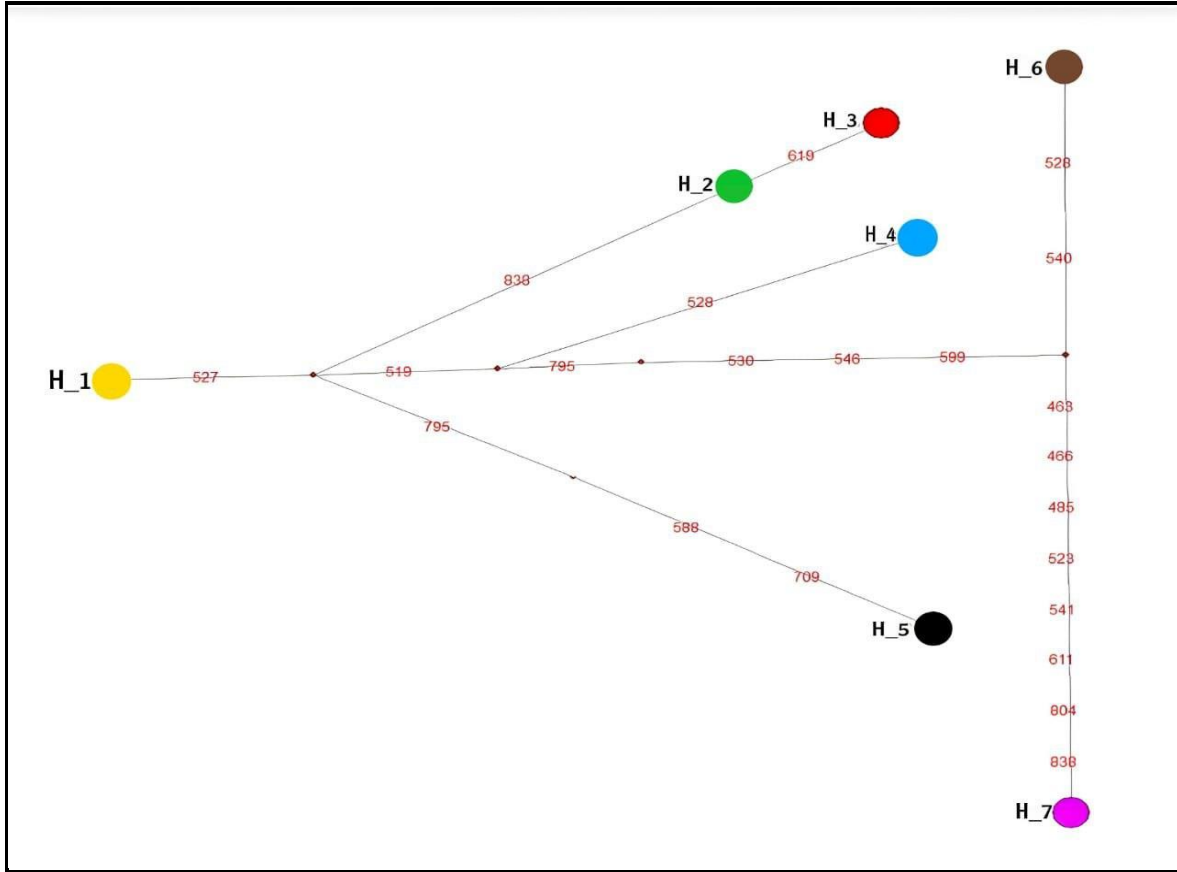
اختلف النمط الفردي H-2 عن H-1 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (619)، بينما اختلف H-5 عن H-4 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (530)، كذلك انفرد النمط الفردي H-3 عن جميع الأنماط الأخرى بالقاعدة النيتروجينية (838).

شكل (19-4) شبكة الأنماط الفردية لجين *CYP1A* لمجموعة B(a)P 1µg/kg

2.2.8.4: مجموعة B(a)P10µg/kg

أظهرت النتائج أن عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *CYP1A* في مجموعة B(a)P 10µg/kg تساوي 7 أنماط فردية كما في الشكل (4-20)، وكانت الأنماط الفردية H-2 و H-3 و H-4 و H-5 و H-6 و H-7 مشتركة في قاعدة نيتروجينية واحدة هي (527)، كما اشتركت كل من الأنماط الفردية H-4 و H-6 و H-7 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (519)، وكذلك اشتركت الأنماط الفردية H-5 و H-6 و H-7 بالقاعدة النيتروجينية (795)، كما أن الأنماط الفردية H-6 و H-7 اشتركت بالقواعد النيتروجينية (530 و 546 و 599 و 795)، وأيضاً اشتركت الأنماط الفردية H-4 و H-6 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (528)، وكذلك اشتركت الأنماط الفردية H-2 و H-3 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (838).

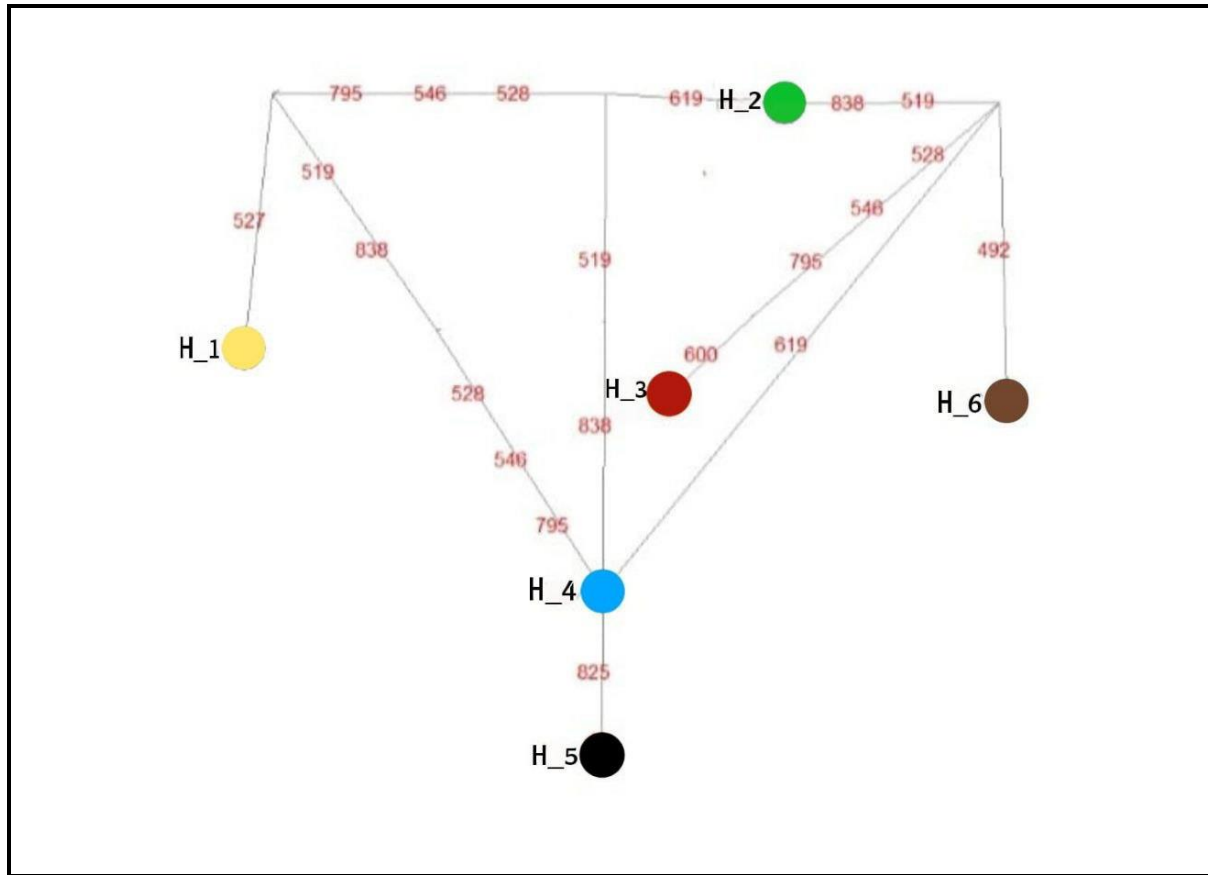
اختلف النمط الفردي H-2 و H-3 بقاعدة نيتروجينية واحدة هي (619)، كما اختلف النمط الفردي H-5 بالقاعدتين النيتروجيتين (588 و 709)، كذلك اختلف النمطان الفرديان H-6 و H-7 عن بعضهما بالقواعد النيتروجينية (463 و 466 و 485 و 523 و 528 و 540 و 541 و 611 و 804 و 838).



شكل (4-20) شبكة الأنماط الفردية لجين *CYP1A* في مجموعة B(a)P 10µg/kg

3.2.8.4: مجموعة B(ghi)P 1µg/kg

أظهرت النتائج أن عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *CYP1A* في مجموعة B(ghi)P 1µg/kg تساوي 6 أنماط فردية كما في الشكل (4-21)، وقد اشتركت الأنماط الفردية H-2 و H-3 و H-4 و H-5 و H-6 والقاعدة النيتروجينية (527)، كما اشتركت الأنماط الفردية H-3 و H-4 و H-5 و H-6 والقاعدتين النيتروجينيتين (519 و 838) كذلك اشتركت الأنماط الفردية 2H-4 و H-5 و H-6 والقواعد النيتروجينية (528 و 546 و 795)، كما اختلفت الأنماط الفردية H-2 و H-3 و H-6 عن الأنماط الفردية H-4 و H-5 بالقاعدة النيتروجينية (619)، كذلك اختلفت الأنماط الفردية H-2 و H-4 و H-5 و H-6 عن النمط الفردي H-3 بالقواعد النيتروجينية (528 و 546 و 795)، وقد انفرد النمط الفردي H-3 بالقاعدة النيتروجينية (600)، كما انفرد النمط الفردي H-6 بالقاعدة النيتروجينية (492) أما النمط الفردي H-5، فقد انفرد بالقاعدة النيتروجينية (825) وهي موقع الاختلاف الوحيد بين هذا النمط والنمط الفردي H-4.

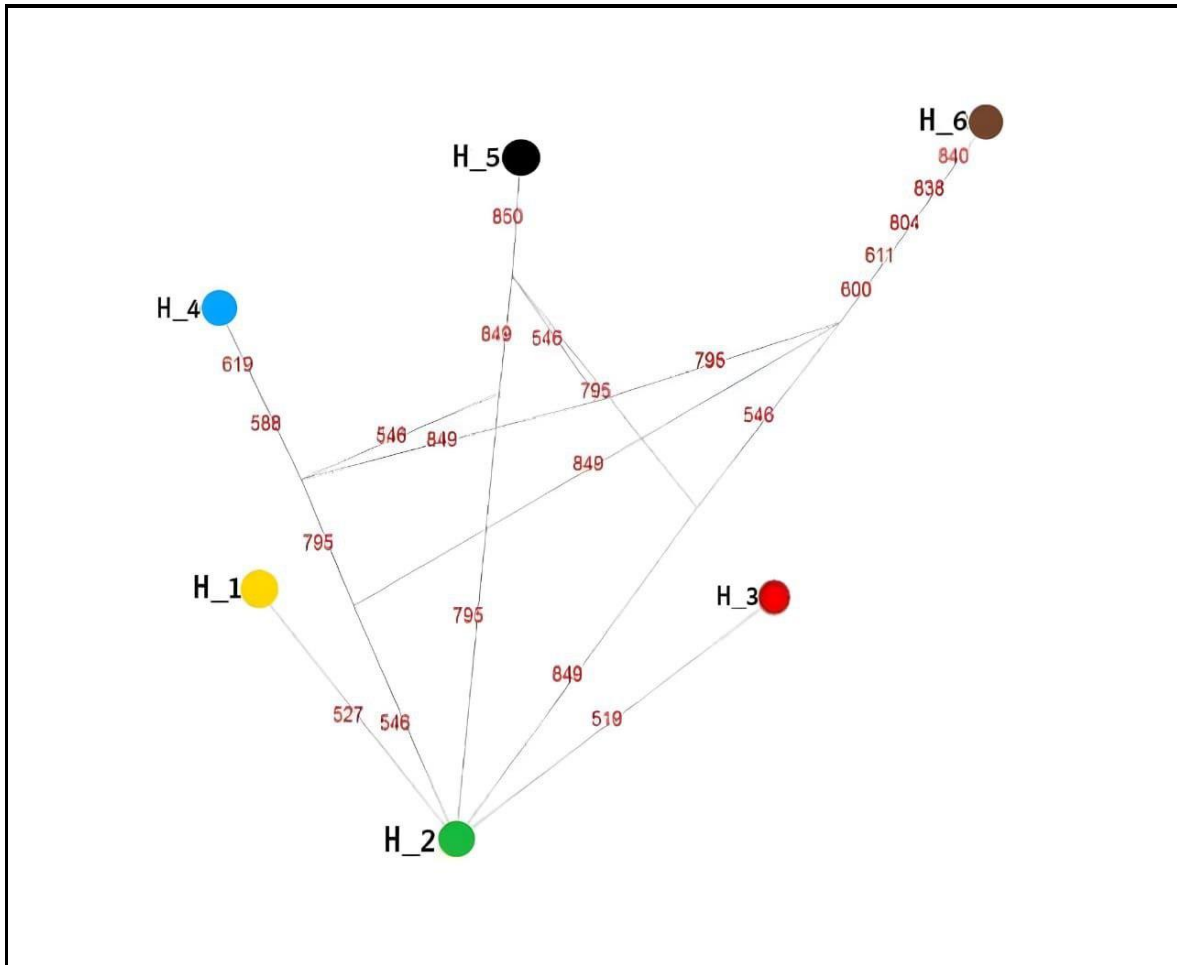


شكل (4-21) شبكة الأنماط الفردية لجين *CYP1A* في مجموعة B(ghi)P 1µg/kg

4.2.8.4: مجموعة B(ghi)P 10µg/kg

أظهرت النتائج أنّ عدد الأنماط الفردية الكلية (Haplotype) لجين *CYP1A* في مجموعة B(ghi)P 10µg/kg تساوي 6 أنماط فردية كما في الشكل (4-22)، وقد اشتركت الأنماط الفردية H-2 و H-3 و H-4 و H-5 و H-6 بالقاعدة النيتروجينية (527)، وبهذا اختلف النمط الفردي H-2 عن النمط الوراثي H-1 بهذه القاعدة النيتروجينية فقط، كما ظهر اشتراك النمط الفردي H-6 مع النمط الفردي H-4 بالقاعدة النيتروجينية (546)، كذلك اشترك مع النمط الفردي H-5 بالقاعدة النيتروجينية (849) هذا وقد أظهر انفرادًا بالقواعد النيتروجينية (600 و 611 و 804 و 838 و 840).

اختلف النمط الفردي H-3 عن النمط الفردي H-2 بالقاعدة النيتروجينية (519) وهو الموقع الذي انفرد به النمط الفردي H-3 فقط. اشترك النمط الفردي H-5 مع النمط الفردي H-4 بالقاعدة النيتروجينية (795)، كما أظهر هذا النمط انفرادًا بالقاعدة النيتروجينية (850). اشترك النمط الفردي H-4 مع النمط الفردي H-5 بالقاعدة النيتروجينية (750) هذا وقد انفرد بالقواعد النيتروجينية (588 و 619).



شكل (4-22) شبكة الأنماط الفردية لجين *CYP1A* في مجموعة B(ghi)P 10µg/kg

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

5: الاستنتاجات والتوصيات

1.5: الاستنتاجات

- هذه الدراسة هي الأولى التي تقدم نتائج مختبرية عن التباين الوراثي في جيني *AhR2* و *CYP1A* لسمة الكارب الشائع الناتج عن التعرض للنفط الخام ومركبي B(a)P و B(ghi)P بتركيزي (1،10 µg/kg) وأستنتج ما يأتي:
1. قابلية أسماك الكارب الشائع على مراكمة مركبات PAHs في أنسجتها المختلفة عند تعرضها للنفط الخام.
 2. سجلت الأحشاء الداخلية تراكيز أعلى من مركبات PAHs كلية مقارنة بالعضلات وكانت تراكيز مركبات PAHs ذات الوزن الجزيئي العالي أعلى من تراكيز مركبات PAHs ذات الوزن الجزيئي الواطئ في أنسجة الأسماك المعرضة للنفط الخام
 3. تسبب النفط الخام بطفرات عديدة في جين *AhR2* وتغيير في الأحماض الأمينية وشكل البروتين ثلاثي الأبعاد (3D)، وتم الكشف عن أنماط فردية جديدة.
 4. تسبب مركبي B(a)P و B(ghi)P بتركيزي (1،10 µg/kg) لكل منهما بطفرات عديدة في جيني *AhR2* و *CYP1A* وتغيير في الأحماض الأمينية وشكل البروتين ثلاثي الأبعاد (3D)، وتم الكشف عن أنماط فردية جديدة في كلا التركيزين ولكلا الجينين.
 5. مركب B(a)P أعلى قدرة تطفيرية من مركب B(ghi)P في جيني *AhR2* و *CYP1A*
 6. جين *CYP1A* أكثر تأثرًا بمركبي B(a)P و B(ghi)P من جين *AhR2*.

2.5: التوصيات

1. دراسة تأثير النفط الخام على دورات الحياة الكاملة للأسماك بالمراحل المختلفة، مثل البيض واليرقات والبالغات، قد يساعد ذلك في فهم كيفية تأثير النفط على السلوك والتكاثر.
2. دراسة تأثير النفط الخام ومركبات PAHs على المستوى الوراثي بتراكيز أقل من التراكيز المدروسة في الدراسة الحالية و إجراء دراسات وراثية لأحياء مائية وجينات ذات صلة أخرى.
3. دراسة التعبير الجيني للجينات بعد تعرضها للنفط الخام.
4. دراسة ميدانية على المستوى الوراثي لأسماك المناطق المعرضة للنفط الخام.
5. مراقبة تراكيز PAHs في الأسماك، وتقييم المخاطر والتهديدات المختلفة التي تسببها.
6. التحليل الدوري لمياه الأنهار لملاحظة التغيرات التي تطرأ على الخصائص الكيميائية والفيزيائية والأحيائية.
7. تقديم الدلائل الإرشادية بشأن تلوث الأغذية بمركبات PAHs لزيادة الوعي لدى المجتمع.
8. نوصي الشركات والمؤسسات المعنية باستخراج النفط الخام أن تأخذ في الاعتبار التأثير البيئي لإنتاج النفط والتحكم في عمليات التصريف والانبعاثات وفقدان الملوثات العضوية الثابتة في البيئة المائية أو تقليلها أو القضاء عليها.

الفصل السادس

المصادر

References

References

- Abdel-Shafy, H. I., & Mansour, M. S. M. (2016). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*, 25(1), 107–123.
- Adedeji, J. A., Tetteh, E. K., Opoku Amankwa, M., Asante-Sackey, D., Ofori-Frimpong, S., Armah, E. K., Rathilal, S., Mohammadi, A. H., & Chetty, M. (2022). Microbial Bioremediation and Biodegradation of Petroleum Products—A Mini Review. *Applied Sciences*, 12(23), 12212.
- Agamy, E. (2013). Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): a histopathological study. *Marine Environmental Research*, 86, 46–55.
- Agrawal, S., Kaur, A. P., & Taneja, K. (2018). A comprehensive review of benzo alpha pyrene (B [A] P) Toxicology. *research journal of Pharmaceutical Biological and Chemical sciences*, 9(4), 1049–1058.
- Aiyesanmi, A. F., Ademefun, A. E., Ibigbami, O. A., & Adelodun, A. A. (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in floodplain soils: A case study of Onuku River in Okitipupa, Nigeria. *Environmental Challenges*, 5, 100351.
- Akhbarizadeh, R., Moore, F., & Keshavarzi, B. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons and potentially toxic elements in seafood from the Persian Gulf: presence, trophic transfer, and chronic intake risk assessment. *Environmental Geochemistry and Health*, 41, 2803–2820.
- Akinsanya, B., Adebusoye, S. A., Alinson, T., & Ukwa, U. D. (2018). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons, histopathological alterations and parasito-fauna in benthopelagic host from Snake Island,

- Lagos, Nigeria. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 79(1), 1–18.
- Al-Khion, D. D., Al-Ali, B. S., Al-Saad, H. T., & Rushdi, A. I. (2021). Levels and source of aliphatic hydrocarbons in marine fishes from coast of Iraq based on biomarkers and biogeochemical indices. *Indian Journal of Ecology*, 48(2), 536–544.
- Al-Koofee, D. A. F., & Mubarak, S. M. H. (2019). Genetic polymorphisms. *The Recent Topics in Genetic Polymorphisms*, 1–10.
- AL-Saadi, T., Cherepovitsyn, A., & Semenova, T. (2022). Iraq Oil Industry Infrastructure Development in the Conditions of the Global Economy Turbulence. *Energies*, 15(17), 6239.
- Alexandrov, K., & Thompson, M. H. (1977). Influence of inducers and inhibitors of mixed-function oxidases on benzo (a) pyrene binding to the DNA of rat liver nuclei. *Cancer Research*, 37(5), 1443–1449.
- Ali, S., Champagne, D. L., & Richardson, M. K. (2012). Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behavioural Brain Research*, 228(2), 272–283.
- Aljuboory, S. T., & Al-Khshali, M. S. (2018). The relation of insulin like growth factor gene (IGF-1) with some physiological characteristics of common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(1), 1300–1303.
- Almatari, M. S., Ahmed, Y. M., Reda, L., Loutfy, N., & Ahmed, T. M. (2017). Residues of some organic pollutants, their bioaccumulation, and risk assessments profile in Lake Tamsah, Ismailia, Egypt. *J Clin Exp Tox*, 1(1), 7–20.
- Alshaaban, Z. A. A., & Al-Hejuje, M. M. K. (2021). Comparison of the Application of two Trophic Status Indices at East Al-Hammar marsh-

- southern Iraq. *Marsh Bulletin*, 16(2).
- Amores, A., Force, A., Yan, Y.-L., Joly, L., Amemiya, C., Fritz, A., Ho, R. K., Langeland, J., Prince, V., & Wang, Y.-L. (1998). Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, 282(5394), 1711–1714.
- Anderson, A. L., Dubanksy, B. D., Wilson, L. B., Tanguay, R. L., & Rice, C. D. (2022). Development and Applications of a Zebrafish (*Danio rerio*) CYP1A-Targeted Monoclonal Antibody (CRC4) with Reactivity across Vertebrate Taxa: Evidence for a Conserved CYP1A Epitope. *Toxics*, 10(7), 404.
- Andleeb, S., Ahmad, I., Bazaz, A. I., Asimi, O., Bhat, B. A., Shah, F. A., & Wani, G. B. (2022). *Cytochrome P4501A responses in Carassius carassius in relation to nitrate and phosphate levels of Wular Lake of Jammu and Kashmir The Pharma Innovation Journal 2022; SP-11(11): 2631-2636.*
- APHA, (American Public Health Association) (2003). Standard methods for examination of water and waste water. (20th Ed.). Washington DC, USA.
- Ardeshir, R. A., Zolgharnien, H., Movahedinia, A., Salamat, N., Zabihi, E., & Rastgar, S. (2019). Measurement of DNA damage by CellProfiler software in the liver of Caspian white fish exposed to environmental concentrations of fipronil. *Computational Toxicology*, 12, 100105.
- Assefa, A., & Abunna, F. (2018). Maintenance of fish health in aquaculture: review of epidemiological approaches for prevention and control of infectious disease of fish. *Veterinary Medicine International*, 2018.
- Baali, A., Kammann, U., Hanel, R., El Qoraychy, I., & Yahyaoui, A. (2016).

- Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in three species of fish from Morocco. *Environmental Sciences Europe*, 28, 1–6.
- Baali, A., & Yahyaoui, A. (2020). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their influence to some aquatic species. *Biochemical Toxicology-Heavy Metals and Nanomaterials*. doi: 10.5772/intechopen.86213
- Baird, W. M., Hooven, L. A., & Mahadevan, B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2-3), 106–114.
- Balk, L., Hylland, K., Hansson, T., Berntssen, M. H. G., Beyer, J., Jonsson, G., Melbye, A., Grung, M., Torstensen, B. E., & Børseth, J. F. (2011). Biomarkers in natural fish populations indicate adverse biological effects of offshore oil production. *PLoS One*, 6(5), e19735.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Bandowe, B. A. M., Bigalke, M., Boamah, L., Nyarko, E., Saalia, F. K., & Wilcke, W. (2014). Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): bioaccumulation and health risk assessment. *Environment International*, 65, 135–146.
- Barnes, J. L., Zubair, M., John, K., Poirier, M. C., & Martin, F. L. (2018). Carcinogens and DNA damage. *Biochemical Society Transactions*, 46(5), 1213–1224.
- Behar, D. M., Villems, R., Soodyall, H., Blue-Smith, J., Pereira, L., Metspalu, E., Scozzari, R., Makkan, H., Tzur, S., & Comas, D. (2008). The dawn of human matrilineal diversity. *The American Journal of Human Genetics*,

82(5), 1130–1140.

- Bello, S. M., Franks, D. G., Stegeman, J. J., & Hahn, M. E. (2001). Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: in vivo and in vitro studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicological Sciences*, 60(1), 77–91.
- Bi, H., An, C., Owens, E., Lee, K., Chen, Z., Mulligan, C., Taylor, E., & Boufadel, M. (2021). A framework for the evaluation and selection of shoreline surface washing agents in oil spill response. *Journal of Environmental Management*, 287, 112346.
- Billiard, S. M., Timme-Laragy, A. R., Wassenberg, D. M., Cockman, C., & Di Giulio, R. T. (2006). The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicological Sciences*, 92(2), 526–536.
- Bostock, J., McAndrew, B., Richards, R., Jauncey, K., Telfer, T., Lorenzen, K., Little, D., Ross, L., Handisyde, N., & Gatward, I. (2010). Aquaculture: global status and trends. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2897–2912.
- Bramatti, I., Matos, B., Figueiredo, N., Pousão-Ferreira, P., Branco, V., & Martins, M. (2023). Interaction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon compounds in fish primary hepatocytes: From molecular mechanisms to genotoxic effects. *Science of the Total Environment*, 855, 158783.
- Branco, V., Matos, B., Mourato, C., Diniz, M., Carvalho, C., & Martins, M. (2021). Synthesis of glutathione as a central aspect of PAH toxicity in liver cells: A comparison between phenanthrene, Benzo [b] Fluoranthene

- and their mixtures. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111637.
- Brody, T. M., Bianca, P. Di, & Krysa, J. (2012). Analysis of inland crude oil spill threats, vulnerabilities, and emergency response in the midwest United States. *Risk Analysis: An International Journal*, 32(10), 1741–1749.
- Budowle, B., Allard, M. W., Wilson, M. R., & Chakraborty, R. (2003). Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 4(1), 119–141.
- Bukowska, B. (2015). Hemoglobin adducts as biomarkers of human exposure to selected xenobiotics. *Postepy Higieny i Medycyny Doswiadczalnej (Online)*, 69, 668–680.
- Bukowska, B., Mokra, K., & Michałowicz, J. (2022). Benzo [a] pyrene—Environmental Occurrence, Human Exposure, and Mechanisms of Toxicity. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6348.
- Bukowska, B., & Sicińska, P. (2021). Influence of benzo (a) pyrene on different epigenetic processes. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 13453.
- Carambia, A., & Schuran, F. A. (2021). The aryl hydrocarbon receptor in liver inflammation. *Seminars in Immunopathology*, 43, 563–575.
- Carls, M. G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T. K., Scholz, N. L., & Incardona, J. P. (2008). Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles. *Aquatic Toxicology*, 88(2), 121–127.
- Chandrasekaran, A., & Elias, K. M. (2021). Synthetic lethality in ovarian cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 20(11), 2117.

- Châtel, A., Faucet-Marquis, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Gourlay-Francé, C., & Vincent-Hubert, F. (2014). DNA adduct formation and induction of detoxification mechanisms in *Dreissena polymorpha* exposed to nitro-PAHs. *Mutagenesis*, 29(6), 457–465.
- Chatterjee, N., & Walker, G. C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 58(5), 235–263.
- Chatterjee, S., & Pal, J. K. (2009). Role of 5'-and 3'-untranslated regions of mRNAs in human diseases. *Biology of the Cell*, 101(5), 251–262.
- Chen, C.-H. (2020). *Xenobiotic metabolic enzymes: Bioactivation and antioxidant defense*. First Edition, Institute for Health and the Environment and Department of Biomedical Sciences, University at Albany, State University of New York, 5 University Place, Rensselaer, USA, Springer chem. doi.org/10.1007/978-3-030-41679-9
- Chen, J., & Guo, J. (2020). Comparative assessments of indel annotations in healthy and cancer genomes with next-generation sequencing data. *BMC Medical Genomics*, 13, 1–11.
- Chen, Q., Wang, F., Yang, H., Wang, X., Zhang, A., Ling, X., Li, L., Zou, P., Sun, L., & Huang, L. (2021). Exposure to fine particulate matter-bound polycyclic aromatic hydrocarbons, male semen quality, and reproductive hormones: the MARCHS study. *Environmental Pollution*, 280, 116883.
- Chen, X., Bi, H., Yue, R., Chen, Z., & An, C. (2022). Effects of Oil Characteristics on the Performance of Shoreline Response Operations: A Review. *Frontiers in Environmental Science*, 2043.
- Cherng, S.-H., Lin, P., Yang, J.-L., Hsu, S.-L., & Lee, H. (2001). Benzo [g, h, i] perylene synergistically transactivates benzo [a] pyrene-induced

- CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 170(1), 63–68.
- Cherr, G. N., Fairbairn, E., & Whitehead, A. (2017). Impacts of petroleum-derived pollutants on fish development. *Annual Review of Animal Biosciences*, 5, 185–203.
- Cheung, K. C., Leung, H. M., Kong, K. Y., & Wong, M. H. (2007). Residual levels of DDTs and PAHs in freshwater and marine fish from Hong Kong markets and their health risk assessment. *Chemosphere*, 66(3), 460–468.
- Chizhova, T., Hayakawa, K., Tishchenko, P., Nakase, H., & Koudryashova, Y. (2013). Distribution of PAHs in the northwestern part of the Japan Sea. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 86, 19–24.
- Coad, B. W. 2010. Freshwater fishes of Iraq. Pensoft publishers, Bulgaria, 274pp.
- Colli-Dula, R. C., Fang, X., Moraga-Amador, D., Albornoz-Abud, N., Zamora-Bustillos, R., Conesa, A., Zapata-Perez, O., Moreno, D., & Hernandez-Nuñez, E. (2018). Transcriptome analysis reveals novel insights into the response of low-dose benzo (a) pyrene exposure in male tilapia. *Aquatic Toxicology*, 201, 162–173.
- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., & Reis-Henriques, M. A. (2011). Comparison of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo (a) pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere*, 84(10), 1452–1460.
- Crowe, K. M., Newton, J. C., Kaltenboeck, B., & Johnson, C. (2014). Oxidative stress responses of gulf killifish exposed to hydrocarbons from the Deepwater Horizon oil spill: Potential implications for aquatic food

- resources. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33(2), 370–374.
- Da Silva, D. A. M., Buzitis, J., Krahn, M. M., Bícigo, M. C., & Pires-Vanin, A. M. S. (2006). Metabolites in bile of fish from Sao Sebastiao Channel, Sao Paulo, Brazil as biomarkers of exposure to petrogenic polycyclic aromatic compounds. *Marine Pollution Bulletin*, 52(2), 175–183.
- da Silva Junior, F. C., Felipe, M. B. M. C., de Castro, D. E. F., da Silva Araujo, S. C., Sisenando, H. C. N., & de Medeiros, S. R. B. (2021). A look beyond the priority: A systematic review of the genotoxic, mutagenic, and carcinogenic endpoints of non-priority PAHs. *Environmental Pollution*, 278, 116838.
- Dai, S., Qu, L., Li, J., Zhang, Y., Jiang, L., Wei, H., Guo, M., Chen, X., & Chen, Y. (2022). Structural insight into the ligand binding mechanism of aryl hydrocarbon receptor. *Nature Communications*, 13(1), 6234.
- Das, D. N., & Ravi, N. (2022). Influences of polycyclic aromatic hydrocarbon on the epigenome toxicity and its applicability in human health risk assessment. *Environmental Research*, 213, 113677.
- de Albergaria-Barbosa, A. C. R., Patire, V. F., Taniguchi, S., Fernandez, W. S., Dias, J. F., & Bícigo, M. C. (2017). Mugil curema as a PAH bioavailability monitor for Atlantic west sub-tropical estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 114(1), 609–614.
- De Soysa, T. Y., Ulrich, A., Friedrich, T., Pite, D., Compton, S. L., Ok, D., Bernardos, R. L., Downes, G. B., Hsieh, S., & Stein, R. (2012). Macondo crude oil from the Deepwater Horizon oil spill disrupts specific developmental processes during zebrafish embryogenesis. *BMC Biology*, 10(1), 1–25.
- Deb, S. C., Araki, T., & Fukushima, T. (2000). Polycyclic aromatic

- hydrocarbons in fish organs. *Marine Pollution Bulletin*, 40(10), 882–885.
- DeMarini, D. M., Landi, S., Tian, D., Hanley, N. M., Li, X., Hu, F., Roop, B. C., Mass, M. J., Keohavong, P., & Gao, W. (2001). Lung tumor KRAS and TP53 mutations in nonsmokers reflect exposure to PAH-rich coal combustion emissions. *Cancer Research*, 61(18), 6679–6681.
- Denissenko, M. F., Pao, A., Tang, M., & Pfeifer, G. P. (1996). Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science*, 274(5286), 430–432.
- Derakhshesh, N., Salamat, N., Movahedinia, A., Hashemitabar, M., & Bayati, V. (2019). Exposure of liver cell culture from the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*, to benzo [a] pyrene and light results in oxidative damage as measured by antioxidant enzymes. *Chemosphere*, 226, 534–544.
- Dharwadkar, S. (2011). Implications of Biotransformation of Benzo (a) Pyrene: A Review. *Bionano Frontier*, 63–65.
- Dhutmal, R. R., Mundhe, A. G. and More, A. W. (2018). Molecular Marker Techniques: A Review. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 6: 816-825.
- Dighiesh, H., Eldanasoury, M., Kamel, S., & Sharaf, S. (2019). Toxicity of Water Soluble Fractions of Petroleum Crude Oil and its Histopathological Alterations Effects on Red Tilapia Fish. *Catrina: The International Journal of Environmental Sciences*, 18(1), 25–31.
- Du, J., & Jing, C. (2018). Anthropogenic PAHs in lake sediments: a literature review (2002–2018). *Environmental Science: Processes & Impacts*, 20(12), 1649–1666.
- Durland, J., & Ahmadian-Moghadam, H. (2021). Genetics, mutagenesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560519>.

- El-Ghiaty, M. A., & El-Kadi, A. O. S. (2021). Arsenic: Various species with different effects on cytochrome P450 regulation in humans. *EXCLI Journal*, 20, 1184.
- El-Sherbeni, A. A., & El-Kadi, A. O. S. (2014). The role of epoxide hydrolases in health and disease. *Archives of Toxicology*, 88(11), 2013–2032.
- Erdoğan, O., Ceyhun, S. B., Ekinçi, D., & Aksakal, E. (2011). Impact of deltamethrin exposure on mRNA expression levels of metallothionein A, B and cytochrome P450 1A in rainbow trout muscles. *Gene*, 484(1–2), 13–17.
- Esmailbeigi, M., Kalbassi, M. R., Seyedi, J., Tayemeh, M. B., & Moghaddam, J. A. (2021). Intra and extracellular effects of benzo [α] pyrene on liver, gill and blood of Caspian White fish (*Rutilus frissi kutum*): Cyto-genotoxicity and histopathology approach. *Marine Pollution Bulletin*, 163, 111942.
- Estensen, R. D., Jordan, M. M., Wiedmann, T. S., Galbraith, A. R., Steele, V. E., & Wattenberg, L. W. (2004). Effect of chemopreventive agents on separate stages of progression of benzo [α] pyrene induced lung tumors in A/J mice. *Carcinogenesis*, 25(2), 197–201.
- European Commission (2011): Working group Group E of the Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive: PAH-5-6-rings EQS dossier 2011 reviewed by Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER).
- Ewa, B., & Danuta, M.-Š. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of Applied Genetics*, 58, 321–330.
- Fakher, S., Ahdaya, M., Elturki, M., & Imqam, A. (2020). Critical review of

- asphaltene properties and factors impacting its stability in crude oil. *Journal of Petroleum Exploration and Production Technology*, 10(3), 1183–1200.
- Fang, X., Corrales, J., Thornton, C., Clerk, T., Scheffler, B. E., & Willett, K. L. (2015). Transcriptomic changes in zebrafish embryos and larvae following benzo [a] pyrene exposure. *Toxicological Sciences*, 146(2), 395–411.
- Fatima, R. A., & Ahmad, M. (2006). Allium cepa derived EROD as a potential biomarker for the presence of certain pesticides in water. *Chemosphere*, 62(4), 527–537.
- Ferguson, A., Solo-Gabriele, H., & Mena, K. (2020). Assessment for oil spill chemicals: Current knowledge, data gaps, and uncertainties addressing human physical health risk. *Marine Pollution Bulletin*, 150, 110746.
- Ferreira, M., Costa, J., & Reis-Henriques, M. A. (2014). ABC transporters in fish species: a review. *Frontiers in Physiology*, 5, 266.
- Fontanetti, C. S., Nogarol, L. R., Souza, R. B., Perez, D. G., & Maziviero, G. T. (2011). Bioindicators and biomarkers in the assessment of soil toxicity. *Soil Contamination*, 1, 143–168.
- Franco, M. E., & Lavado, R. (2019). Applicability of in vitro methods in evaluating the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish: Advances and challenges. *Science of The Total Environment*, 671, 685–695.
- Frantzen, M., Falk-Petersen, I.-B., Nahrgang, J., Smith, T. J., Olsen, G. H., Hangstad, T. A., & Camus, L. (2012). Toxicity of crude oil and pyrene to the embryos of beach spawning capelin (*Mallotus villosus*). *Aquatic Toxicology*, 108, 42–52.

- Frapiccini, E., Annibaldi, A., Betti, M., Polidori, P., Truzzi, C., & Marini, M. (2018). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) accumulation in different common sole (*Solea solea*) tissues from the North Adriatic Sea peculiar impacted area. *Marine Pollution Bulletin*, 137, 61–68.
- French-McCay, D. P., Parkerton, T. F., & de Jourdan, B. (2023). Bridging the Lab to Field Divide: Advancing Oil Spill Biological Effects Models Requires Revisiting Aquatic Toxicity Testing. *Aquatic Toxicology*, 106389.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C., & Sturve, J. (2004). DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552(1–2), 187–195.
- Froehner, S., Rizzi, J., Vieira, L. M., & Sanes, J. (2018). PAHs in water, sediment and biota in an area with port activities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 75, 236–246.
- Fu, I., Cai, Y., Geacintov, N. E., Zhang, Y., & Broyde, S. (2017). Nucleosome histone tail conformation and dynamics: Impacts of lysine acetylation and a nearby minor groove benzo [a] pyrene-derived lesion. *Biochemistry*, 56(14), 1963–1973.
- Fu, P. P., Xia, Q., Sun, X., & Yu, H. (2012). Phototoxicity and environmental transformation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—light-induced reactive oxygen species, lipid peroxidation, and DNA damage. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 30(1), 1–41.
- Gao, K., Brandt, I., Goldstone, J. V., & Jönsson, M. E. (2011). Cytochrome P450 1A, 1B, and 1C mRNA induction patterns in three-spined stickleback exposed to a transient and a persistent inducer. *Comparative*

- Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(1), 42–55.
- García, M. M., & de Llasera, M. P. G. (2021). A review on the enzymes and metabolites identified by mass spectrometry from bacteria and microalgae involved in the degradation of high molecular weight PAHs. *Science of The Total Environment*, 797, 149035.
- Gerger, C. J., & Weber, L. P. (2015). Comparison of the acute effects of benzo-a-pyrene on adult zebrafish (*Danio rerio*) cardiorespiratory function following intraperitoneal injection versus aqueous exposure. *Aquatic Toxicology*, 165, 19–30.
- Gherardi, M., Gordiani, A., L'Episcopo, N., & Pelliccioni, A. (2021). Carcinogenic Content of PM10-Bound PAHs in University Classrooms and Outdoors at an Urban Location in Rome, Italy, during Winter Working and Not-Working Days. *Sustainability*, 13(19), 10790.
- Gilliers, C., Claireaux, G., Galois, R., Loizeau, V., & Pape, O. Le. (2012). Influence of hydrocarbons exposure on survival, growth and condition of juvenile flatfish: a mesocosm experiment. *Journal of Life Sciences*, 4(2), 113–122.
- Glasauer, S. M. K., & Neuhauss, S. C. F. (2014). Whole-genome duplication in teleost fishes and its evolutionary consequences. *Molecular Genetics and Genomics*, 289, 1045–1060.
- Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A. M., Martins, M., & Correia, A. D. (2008). The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research*, 108(2), 205–213.
- Grimalt, J. O., & Olivé, J. (1993). Source input elucidation in aquatic systems by factor and principal component analysis of molecular marker data.

- Analytica Chimica Acta*, 278(1), 159–176.
- Grmasha, R. A., Stenger-Kovács, C., Bedewy, B. A. H., Al-Sareji, O. J., Al-Juboori, R. A., Meiczinger, M., & Hashim, K. S. (2023). Ecological and human health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in Tigris river near the oil refineries in Iraq. *Environmental Research*, 115791.
- Gudde, N. J. (2018). Adaptation of oil refineries to make modern fuels. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part D: Journal of Automobile Engineering*, 232(1), 5–21.
- Guo, J., Huang, Y., Bian, S., Zhao, C., Jin, Y., Yu, D., Wu, X., Zhang, D., Cao, W., & Jing, F. (2018). Associations of urinary polycyclic aromatic hydrocarbons with bone mass density and osteoporosis in US adults, NHANES 2005–2010. *Environmental Pollution*, 240, 209–218.
- Gutiérrez-Vázquez, C., & Quintana, F. J. (2018). Regulation of the immune response by the aryl hydrocarbon receptor. *Immunity*, 48(1), 19–33.
- Gyasi, H. (2022). *Investigating the Mutagenicity of Polycyclic Aromatic Compounds from the Athabasca Oil Sands Region in River Otters and a Mammalian Cell Line*. Department of Biology Faculty of Science University of Ottawa.
- Ha, H., Park, K., Kang, G., & Lee, S. (2019). QSAR study using acute toxicity of *Daphnia magna* and *Hyalella azteca* through exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology*, 28(3), 333–342.
- Hąc-Wydro, K., Połecć, K., & Broniatowski, M. (2019). The impact of selected Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) on the morphology, stability and relaxation of ternary lipid monolayers imitating soil bacteria

- membrane. *Journal of Molecular Liquids*, 276, 409–416.
- Hammond, C. L., Roztocil, E., Gupta, V., Feldon, S. E., & Woeller, C. F. (2022). More than meets the eye: the aryl hydrocarbon receptor is an environmental sensor, physiological regulator and a therapeutic target in ocular disease. *Frontiers in Toxicology*, 4.
- Haritash, A. K., & Kaushik, C. P. (2009). Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of Hazardous Materials*, 169(1–3), 1–15.
- Harris, J. B., Hartman, J. H., Luz, A. L., Wilson, J. Y., Dinyari, A., & Meyer, J. N. (2020). Zebrafish CYP1A expression in transgenic *Caenorhabditis elegans* protects from exposures to benzo [a] pyrene and a complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixture. *Toxicology*, 440, 152473.
- Hassanin, A. A. I., & Kaminishi, Y. (2019). A novel cytochrome P450 1D1 gene in Nile tilapia fish (*Oreochromis niloticus*): partial cDNA cloning and expression following benzo-a-pyrene exposure. *International Aquatic Research*, 11, 277–285.
- Hassanin, A. A. I., Kaminishi, Y., Osman, M. M. M., Abdel-Wahad, Z. H., El-Kady, M. A. H., & Itakura, T. (2009). Development and application of a real-time quantitative PCR assay for determining expression of benzo-a-pyrene-inducible cytochrome P450 1A in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *African Journal of Biotechnology*, 8(23).
- Hellou, J., & Warren, W. G. (1997). Polycyclic aromatic compounds and saturated hydrocarbons in tissues of flatfish: Insight on environmental exposure. *Marine Environmental Research*, 43(1–2), 11–25.
- Hodek, P., Koblíhová, J., Kizek, R., Frei, E., Arlt, V. M., & Stiborová, M. (2013). The relationship between DNA adduct formation by benzo [a]

- pyrene and expression of its activation enzyme cytochrome P450 1A1 in rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 989–996.
- Hodson, P. V, Adams, J., & Brown, R. S. (2019). Oil toxicity test methods must be improved. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 38(2), 302–311.
- Holth, T. F., Beylich, B. A., Skarphédinsdóttir, H., Liewenborg, B., Grung, M., & Hylland, K. (2009). Genotoxicity of environmentally relevant concentrations of water-soluble oil components in cod (*Gadus morhua*). *Environmental Science & Technology*, 43(9), 3329–3334.
- Honda, M., & Suzuki, N. (2020). Toxicities of polycyclic aromatic hydrocarbons for aquatic animals. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4), 1363.
- Hosseinipooya, S. A., Hu, G., Lee, K., Li, J., Ng, K. T. W., & Vu, H. L. (2022). A system dynamics modeling approach for estimation of oily waste generation from marine oil spill response: A case study of an oil spill in Central Coast of British Columbia. *Frontiers in Environmental Science*, 801.
- Hou, W., Zhang, L., Li, X., Gong, Z., Yang, Y., & Li, Z. (2015). Influence of *Mucor mucedo* immobilized to corncob in remediation of pyrene contaminated agricultural soil. *Environmental Engineering Research*, 20(2), 149–154.
- Hrdina, A. I. H., Kohale, I. N., Kaushal, S., Kelly, J., Selin, N. E., Engelward, B. P., & Kroll, J. H. (2022). The Parallel Transformations of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Body and in the Atmosphere. *Environmental health perspectives*, 130(2), 25004. <https://doi.org/10.1289/EHP998>.

- Hughes, N. C., & Phillips, D. H. (1993). 32P-postlabelling analysis of the covalent binding of benzo [ghi] perylene to DNA in vivo and in vitro. *Carcinogenesis*, 14(1), 127–133.
- Huynh, K., Jensen, A. E., & Sundberg, J. (2021). Extended characterization of petroleum aromatics using off-line LC-GC-MS. *PeerJ Analytical Chemistry*, 3, e12.
- Ikegame, M., Hattori, A., Tabata, M. J., Kitamura, K., Tabuchi, Y., Furusawa, Y., Maruyama, Y., Yamamoto, T., Sekiguchi, T., & Matsuoka, R. (2019). Melatonin is a potential drug for the prevention of bone loss during space flight. *Journal of Pineal Research*, 67(3), e12594.
- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. (2010). Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 92, 1.
- Imam, A., Suman, S. K., Ghosh, D., & Kanaujia, P. K. (2019). Analytical approaches used in monitoring the bioremediation of hydrocarbons in petroleum-contaminated soil and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 50–64.
- Imam, A., Suman, S. K., Kanaujia, P. K., & Ray, A. (2022). Biological machinery for polycyclic aromatic hydrocarbons degradation: A review. *Bioresource Technology*, 343, 126121.
- Incardona, J. P., Day, H. L., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2006). Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 217(3), 308–321.

- Incardona, J. P., & Scholz, N. L. (2016). The influence of heart developmental anatomy on cardiotoxicity-based adverse outcome pathways in fish. *Aquatic Toxicology*, *177*, 515–525.
- “International Agency for Research on Cancer (IARC), 2021. Monograph on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans. List of Classifications, vols. 1–123.
- Jafarinejad, S., & Jiang, S. C. (2019). Current technologies and future directions for treating petroleum refineries and petrochemical plants (PRPP) wastewaters. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, *7*(5), 103326.
- Jarvis, I. W. H., Bergvall, C., Bottai, M., Westerholm, R., Stenius, U., & Dreij, K. (2013). Persistent activation of DNA damage signaling in response to complex mixtures of PAHs in air particulate matter. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *266*(3), 408–418.
- Jarvis, I. W. H., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., & Stenius, U. (2014). Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology*, *321*, 27–39.
- Jawad, L. (2003). Impact of environmental change on the freshwater fish fauna of Iraq. *International Journal of Environmental Studies*, *60*(6), 581–593.
- Jazza, S. H. (2018). Study of hydrocarbon compounds levels in water, sediments and some aquatic biota in Al-Mushrah River in Misan province/Iraq. *Misan Journal for Academic Studies*, *33*, 70–84.
- Jazza, S. H., Al-Adhub, A.-H. Y., & Al-Saad, H. T. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in muscles of two commercial fish

- species from Al-Kahlaa river in Missan Governorate, Iraq. *Ilmu Kelautan*, 20(3), 121–126.
- Jee, J., Park, K. H., Keum, Y., & Kang, J. (2006). Effects of 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene on growth and haematological parameters in Korean rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Aquaculture Research*, 37(5), 431–442.
- Jesus, F., Pereira, J. L., Campos, I., Santos, M., Ré, A., Keizer, J., Nogueira, A., Gonçalves, F. J. M., Abrantes, N., & Serpa, D. (2022). A review on polycyclic aromatic hydrocarbons distribution in freshwater ecosystems and their toxicity to benthic fauna. *Science of The Total Environment*, 153282.
- Johnston, J. E., Lim, E., & Roh, H. (2019). Impact of upstream oil extraction and environmental public health: A review of the evidence. *Science of the Total Environment*, 657, 187–199.
- Jönsson, M. E., Gao, K., Olsson, J. A., Goldstone, J. V., & Brandt, I. (2010). Induction patterns of new CYP1 genes in environmentally exposed rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 98(4), 311–321.
- Ju, Y.-R., Chen, C.-F., Wang, M.-H., Chen, C.-W., & Dong, C.-D. (2022). Assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in seafood collected from coastal aquaculture ponds in Taiwan and human health risk assessment. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126708.
- Kakavandi, B., Rafiemanesh, H., Giannakis, S., Beheshtaeen, F., Samoili, S., Hashemi, M., & Abdi, F. (2023). Establishing the relationship between Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) exposure and male infertility: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 250, 114485.

- Kang, X., Li, D., Zhao, X., Lv, Y., Chen, X., Song, X., Liu, X., Chen, C., & Cao, X. (2022). Long-term exposure to phenanthrene induced gene expressions and enzyme activities of *Cyprinus Carpio* below the safe concentration. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(4), 2129.
- Kanhai, L. D. K., Gobin, J. F., Beckles, D. M., Lauckner, B., & Mohammed, A. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in *Crassostrea rhizophorae* and *Cathorops spixii* from the Caroni Swamp, Trinidad, West Indies. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 1366–1379.
- Kariyawasam, T., Doran, G. S., Howitt, J. A., & Prenzler, P. D. (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in soils and sediments: Sustainable approaches for extraction and remediation. *Chemosphere*, 132981.
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N. and Stenberg, M. J. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10: 845-858.
- Kheiri, A., Aliakbarlu, J., & Tahmasebi, R. (2022). Antioxidant potential and fatty acid profile of fish fillet: Effects of season and fish species. *Veterinary Research Forum*, 13(1), 91.
- Khokhlov, K., Schuster, N. J., Ng, F., & Nuckolls, C. (2018). Functionalized helical building blocks for nanoelectronics. *Organic Letters*, 20(7), 1991–1994.
- Kim, H.-B., Um, J.-Y., Chung, B.-Y., Kim, J.-C., Kang, S.-Y., Park, C.-W., & Kim, H.-O. (2022a). Aryl Hydrocarbon receptors: evidence of therapeutic targets in chronic inflammatory skin diseases. *Biomedicines*, 10(5), 1087.

- Kim, I.-Y., & Hyun, C.-K. (2006). Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64(3), 288–297.
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E., & Brown, R. J. C. (2013). A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environment International*, 60, 71–80.
- Kim, M., Jee, S.-C., Shin, M.-K., Han, D.-H., Bu, K.-B., Lee, S.-C., Jang, B.-Y., & Sung, J.-S. (2022b). Quercetin and Isorhamnetin Reduce Benzo [a] pyrene-Induced Genotoxicity by Inducing RAD51 Expression through Downregulation of miR- 34a. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(21), 13125.
- Kim, S. G., Park, D. K., Jang, S. W., Lee, J. S., Kim, S. S., & Chung, M. H. (2008). Effects of dietary benzo [a] pyrene on growth and hematological parameters in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 81, 470–474.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I.-W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V, & Gottesman, M. M. (2007). A " silent" polymorphism in the MDR 1 gene changes substrate specificity. *Science*, 315(5811), 525–528.
- Kolder, I., Van Der Plas-Duivesteijn, S. J., Tan, G., Wiegertjes, G. F., Forlenza, M., Guler, A. T., Travin, D. Y., Nakao, M., Moritomo, T., & Irnazarow, I. (2016). A full-body transcriptome and proteome resource for the European common carp. *BMC Genomics*, 17, 1–12.
- Korotenko, K. A., Bowman, M. J., & Dietrich, D. E. (2010). High-Resolution Numerical Model for Predicting the Transport and Dispersal of Oil

- Spilled in the Black Sea. *Terrestrial, Atmospheric & Oceanic Sciences*, 21(1).
- Krzyszczak, A., & Czech, B. (2021). Occurrence and toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives in environmental matrices. *Science of The Total Environment*, 788, 147738.
- Kuban, W., & Daniel, W. A. (2021). Cytochrome P450 expression and regulation in the brain. *Drug Metabolism Reviews*, 53(1), 1–29.
- Kumari, K., & Khare, A. (2018). Integration of Biomarker approach in pollution monitoring programme of aquatic ecosystem. *Biosynthetic Technology and Environmental Challenges*, 331–354.
- Kwok, C. K., Liang, Y., Leung, S. Y., Wang, H., Dong, Y. H., Young, L., Giesy, J. P., & Wong, M. H. (2013). Biota–sediment accumulation factor (BSAF), bioaccumulation factor (BAF), and contaminant levels in prey fish to indicate the extent of PAHs and OCPs contamination in eggs of waterbirds. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 8425–8434.
- Labib, S., Williams, A., Guo, C. H., Leingartner, K., Arlt, V. M., Schmeiser, H. H., Yauk, C. L., White, P. A., & Halappanavar, S. (2016). Comparative transcriptomic analyses to scrutinize the assumption that genotoxic PAHs exert effects via a common mode of action. *Archives of Toxicology*, 90, 2461–2480.
- Labib, S., Yauk, C., Williams, A., Arlt, V. M., Phillips, D. H., White, P. A., & Halappanavar, S. (2012). Subchronic oral exposure to benzo (a) pyrene leads to distinct transcriptomic changes in the lungs that are related to carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 129(1), 213–224.
- Lakshman, M. K., Kole, P. L., Chaturvedi, S., Saugier, J. H., Yeh, H. J. C.,

- Glusker, J. P., Carrell, H. L., Katz, A. K., Afshar, C. E., & Dashwood, W.-M. (2000). Methyl group-induced helicity in 1, 4-dimethylbenzo [c] phenanthrene and its metabolites: synthesis, physical, and biological properties. *Journal of the American Chemical Society*, 122(51), 12629–12636.
- Larigot, L., Benoit, L., Koual, M., Tomkiewicz, C., Barouki, R., & Coumoul, X. (2022). Aryl hydrocarbon receptor and its diverse ligands and functions: an exposome receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 383–404.
- LeBlanc, D. P. M., Meier, M., Lo, F. Y., Schmidt, E., Valentine, C., Williams, A., Salk, J. J., Yauk, C. L., & Marchetti, F. (2022). Duplex sequencing identifies genomic features that determine susceptibility to benzo (a) pyrene-induced in vivo mutations. *BMC Genomics*, 23(1), 1–15.
- León, O., Contreras, E., Rogel, E., Dambakli, G., Acevedo, S., Carbognani, L., & Espidel, J. (2002). Adsorption of native resins on asphaltene particles: a correlation between adsorption and activity. *Langmuir*, 18(13), 5106–5112.
- Li, W., Yu, S., Luo, S., Shen, W., Yin, S., & Sun, Q. (2019). Melatonin defends mouse oocyte quality from benzo [ghi] perylene-induced deterioration. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 6220–6229.
- Lima, A. L. C., Farrington, J. W., & Reddy, C. M. (2005). Combustion-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment—a review. *Environmental Forensics*, 6(2), 109–131.
- Liu, C., Huang, Z., Qadeer, A., Liu, Y., Qiao, X., Zheng, B., Zhao, G., & Zhao, X. (2021). The sediment-water diffusion and risk assessment of PAHs in different types of drinking water sources in the Yangtze River

- Delta, China. *Journal of Cleaner Production*, 309, 127456.
- Liu, R., Ma, S., Yu, Y., Li, G., Yu, Y., & An, T. (2020). Field study of PAHs with their derivatives emitted from e-waste dismantling processes and their comprehensive human exposure implications. *Environment International*, 144, 106059.
- Liu, X., Liu, Y., Li, S., Zhang, A., Liu, Z., & Li, Z. (2022). Metabolic fates and response strategies of microorganisms to aromatic compounds with different structures. *Bioresource Technology*, 366, 128210.
- Logan, D. T. (2007). Perspective on ecotoxicology of PAHs to fish. *Human and Ecological Risk Assessment*, 13(2), 302–316.
- Long, A. S., Lemieux, C. L., Arlt, V. M., & White, P. A. (2016). Tissue-specific in vivo genetic toxicity of nine polycyclic aromatic hydrocarbons assessed using the MutaTM Mouse transgenic rodent assay. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 290, 31–42.
- Lourenço, R. A., Taniguchi, S., da Silva, J., Gallotta, F. D. C., & Bicego, M. C. (2021). Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine mammals: A review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, 171, 112699.
- Lu, J., Shang, X., Zhong, W., Xu, Y., Shi, R., & Wang, X. (2020). New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(1), 91–104.
- Magnuson, J. T., Khursigara, A. J., Allmon, E. B., Esbaugh, A. J., & Roberts, A. P. (2018). Effects of Deepwater Horizon crude oil on ocular development in two estuarine fish species, red drum (*Sciaenops ocellatus*) and sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 186–191.

- Malik, A. I., Williams, A., Lemieux, C. L., White, P. A., & Yauk, C. L. (2012). Hepatic mRNA, microRNA, and miR-34a-Target responses in mice after 28 days exposure to doses of benzo (a) pyrene that elicit DNA damage and mutation. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(1), 10–21.
- Mallah, M. A., Changxing, L., Mallah, M. A., Noreen, S., Liu, Y., Saeed, M., Xi, H., Ahmed, B., Feng, F., & Mirjat, A. A. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: an updated review. *Chemosphere*, 133948.
- Mandal, S. K., Ojha, N., & Das, N. (2018). Process optimization of benzo [ghi] perylene biodegradation by yeast consortium in presence of ZnO nanoparticles and produced biosurfactant using Box-Behnken design. *Frontiers in Biology*, 13(6), 418–424.
- Maria, V. L., Correia, A. C., & Santos, M. A. (2004). Genotoxic and biochemical responses in caged eel (*Anguilla anguilla* L.) after short-term exposure to harbour waters. *Environment International*, 29(7), 923–929.
- McCarrick, S., Cunha, V., Zapletal, O., Vondráček, J., & Dreij, K. (2019). In vitro and in vivo genotoxicity of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Pollution*, 246, 678–687.
- Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A., & Baird, W. M. (1999). Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis*, 20(10), 1885–1891.
- Meudec, A., Poupart, N., Dussauze, J., & Deslandes, E. (2007). Relationship between heavy fuel oil phytotoxicity and polycyclic aromatic hydrocarbon contamination in *Salicornia fragilis*. *Science of the Total*

- Environment*, 381(1–3), 146–156.
- Meyer, A., & Van de Peer, Y. (2005). From 2R to 3R: evidence for a fish-specific genome duplication (FSGD). *Bioessays*, 27(9), 937–945.
- Mishra, A. K., & Kumar, G. S. (2015). Weathering of oil spill: modeling and analysis. *Aquatic Procedia*, 4, 435–442.
- Mishra, C., Rout, M., Mishra, S. P., Sahoo, S. S., Nayak, G., & Patra, R. C. (2017). Genetic polymorphism of prolific genes in goat—a brief review. *Exploratory Animal and Medical Research*, 7(2), 132–141.
- Mo, J., Au, D. W.-T., Guo, J., Winkler, C., Kong, R. Y.-C., & Seemann, F. (2022). Benzo [a] pyrene osteotoxicity and the regulatory roles of genetic and epigenetic factors: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 52(18), 3244–3282.
- Moffat, I., Chepelev, N. L., Labib, S., Bourdon-Lacombe, J., Kuo, B., Buick, J. K., Lemieux, F., Williams, A., Halappanavar, S., & Malik, A. I. (2015). Comparison of toxicogenomics and traditional approaches to inform mode of action and points of departure in human health risk assessment of benzo [a] pyrene in drinking water. *Critical Reviews in Toxicology*, 45(1), 1–43.
- Muñoz, B., & Albores, A. (2011). DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons: mechanisms and markers. *Selected Topics in DNA Repair*, 201, 125–143.
- Murawski, S. A., Hogarth, W. T., Peebles, E. B., & Barbeiri, L. (2014). Prevalence of external skin lesions and polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in Gulf of Mexico fishes, post-Deepwater Horizon. *Transactions of the American Fisheries Society*, 143(4), 1084–1097.
- Murtala, B. A., Abdul, W. O., & Akinyemi, A. A. (2012). Bioaccumulation of

- heavy metals in fish (*Hydrocynus forskahlii*, *Hyperopisus bebe occidentalis* and *Clarias gariepinus*) organs in downstream Ogun coastal water, Nigeria. *Transnational Journal of Science and Technology*, 2(5), 119–133.
- Nadler, A. M. (2017). *Effects of Crude Oil on Tumor Suppressor p53 Polymorphisms in Laboratory-Exposed Atlantic Killifish, Fundulus heteroclitus*. Seton Hall University Dissertations and Theses (ETDs). 2487.
- Nematollahi, M. J., Rastegari Mehr, M., Shakeri, A., Amjadian, K., Ebrahimi, P., & Pirouei, M. (2022). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils around oil refineries; Case study: Erbil and Kirkuk refineries, Iraq-A modelling approach. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 1–18.
- Nigro, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S., & Regoli, F. (2002). Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental Research*, 54(3–5), 517–520.
- Nirenberg, M. (2004). Historical review: Deciphering the genetic code—a personal account. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(1), 46–54.
- Nordtug, T., Olsen, A. J., Altin, D., Overrein, I., Storøy, W., Hansen, B. H., & De Laender, F. (2011). Oil droplets do not affect assimilation and survival probability of first feeding larvae of North-East Arctic cod. *Science of the Total Environment*, 412, 148–153.
- Nur, I. T., Ghosh, B. K., & Acharjee, M. (2020). Comparative microbiological analysis of raw fishes and sun-dried fishes collected from the Kawran bazaar in Dhaka city, Bangladesh. *Food Research*, 4(3), 846–851.

- Obaid, H. M., Hussein, N. F., Obed, T. M., & Boundenga, L. (2021). Common Carp (*Cyprinus carpio*) parasites diversity and prevalence in Erbil aquacultures: gills, skin and intestinal infections. *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 13(1), 34–41.
- Olayinka, O. O., Adewusi, A. A., Olujimi, O. O., & Aladesida, A. A. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment and health risk of fish, crab and shrimp around Atlas Cove, Nigeria. *Journal of Health and Pollution*, 9(24).
- Oliva, A. L., La Colla, N. S., Arias, A. H., Blasina, G. E., Lopez Cazorla, A., & Marcovecchio, J. E. (2017). Distribution and human health risk assessment of PAHs in four fish species from a SW Atlantic estuary. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23), 18979–18990.
- Olsvik, P. A., Sørhus, E., Meier, S., Torvanger, I., Thorbjørnsen, M., Thorsen, A., Sørensen, L., Fjellidal, P. G., Karlsen, Ø., & Guimaraes, I. G. (2021). Ontogeny-Specific Skeletal Deformities in Atlantic Haddock Caused by Larval Oil Exposure. *Frontiers in Marine Science*, 8, 726828.
- Olufayo, M. O. (2009). Haematological characteristics of *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) juveniles exposed to *Derri elliptica* root powder. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 9(3).
- Ouro-Sama, K., Tanouayi, G., Solitoke, H. D., Barsan, N., Mosnegutu, E., Badassan, T. E.-E., Agbere, S., Adje, K., Nedeff, V., & Gnandi, K. (2023). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Contamination in *Chrysichthys nigrodigitatus* Lacépède, 1803 from Lake Togo-Lagoon of Aného, Togo: Possible Human Health Risk Suitable to Their Consumption. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 20(3), 1666.

- Paetzold, S. C., Ross, N. W., Richards, R. C., Jones, M., Hellou, J., & Bard, S. M. (2009). Up-regulation of hepatic ABCC2, ABCG2, CYP1A1 and GST in multixenobiotic-resistant killifish (*Fundulus heteroclitus*) from the Sydney Tar Ponds, Nova Scotia, Canada. *Marine Environmental Research*, 68(1), 37–47.
- Palade, L. M., Negoită, M., Adascălului, A. C., & Mihai, A. L. (2023). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Occurrence and Formation in Processed Meat, Edible Oils, and Cereal-Derived Products: A Review. *Applied Sciences*, 13(13), 7877.
- Pan, S., Li, D., Zhao, L., Schenkman, J. B., & Rusling, J. F. (2013). Genotoxicity-related chemistry of human metabolites of benzo [ghi] perylene (B [ghi] P) investigated using electro-optical arrays and DNA/microsome biocolloid reactors with LC-MS/MS. *Chemical Research in Toxicology*, 26(8), 1229–1239.
- Pande, C. B., Moharir, K. N., Khadri, S. F. R., & Patil, S. (2018). Study of land use classification in an arid region using multispectral satellite images. *Applied Water Science*, 8(5), 1–11.
- Parkerton, T. F., French-McCay, D., de Jourdan, B., Lee, K., & Coelho, G. (2023). Adopting a toxic unit model paradigm in design, analysis and interpretation of oil toxicity testing. *Aquatic Toxicology*, 106392.
- Paumen, M. L., De Voogt, P., Van Gestel, C. A. M., & Kraak, M. H. S. (2009). Comparative chronic toxicity of homo-and heterocyclic aromatic compounds to benthic and terrestrial invertebrates: Generalizations and exceptions. *Science of the Total Environment*, 407(16), 4605–4609.
- Peteri, A. (2004). Cultured aquatic species information programme. *Cyprinus carpio*. Rome: *FAO Fisheries and Aquaculture Department*. Cited, 16,

- 2013.
- Pii, Y., Marastoni, L., Gemassmer, E., Valentinuzzi, F., Mazzetto, F., Mimmo, T., & Cesco, S. (2019). Phytotoxicity alleviation by bacterial species isolated from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated sites. *Environmental Technology & Innovation*, 13, 104–112.
- Pilcher, W., Miles, S., Tang, S., Mayer, G., & Whitehead, A. (2014). Genomic and genotoxic responses to controlled weathered-oil exposures confirm and extend field studies on impacts of the Deepwater Horizon oil spill on native killifish. *PLoS One*, 9(9), e106351.
- Platt, K. L., & Grupe, S. (2005). Microsomal biotransformation of benzo [ghi] perylene, a mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbon without a “classic” bay region. *Chemical Research in Toxicology*, 18(4), 700–710.
- Platt, K. L., Grupe, S., & Fickler, M. (2008). The 3, 4-oxide is responsible for the DNA binding of benzo [ghi] perylene, a polycyclic aromatic hydrocarbon without a “classic” bay-region. *Chemico-Biological Interactions*, 176(2–3), 179–187.
- Poland, A., Glover, E., & Kende, A. S. (1976). Stereospecific, high affinity binding of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry*, 251(16), 4936–4946.
- Protection, I.-I. J. G. of E. on the S. A. of M. E. (1997). *Towards safe and effective use of chemicals in coastal aquaculture* (Issue 65). Food & Agriculture Org.
- Rahmanpour, S., Farzaneh Ghorghani, N., & Lotfi Ashtiyani, S. M. (2014).

- Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) in four fish species from different trophic levels in the Persian Gulf. *Environmental Monitoring and Assessment*, 186, 7047–7053.
- Ramirez-Corredores, M. M. (2017). *The science and technology of unconventional oils: finding refining opportunities*. Academic press.
- Recabarren-Villalón, T., Ronda, A. C., Oliva, A. L., Cazorla, A. L., Marcovecchio, J. E., & Arias, A. H. (2021). Seasonal distribution pattern and bioaccumulation of Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in four bioindicator coastal fishes of Argentina. *Environmental Pollution*, 291, 118125.
- Redman, A. D., Butler, J. D., Letinski, D. J., & Parkerton, T. F. (2017). Investigating the role of dissolved and droplet oil in aquatic toxicity using dispersed and passive dosing systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(4), 1020–1028.
- Reed, L., Arlt, V. M., & Phillips, D. H. (2018). The role of cytochrome P450 enzymes in carcinogen activation and detoxication: an in vivo–in vitro paradox. *Carcinogenesis*, 39(7), 851–859.
- Reeves, R. (2015). High mobility group (HMG) proteins: Modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells. *DNA Repair*, 36, 122–136.
- Reizer, E., Viskolcz, B., & Fiser, B. (2021). Formation and growth mechanisms of polycyclic aromatic hydrocarbons: A mini-review. *Chemosphere*, 132793.
- Rejano-Gordillo, C. M., Marín-Díaz, B., Ordiales-Talavera, A., Merino, J. M., González-Rico, F. J., & Fernández-Salguero, P. M. (2022). From Nucleus to Organs: Insights of Aryl Hydrocarbon Receptor Molecular

- Mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 14919.
- Reynolds, C. R., Islam, S. A. and Sternberg, M. J. E. (2018). EzMol: A web server wizard for the rapid visualization and image production of protein and nucleic acid structures. *Journal of Molecular Biology*, 430(15): 2244-2248.
- Ribeil, J.-A., Hacein-Bey-Abina, S., Payen, E., Magnani, A., Semeraro, M., Magrin, E., Caccavelli, L., Neven, B., Bourget, P., & El Nemer, W. (2017). Gene therapy in a patient with sickle cell disease. *New England Journal of Medicine*, 376(9), 848–855.
- Romero, I. C., Sutton, T., Carr, B., Quintana-Rizzo, E., Ross, S. W., Hollander, D. J., & Torres, J. J. (2018). Decadal assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in mesopelagic fishes from the Gulf of Mexico reveals exposure to oil-derived sources. *Environmental Science & Technology*, 52(19), 10985–10996.
- Rusni, S., Sassa, M., Takagi, T., Kinoshita, M., Takehana, Y., & Inoue, K. (2022). Establishment of cytochrome P450 1a gene-knockout Javanese medaka, *Oryzias javanicus*, which distinguishes toxicity modes of the polycyclic aromatic hydrocarbons, pyrene and phenanthrene. *Marine Pollution Bulletin*, 178, 113578.
- Saitova, A., Strokin, S., & Ancheyta, J. (2021). Evaluation and comparison of thermodynamic and kinetic parameters for oxidation and pyrolysis of Yarega heavy crude oil asphaltenes. *Fuel*, 297, 120703.
- Sakai, R., Kondo, C., Oka, H., Miyajima, H., Kubo, K., & Uehara, T. (2014). Utilization of CDKN1A/p21 gene for class discrimination of DNA damage-induced clastogenicity. *Toxicology*, 315, 8–16.

- Salman, J. M., Al-Azaway, A. S. N., & Hassan, F. M. (2014). The study of pollution of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in Al-Hilla River, Iraq by using bioindicator freshwater crab (*Sesarma Boulengeri* Calman). *Journal of Life Sciences*, 8(4).
- Sambrook, J. F. and Russell, D. W. (2006). Detection of DNA in agarose gels. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1), pdb-prot4022
- Santana, M. S., Sandrini-Neto, L., Neto, F. F., Ribeiro, C. A. O., Di Domenico, M., & Prodocimo, M. M. (2018). Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Systematic review and meta-analysis. *Environmental Pollution*, 242, 449–461.
- Santi, F., Vella, E., Jeffress, K., Deacon, A., & Riesch, R. (2021). Phenotypic responses to oil pollution in a poeciliid fish. *Environmental Pollution*, 290, 118023.
- Santos, C., de Oliveira, M. T., de Syllos Cólus, I. M., Sofia, S. H., & dos Reis Martinez, C. B. (2018). Expression of *cyp1a* induced by benzo (A) pyrene and related biochemical and genotoxic biomarkers in the neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 61, 30–37.
- Sarigiannis, D. A., Karakitsios, S. P., Zikopoulos, D., Nikolaki, S., & Kermenidou, M. (2015). Lung cancer risk from PAHs emitted from biomass combustion. *Environmental Research*, 137, 147–156.
- Shankar, P., Dasgupta, S., Hahn, M. E., & Tanguay, R. L. (2020). A review of the functional roles of the zebrafish aryl hydrocarbon receptors. *Toxicological Sciences*, 178(2), 215–238.
- Sharma, B. M., Melymuk, L., Bharat, G. K., Příbylová, P., Sáníka, O., Klánová, J., & Nizzetto, L. (2018). Spatial gradients of polycyclic

- aromatic hydrocarbons (PAHs) in air, atmospheric deposition, and surface water of the Ganges River basin. *Science of the Total Environment*, 627, 1495–1504.
- Shimada, T. (2006). Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 21(4), 257–276.
- Shishkova, I., Stratiev, D., Kolev, I. V., Nenov, S., Nedanovski, D., Atanassov, K., Ivanov, V., & Ribagin, S. (2022). Challenges in Petroleum Characterization—A Review. *Energies*, 15(20), 7765.
- Silverio, R., & Szklo, A. (2012). The effect of the financial sector on the evolution of oil prices: Analysis of the contribution of the futures market to the price discovery process in the WTI spot market. *Energy Economics*, 34(6), 1799–1808.
- Šimečková, P., Pěňčíková, K., Kováč, O., Slavík, J., Pařenicová, M., Vondráček, J., & Machala, M. (2022). In vitro profiling of toxic effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on nuclear receptor signaling, disruption of endogenous metabolism and induction of cellular stress. *Science of The Total Environment*, 815, 151967.
- Sinaei, M., & Zare, R. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and some biomarkers in the green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*, 146, 336–342.
- Snyder, S. M., Pulster, E. L., Wetzel, D. L., & Murawski, S. A. (2015). PAH exposure in Gulf of Mexico demersal fishes, post-Deepwater Horizon. *Environmental Science & Technology*, 49(14), 8786–8795.
- Soltani, T., Safahieh, A., Zolgharnien, H., & Matroodi, S. (2019). Interactions of oxidative DNA damage and CYP1A gene expression with the liver

- enzymes in Klunzinger's mullet exposed to benzo [a] pyrene. *Toxicology Reports*, 6, 1097–1103.
- Sparnins, V. L., Mott, A. W., Barany, G., & Wattenberg, L. W. (1986). *Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BP-induced neoplasia in the mouse.*
- Stenson, P. D., Mort, M., Ball, E. V, Howells, K., Phillips, A. D., Thomas, N. S. T., & Cooper, D. N. (2009). The human gene mutation database: 2008 update. *Genome Medicine*, 1(1), 1–6.
- Sukhumsirichart, W. (2018). Polymorphisms. In *Genetic diversity and disease susceptibility*. IntechOpen. PP154.
- Sun, K., Song, Y., He, F., Jing, M., Tang, J., & Liu, R. (2021). A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. *Science of The Total Environment*, 773, 145403.
- Suzuki, N., Sato, M., Nassar, H. F., Abdel-Gawad, F. K., Bassem, S. M., Yachiguchi, K., Tabuchi, Y., Endo, M., Sekiguchi, T., & Urata, M. (2016). Seawater polluted with highly concentrated polycyclic aromatic hydrocarbons suppresses osteoblastic activity in the scales of goldfish, *Carassius auratus*. *Zoological Science*, 33(4), 407–413.
- Tabebordbar, M., Zhu, K., Cheng, J. K. W., Chew, W. L., Widrick, J. J., Yan, W. X., Maesner, C., Wu, E. Y., Xiao, R., & Ran, F. A. (2016). In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science*, 351(6271), 407–411.
- Tajari, M., Kamali, A., Rajabi Islami, H., & Paknejad, H. (2022). Hepatic CYP450 gene expression, hematological and biochemical indices in Caspian roach (*Rutilus caspius*) induced by Endosulfan. *Iranian Journal*

- of Fisheries Sciences*, 21(3), 758–768.
- Tambalis, K. D., & Arnaoutis, G. (2022). The importance of branched-chain amino acids and nitrate in sports performance and health. *Journal of Physical Activity Research*, 7(1), 37–46.
- Thanuthong, T., Francis, D. S., Manickam, E., Senadheera, S. D., Cameron-Smith, D., & Turchini, G. M. (2011). Fish oil replacement in rainbow trout diets and total dietary PUFA content: II) Effects on fatty acid metabolism and in vivo fatty acid bioconversion. *Aquaculture*, 322, 99–108.
- Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S. M., & Müller, E. F. (1997). Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery*, 6, 57–73.
- Tuan, T., Kaminishi, Y., Funahashi, A., Hassanin, A. A. I., & Itakura, T. (2014). Cloning and tissue expression of cytochrome P450 1B1 and 1C1 genes from Javanese Medaka, *Oryzias Javanicus*, under environmental stress conditions. *African Journal of Biotechnology*, 13(20).
- UNEP (United Nation Environmental program) (1989). Comparative toxicity test of water accommodated fraction of oils and oil dispersants to marine organisms. Reference methods for marine Pollution No.45,21P.
- Uno, S., Koyama, J., Kokushi, E., Monteclaro, H., Santander, S., Cheikyula, J. O., Miki, S., Añasco, N., Pahila, I. G., & Taberna, H. S. (2010). Monitoring of PAHs and alkylated PAHs in aquatic organisms after 1 month from the Solar I oil spill off the coast of Guimaras Island, Philippines. *Environmental Monitoring and Assessment*, 165(1), 501–

515.

- Uno, S., Sakurai, K., Nebert, D. W., & Makishima, M. (2014). Protective role of cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) against benzo [a] pyrene-induced toxicity in mouse aorta. *Toxicology*, 316, 34–42.
- US EPA, I. (2017). *Toxicological Review of Benzo [a] pyrene*. Integrated Risk Information System National Center for Environmental Assessment Office of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2), 57–149.
- Van Laere, A.-S., Nguyen, M., Braunschweig, M., Nezer, C., Collette, C., Moreau, L., Archibald, A. L., Haley, C. S., Buys, N., & Tally, M. (2003). A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*, 425(6960), 832–836.
- Van Tiem, L. A. (2011). *Molecular Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-induced Teratogenesis in Zebrafish (Danio rerio)*. Department of Environment Duke University.
- Vanzella, T. P., Martinez, C. B. R., & Cólus, I. M. S. (2007). Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 631(1), 36–43.
- Verma, S., Manna, M. K., Pandey, S. K., Das, A. K., & Mukherjee, S. (2014). Benzo [ghi] perylene monoimide based photosensitive lamellar Cd-doped ZnO nanohybrids. *RSC Advances*, 4(107), 62603–62614.
- Vlaev, L., Petkov, P., Dimitrov, A., & Genieva, S. (2011). Cleanup of water

- polluted with crude oil or diesel fuel using rice husks ash. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(6), 957–964.
- Volney, G., Tatusov, M., Yen, A. C., & Karamyan, N. (2018). Naphthalene toxicity: methemoglobinemia and acute intravascular hemolysis. *Cureus*, 10(8).
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., Hu, J., Fleming, I., & Wang, D. W. (2021a). Metabolism pathways of arachidonic acids: Mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), 94.
- Wang, D.-Q., Yu, Y.-X., Zhang, X.-Y., Zhang, S.-H., Pang, Y.-P., Zhang, X.-L., Yu, Z.-Q., Wu, M.-H., & Fu, J.-M. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in fish from Taihu Lake: Their levels, sources, and biomagnification. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 82, 63–70.
- Wang, D. G., Fan, J.-B., Siao, C.-J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., & Spencer, J. (1998). Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280(5366), 1077–1082.
- Wang, Z., An, C., Lee, K., Owens, E., Chen, Z., Boufadel, M., Taylor, E., & Feng, Q. (2021b). Factors influencing the fate of oil spilled on shorelines: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(2), 1611–1628.
- Waters, M. D., Jackson, M., & Lea, I. (2010). Characterizing and predicting carcinogenicity and mode of action using conventional and toxicogenomics methods. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 705(3), 184–200.
- Williams, R., Taggart, T., Ganger, K., Koetsier, T., Johnson, S., & Dinchman,

- A. (2022). CYP1A expression in freshwater fish of western New York as an indicator of pollution levels. *Ecology and Evolution*, 12(1), e8526.
- Wright, E. J., De Castro, K. P., Joshi, A. D., & Elferink, C. J. (2017). Canonical and non-canonical aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Current Opinion in Toxicology*, 2, 87–92.
- Xia, K., Hagood, G., Childers, C., Atkins, J., Rogers, B., Ware, L., Armbrust, K., Jewell, J., Diaz, D., & Gatian, N. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Mississippi seafood from areas affected by the Deepwater Horizon oil spill. *Environmental Science & Technology*, 46(10), 5310–5318.
- Xie, J., Tao, L., Wu, Q., Lei, S., & Lin, T. (2021). Environmental profile, distributions and potential sources of halogenated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126164.
- Xu, F.-L., Wu, W.-J., Wang, J.-J., Qin, N., Wang, Y., He, Q.-S., He, W., & Tao, S. (2011). Residual levels and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fishes from Lake Small Bai-Yang-Dian, Northern China. *Ecological Modelling*, 222(2), 275–286.
- Xu, P., Zhang, X., Wang, X., Li, J., Liu, G., Kuang, Y., Xu, J., Zheng, X., Ren, L., & Wang, G. (2014). Genome sequence and genetic diversity of the common carp, *Cyprinus carpio*. *Nature Genetics*, 46(11), 1212–1219.
- Yadete, F., Zhang, X., Hanna, E. M., Aranguren-Abadía, L., Eide, M., Blaser, N., Brun, M., Jonassen, I., Goksøyr, A., & Karlsen, O. A. (2018). RNA-Seq analysis of transcriptome responses in Atlantic cod (*Gadus morhua*) precision-cut liver slices exposed to benzo [a] pyrene and 17 α -ethynylestradiol. *Aquatic Toxicology*, 201, 174–186.
- Yamaguchi, A., Uchida, M., Ishibashi, H., Hirano, M., Ichikawa, N., Arizono,

- K., Koyama, J., & Tominaga, N. (2020). Potential mechanisms underlying embryonic developmental toxicity caused by benzo [a] pyrene in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Chemosphere*, 242, 125243.
- Yang, J., Qadeer, A., Liu, M., Zhu, J.-M., Huang, Y.-P., Du, W.-N., & Wei, X.-Y. (2019). Occurrence, source, and partition of PAHs, PCBs, and OCPs in the multiphase system of an urban lake, Shanghai. *Applied Geochemistry*, 106, 17–25.
- Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., & Fang, M. (2013). Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 1–6.
- Yazdani, M. (2020). Comparative toxicity of selected PAHs in rainbow trout hepatocytes: genotoxicity, oxidative stress and cytotoxicity. *Drug and Chemical Toxicology*, 43(1), 71–78.
- Yemmen, C., & Gargouri, M. (2022). Potential hazards associated with the consumption of Scombridae fish: Infection and toxicity from raw material and processing. *Journal of Applied Microbiology*, 132(6), 4077–4096.
- Yu, Z., Lin, Q., Gu, Y., Du, F., Wang, X., Shi, F., Ke, C., Xiang, M., & Yu, Y. (2019). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine fish from the coastal waters of the northern South China Sea: Risk assessment for human health. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 180, 742–748.
- Yuan, L., Lv, B., Zha, J., Wang, Z., Wang, W., Li, W., & Zhu, L. (2013). New cytochrome P450 1B1, 1C1, 2Aa, 2Y3, and 2K genes from Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*): Molecular characterization, basal expression and response of rare minnow CYP1s and CYP2s mRNA exposed to the AHR agonist benzo [a] pyrene. *Chemosphere*, 93(2), 209–

216.

Zajda, K., Rak, A., Ptak, A., & Gregoraszcuk, E. L. (2019). Compounds of PAH mixtures dependent interaction between multiple signaling pathways in granulosa tumour cells. *Toxicology Letters*, 310, 14–22.

Zanette, J., Jenny, M. J., Goldstone, J. V., Woodin, B. R., Watka, L. A., Bainy, A. C. D., & Stegeman, J. J. (2009). New cytochrome P450 1B1, 1C2 and 1D1 genes in the killifish *Fundulus heteroclitus*: Basal expression and response of five killifish CYP1s to the AHR agonist PCB126. *Aquatic Toxicology*, 93(4), 234–243.

Zaragoza-Ojeda, M., Eguía-Aguilar, P., Perezpeña-Díazconti, M., & Arenas-Huertero, F. (2016). Benzo [ghi] perylene activates the AHR pathway to exert biological effects on the NL-20 human bronchial cell line. *Toxicology Letters*, 256, 64–76.

Zaragoza-Ojeda, M., Torres-Flores, U., Rodríguez-Leviz, A., & Arenas-Huertero, F. (2022). Benzo [ghi] perylene induces cellular dormancy signaling and endoplasmic reticulum stress in NL-20 human bronchial epithelial cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 439, 115925.

Zhang, G., Pan, Z., Wang, X., Mo, X., & Li, X. (2015). Distribution and accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the food web of Nansi Lake, China. *Environmental Monitoring and Assessment*, 187, 1–12.

Zhang, L., Ji, X., Ding, F., Wu, X., Tang, N., & Wu, Q. (2022). Apoptosis and blood-testis barrier disruption during male reproductive dysfunction induced by PAHs of different molecular weights. *Environmental Pollution*, 300, 118959.

Zhang, Y., Dong, S., Wang, H., Tao, S., & Kiyama, R. (2016). Biological

impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environmental Pollution*, 213, 809–824.

Zhang, Y., Wang, X., Fu, Y., Yin, L., Pu, Y., & Liang, G. (2014). Expression profiling and pathway analysis of microRNA expression in the lungs of mice exposed to long-term, low-dose benzo (a) pyrene. *Molecular & Cellular Toxicology*, 10(1), 67–74.

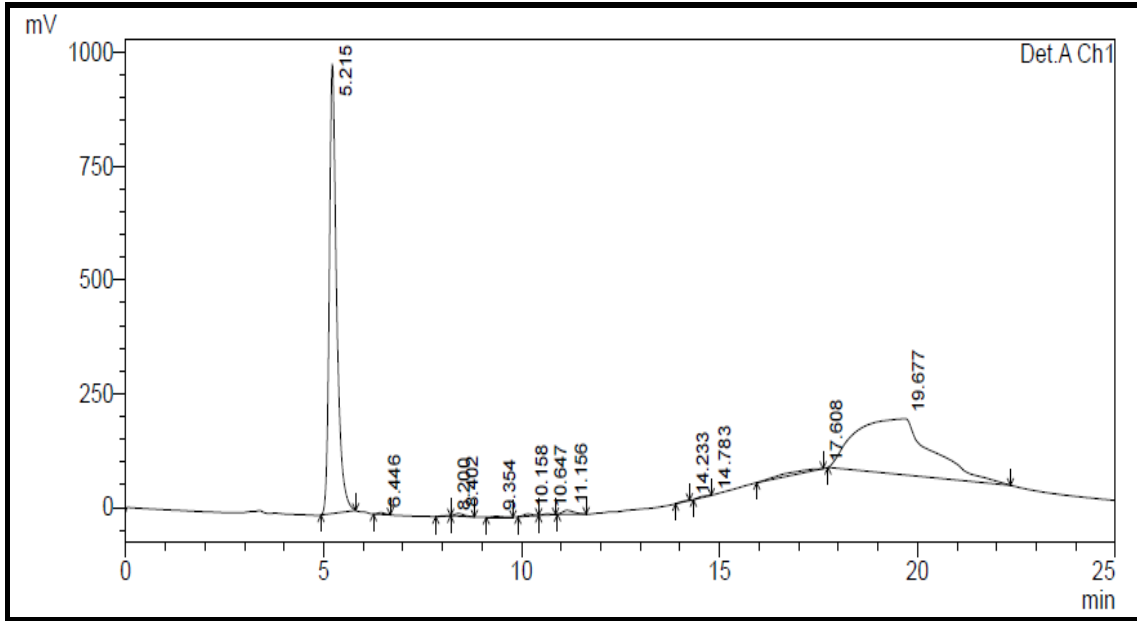
Zhao, S., Wang, J., Feng, S., Xiao, Z., & Chen, C. (2022). Effects of ecohydrological interfaces on migrations and transformations of pollutants: A critical review. *Science of the Total Environment*, 804, 150140.

Zhao, Z., & Boerwinkle, E. (2002). Neighboring-nucleotide effects on single nucleotide polymorphisms: a study of 2.6 million polymorphisms across the human genome. *Genome Research*, 12(11), 1679–1686.

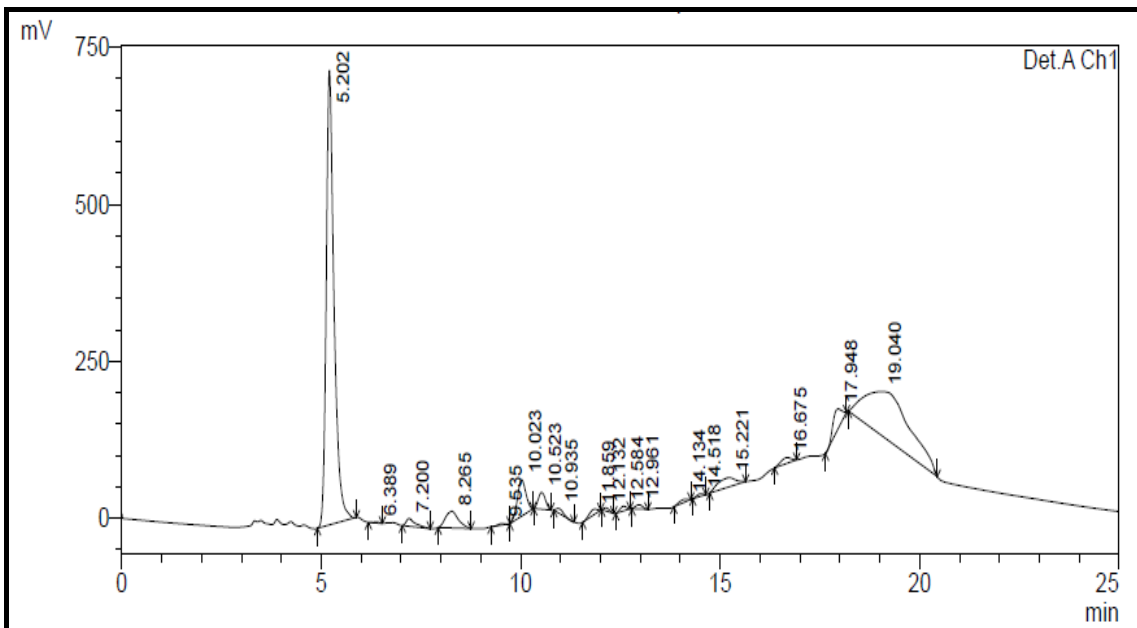
الملاحق

Appendix

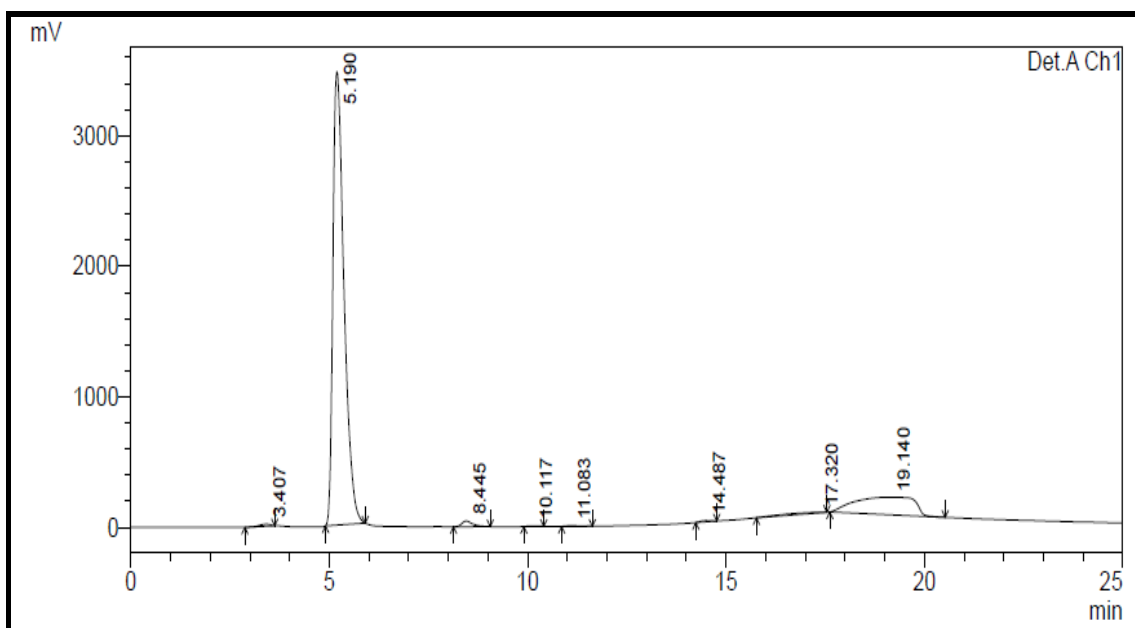
ملحق (1) كروماتوغرامات لمركبات PAHs في أحشاء أسماك الكارب الشائع لمجموعة السيطرة



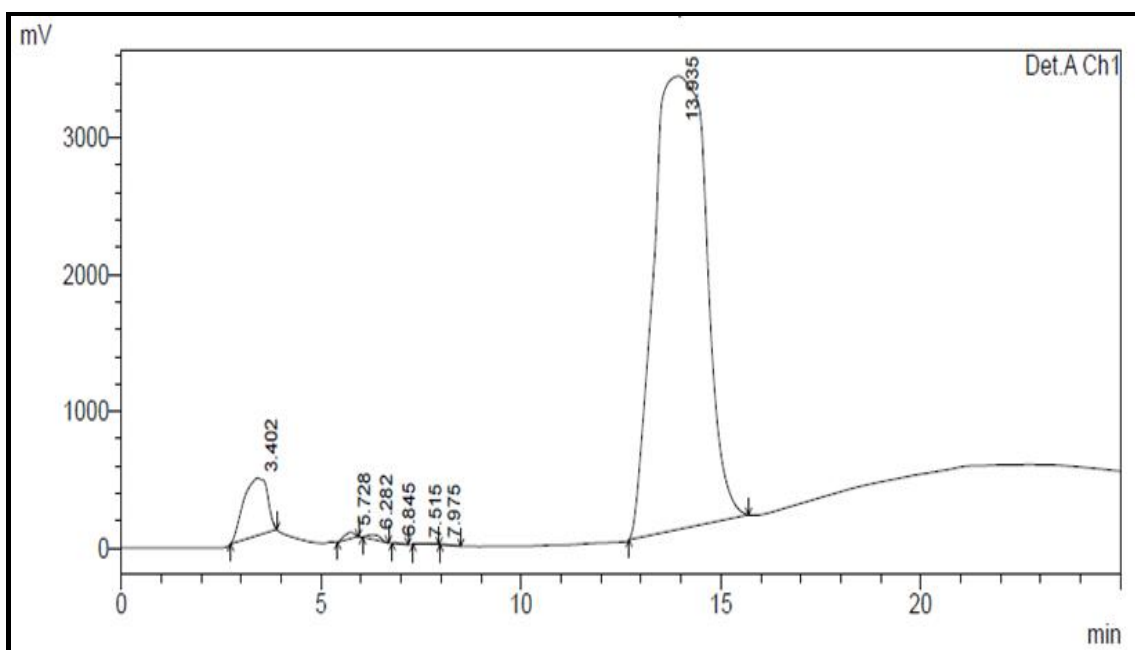
ملحق (2) كروماتوغرامات لمركبات PAHs في أحشاء أسماك الكارب الشائع لمجموعة النفط الخام



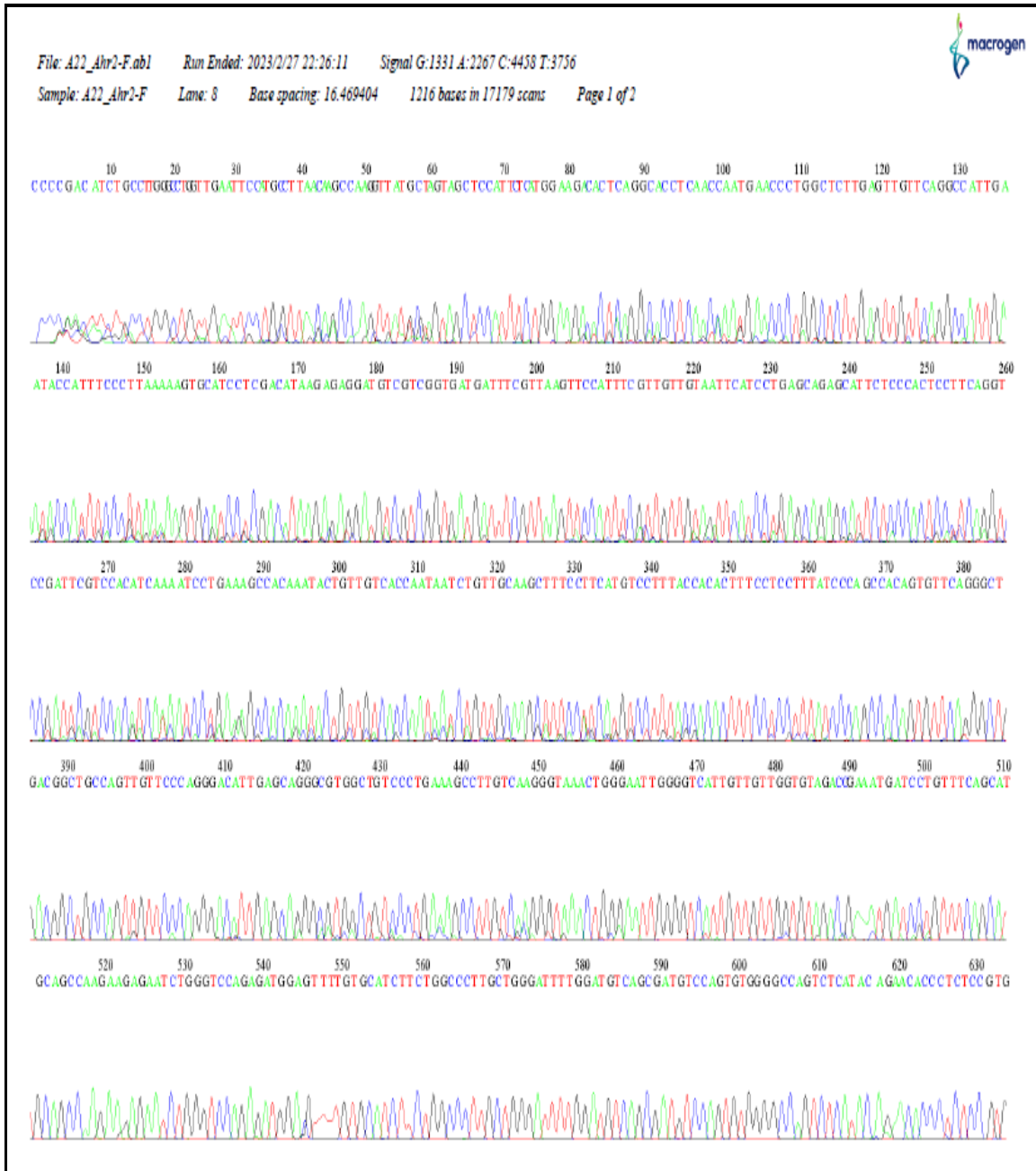
ملحق (3) كروماتوغرامات لمركبات PAHs في عضلات أسماك الكارب الشائع لمجموعة السيطرة



ملحق (4) كروماتوغرامات لمركبات PAHs في عضلات أسماك الكارب الشائع لمجموعة النفط الخام



ملحق (5) تسلسل جين *Ahr2*



ملحق (7) تسجيل جين *AhR2* على مواقع الـ DDBJ و NCBI و EMBL

Cyprinus carpio A37 AhR2 gene, partial sequence

GenBank: LC768696.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS LC768696 538 bp DNA linear VRT 24-MAY-2023

DEFINITION Cyprinus carpio A37 AhR2 gene, partial sequence.

ACCESSION LC768696

VERSION LC768696.1

KEYWORDS

SOURCE Cyprinus carpio (common carp)

ORGANISM [Cyprinus carpio](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;

Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Ostariophysi; Cypriniformes; Cyprinidae; Cyprininae; Cyprinus.

REFERENCE 1

AUTHORS Hatem,A.H., Faraj,S.H. and Jazza,S.H.

TITLE Study of Genetic Variation resulting from exposure of two local Fish species to polycyclic Aromatic hydrocarbons (benzo (a) pyrene and Benzo (ghi) perlyene} and Crude oil

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 538)

AUTHORS Hatem,A.H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-MAY-2023) Contact:Alaa Hassan Hatem University of Misan, Collage of science; Misan, Misan 57000, Iraq URL :<https://uomisan.edu.iq/ar/>

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..538

/organism="Cyprinus carpio"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="A37"

/db_xref="taxon:7962"

/tissue_type="blood"

/country="Iraq"

/collection_date="2023-02-01"

/collected_by="Ibtihal Majed Noori"

gene <1..>538

/gene="AhR2"

misc_feature <1..>538

/gene="AhR2"

/note="aryl hydrocarbon receptor 2"

ORIGIN

```

1 ctccatttct ggaagacact caggcacctc aacaaatgaa ccctgggtct tgagttgttc
61 aggccattga ataccatttc ccttaaaaag tgcatcctcg acataagaga ggatgtcgtc
121 ggtgatgatt tcgttaagtt ccatttcggt gttgtagttc atcctgagca gagcatttcc
181 ccactccttc aggtccgatt cgtccacatc aaaatcctga aagccacaaa tactgtttgtc
241 accaataatc tgttgcaagc tttccttcat gtcctttacc acactttcct cctttatccc
301 agccacagtg ttcagggctg acggctgcca gttgttccca gggacattga gcagggcgtg
361 gctatccctg aaagccttgt caagggtaaa ctgggaattg gggtcattgt tgttggtgta
421 gacagaatga tcctgtttca gcatgcagcc aagaagagaa tctgggtcca gagatggagg
481 tttgtgcatc ttctggccct tgctgggatt ttggatgtca gcgatgtcca gtgtgggg
//

```

ملحق (8) تسجيل جين *CYP1A* على مواقع الـ DDBJ و NCBI و EMBL

Cyprinus carpio C45 CYP1A gene, partial sequence

GenBank: LC768703.1
[FASTA](#) [Graphics](#)

Go to:

LOCUS LC768703 448 bp DNA linear VRT 24-MAY-2023

DEFINITION Cyprinus carpio C45 CYP1A gene, partial sequence.

ACCESSION LC768703

VERSION LC768703.1

KEYWORDS .

SOURCE Cyprinus carpio (common carp)

ORGANISM [Cyprinus carpio](#)
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
 Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Ostariophysi; Cypriniformes; Cyprinidae; Cyprininae; Cyprinus.

REFERENCE 1

AUTHORS Hatem,A.H., Faraj,S.H. and Jazza,S.H.

TITLE Study of Genetic Variation resulting from exposure of two local Fish species to polycyclic Aromatic hydrocarbons {benzo (a) pyrene and Benzo (ghi) perlyene} and Crude oil

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 448)

AUTHORS Hatem,A.H.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-MAY-2023) Contact:Alaa Hassan Hatem University of Misan, Collage of science; Misan, Misan 57000, Iraq URL :<https://uomisan.edu.iq/ar/>

FEATURES

source Location/Qualifiers

1..448

/organism="Cyprinus carpio"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="C45"

/db_xref="taxon:7962"

/tissue_type="blood"

/country="Iraq"

/collection_date="2023-02-01"

/collected_by="Ibtihal Majed Noori"

gene <1..>448

/gene="CYP1A"

misc_feature <1..>448

/gene="CYP1A"

/note="cytochrome P450 1A1-like"

ORIGIN

1 gatcggcatg cgtcccgtag tgggtgctcag cggaaacgacg tgatccgtca agctctcctc

61 aaacaagggtg aggagttcgc cggacgtccg gatctctaca gcactagggtt catcggtgat

121 ggaaagagcc tggccttttag tacggatcag gtgggtgtct ggcgcgcccg tcgcaaactg

181 gccctcagcg ccctgagaac attttcacg gtgcaaggcg aaagctcaga gtattcatgt

241 gcccttgagg agcacatcag caaggaaggt ctctatctga ttgaacggct tcacaacgtc

301 atgaaggctg acgggagttt cgatcccttc cggcacatcg tgggtctctgt ggccaacgtg

361 atctgtggga tttgcttcgg cgggcgtac agccacgacg atgacgagct ggtgagttg

421 gtcaatttga gcgacgagtt cgggaaga

//

Summary

summary

The current study was conducted for the period from 25/11/ 2022, to 16/4/2023, on a sample of 60 common carp fish of similar ages their average weights (35 grams/fish), divided into six groups, each consisting of 10 fish, the first group (control) was not treated with any of the test materials, and the other five groups were dosed with one of the following test materials: [Crude oil and B(a)P 1µg/kg and B(a)P 10µg/kg and B(ghi)P 1µg/kg and B(ghi)P 10µg /kg], the dose of crude oil was 25µ L per fish, and the dose of the rest of the totals was 5µ L per gram of body weight at a rate of three doses per fish 48 hours apart. On the tenth day of dosing, Blood, muscle tissue and viscera samples were drawn on the tenth day of the beginning of the dosage, the concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in muscle tissue, viscera and water used in fish farming were estimated. As for the blood samples, DNA was extracted from them, and then a polymerase chain reaction (PCR) was performed for the *AhR2* and *CYP1A* genes. The samples were sent to the Korean company Macrogen for the purpose of DNA sequencing analysis. Some bioinformatics software was used for the purpose of alignment sequences for our samples and analysis with the standard sequences published in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the program (BioEdit) and the detection of genetic morphology and nucleotide diversity using the program (DnaSP 5.10), and changes in amino acids were identified using the program (MEGA X), and the network of haplotypes(H) was drawn using (Network 5.0.0.0) and three-dimensional structural protein drawing using (Phyre2 V.2.0), and the results were summarized as follows:

First: The results of the current study showed the ability of common carp fish to accumulate PAHs in their various tissues when exposed to certain concentrations of crude oil, and the internal viscera recorded higher concentrations of total PAHs compared to muscles. It was also found that the

summary

concentrations of high molecular weight PAHs are higher than the concentrations of low molecular weight PAHs in fish tissues exposed to crude oil.

Second: the results of the analysis of the tenth exon of the *AhR2* gene for test groups were as follows:

1. Control group: showed no change in the sequence of nitrogenous bases.
2. The crude oil group: The occurrence of 10 mutations, 8 of which are non-synonymous and led to the change of amino acids, while the other 2 were synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 4 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.818 and 0.00731, respectively.
3. The B(a)P 1 μ g/kg group: The occurrence of 11 mutations, 8 of which are non-synonymous and led to the change of amino acids, while the other 3 were synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 4 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.8181 and 0.00877, respectively.
4. The B(a)P 10 μ g/kg group: The occurrence of 13 mutations, 12 of which are non-synonymous and led to the change of amino acids, while one was synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 4 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.819 and 0.00974, respectively.
5. The B(ghi)P 1 μ g/kg group: The occurrence of 4 mutations, 3 of which are non-synonymous, led to the change of amino acids, while one was synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 4 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.818 and 0.00317, respectively.
6. The B(ghi)P 10 μ g/kg group: The occurrence of 4 mutations, 3 of which are non-synonymous and led to a change in amino acids, while one was

summary

synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 4 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.818 and 0.00317, respectively.

Third: the results of the analysis of the tenth axon of the *CYP1A* gene for

test groups were as follows:

1. Control group and crude oil: They showed no change in the sequence of nitrogenous bases.
2. The B(a)P 1 μ g/ kg group: The occurrence of 8 mutations, 4 of which were non-synonymous and led to a change in amino acids, while the other 4 were synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 5 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.933 and 0.00848, respectively.
3. The B(a)P 10 μ g/kg group: The occurrence of 21 mutations, 13 of which are non-synonymous and led to the change of amino acids, while the other 8 were synonymous, and the number of total haplotypes (H) were 7 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.900 and 0.01435, respectively.
4. The B(ghi)P 1 μ g/kg group: The occurrence of 10 mutations, 3 of which are non-synonymous, led to a change in amino acids, while the other 7 were synonymous, and the number of haplotypes (H) were 6 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.893 and 0.00985, respectively.
5. The B(ghi)P 10 μ g/kg group: The occurrence of 13 mutations, 5 of which are non-synonymous and led to a change in amino acids, while the other 8 were synonymous, and the number of haplotypes (H) were 9 haplotypes, and the values of haplotype diversity (HD) and nucleotide diversity (π) were 0.882 and 0.00974 respectively.

Fourth: The change in the shape of the 3D protein of the above groups and for

summary

both genes, except for the two control groups, the crude oil group in the *CYP1A* gene.

Fifth: The B(a)P compound has higher mutational capacity than B(ghi)P in the *AhR2* and *CYP1A* genes.

Sixth: The *CYP1A* gene is more affected by B(a)P and B(ghi)P compounds than the *AhR2* gene.

Seventh: Some nucleotide sequences were recorded in the current study of the *AhR2* and *CYP1A* genes in the global genebanks NCBI, DDBJ, and EMBL. As follows:

AhR2: LC768696, LC768697, LC768698, LC768699, LC768700

CYP1A: LC768701, LC768702, LC768703, LC768704, LC768705

Republic of Iraq
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Misan - College of Science
Department of Biology



Genetic variation of *Ahr2* and *CYP1A* of Common carp exposure to crude oil, Benzo(a) pyrene and Benzo (ghi) perylene

A Thesis

Submitted to the Council of the College of Science University of Misan as
Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree in Biology

By

Alaa Hassan Hatem

B.Sc. Biology (2005)

Supervised

Assist. Prof. Dr.

Salah Hassan Faraj

2023 A.D

Assist. Prof. Dr.

Salih Hassan Jazza

1445 A.H