

## آنالیز پلی مورفیسم DNA القاء شده در موشها بوسیله تشعشات رادیواکتیو حاد و مزمن

شهین مرادنسب بدرآبادی<sup>۱</sup>، محمدرضا محمدآبادی<sup>۲\*</sup>، و ولادیمیر آندریویچ شفچنکو<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> آکادمی علوم روسیه، انستیتو ژنتیک و اوایل، بخش ژنتیک تشعشع

<sup>۲</sup> کرمان، دانشگاه شهید باهنر، دانشکده کشاورزی، گروه علوم دامی، ژنتیک و بیوتکنولوژی

<sup>۳</sup> آکادمی علوم روسیه، انستیتو ژنتیک و اوایل، بخش ژنتیک تشعشع

تاریخ دریافت: ۸۶/۸/۶ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۱/۲۹

### چکیده

نتایج تحقیقات زیادی نشان داده که در جمعیت‌های گیاهی و حیوانی که به طور طبیعی تحت تأثیر اشعه قرار گرفته اند ناپایداری ژنتیکی مشاهده می شود. هدف از تحقیق حاضر ما این بود که پلی مورفیسم RAPD در زاده های حاصل از والدینی که ۳ گری و نیز والدینی که به طور مزمن (مجموع دز ۳۷ سانتی گری) اشعه دریافت کرده بودند مورد بررسی قرار گیرد. روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) به طور گسترده ای برای طبقه بندی نژاد ها، لاینها، ارقام و محیط کشتها و نیز برای رسم نقشه های فیلو ژنتیکی استفاده می شود. از نقطه نظر مانیتورینگ ژنتیک تشعشع، نکته مثبت روش RAPD این است که بررسی ژنوم بچه های والدین اشعه دیده خیلی سریع امکان پذیر است و نیازی به دانستن توالی ژنوم موجود از قبل نیست. در این آزمایش از موشهای نر لاین *CBA/lac*, *BALB/c* و ماده های هیبرید (*CBA/lac* × *c57/black*) استفاده شد. نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از این پرایمر ها بیشترین تغییر پذیری مارکر های RAPD را در زاده های موشهای نری می دهد که تحت اشعه گامای حاد با دز ۳ گری سه ماه قبل از جفتگیری قرار داشتند. همچنین افزایش سطح پلی مورفیسم DNA در زاده های موشهایی که تحت اشعه گامای مزمن بودند مشاهده گردید. نتایج مشخص کرد که سطح پلی مورفیسم در موشهای اشعه دیده در مقایسه با موشهای کنترل ۵۰-۲۷ درصد بالاتر است. استفاده از این مجموعه پرایمر ها (۷۶۰، ۷۶۱، ۷۶۲ و ۷۶۳)، ۷۶۵ و M2 (۷۶۶، ۷۶۸، ۷۶۹ و ۷۷۵) امکان داد که افزایش معنی داری در فراوانی متوسط باندهای جدید در زاده های گروه تیمار به دست آید که فرصت تحقیقات بعدی در این سیستم را برای مطالعه القاء ناپایداری ژنومی می دهد.

واژه های کلیدی: پلی مورفیسم، اشعه، موش، Random Amplified Polymorphic DNA

\*نویسنده مسئول، تلفن تماس ۰۹۱۳۳۹۸۷۵۳۴، پست الکترونیک: mrm2005@gmail.com

### مقدمه

گرفته شده تا شبنما باشند، برای جستجوی سنگها و مواد معدنی مفید و ساخت سلاح های جنگی از مواد رادیواکتیو استفاده کرد. همه این موارد، به طور طبیعی منجر به این می شود که مردم دز بیشتری از اشعه را دریافت نمایند. در اکثر موارد دز اشعه ای که مواد طبیعی تولید می کنند زیاد نیست ولی بعضی اوقات منابع ساخت بشر هزاران بار اشعه بیشتری تولید می کنند. بنابراین اکنون شدیداً نیازمند آن است که اثر تشعشع را روی سیستمهای بیولوژیکی مطالعه

مطالعه تأثیر تشعشع روی سیستمهای بیولوژیکی یکی از موضوعات فعال زیست شناسی مدرن است. در دهه های اخیر انسان به طور فعالی مشکلات و مسائل فیزیک هسته ای را مورد مطالعه قرار داده است. در طی این سالها انسان صدها نوکلئوتید رادیواکتیو را ساخت. آموخت که چگونه اتم را در رشته های مختلف پزشکی استفاده کند، برای تولید انرژی الکتریکی و گرمایی از انرژی اتمی استفاده نمود، ساعتهایی را ساخت که در آنها مواد رادیواکتیو بکار

برای آزمایش تشعشع حاد، دو گروه نر لاین *BALB/c* و دو گروه ماده از لاین *BALB/c* و از هر کدام ۱۵ حیوان استفاده شد. یک گروه از نرها با دز ۳ گری (منبع اشعه  $^{137}\text{Cs}$  و قدرت دز ۴/۵ گری در دقیقه) اشعه داده شد. موشهای کنترل (یک گروه از نرها و دو گروه ماده) در شرایط مشابه تحت تشعشع طبیعی قرار گرفتند.

دو هفته، سه هفته و سه ماه بعد از تشعشع، موشهای تحت اشعه و کنترل با موشهای ماده در قفسهای جداگانه ای، به صورت یک نر با سه ماده آمیزش داده شد. فاصله های بین اشعه دادن و آغاز جفتگیری طوری در نظر گرفته شدند که در آغاز جفتگیری اسپر ماتیدها و اسپرماتوگونی هایی که در دوره تشعشع تشکیل شده اند تمام مراحل تکامل و بلوغ را گذرانده باشند. بعد از اینکه زاده ها به دست آمد نرها از ماده ها جدا گردیده و به گروه اولیه خودشان منتقل شدند. ماده ها را در همان محلی که زاده هایشان به دست آمد نگهداری شد. تعداد زاده های نسل اول هر جفت حیوان و جنس آنها ثبت گشته و بعد از ۴-۳ هفته زاده ها را کشته شدند. در آزمایش تشعشع مزمن از نر های لاین *BALB/c* و برای تلاقی از ماده های هیبرید (*BALB/C* × *C57/black*) استفاده شد. موشهای گروه تیمار به مدت ۲۱۰ شبانه روز تحت اشعه (منبع اشعه سزیم ۱۳۷ و با شدت ۷ میلی راد در ساعت) قرار گرفتند. مجموع کل دز ۳۷ سانتی گری بود. یک هفته بعد از قطع تشعشع، نر های هر دو گروه با ماده ها آمیزش داده شدند. در هر دو آزمایش زاده های به دست آمده از هر دو گروه کنترل و تیمار در سن ۴-۳ هفتگی کشته شدند.

DNA از کبد با کمک کیت (IsoGene Russia) Diatom DNA Prep 200 استخراج گردید. واکنش PCR با استفاده از کیت PCR Core Gene (IsoGene Russia) Pack انجام شد. سیکلهای PCR عبارت بود از دمای دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۵ ثانیه، دمای اتصال برای مرحله اول (اتصال سرد) ۴۲ درجه سانتی گراد

کند تا روشهای حفاظتی و روشهای کاهش خطر اشعه های یونیزه را کشف نماید. نتایج تحقیقات زیادی نشان داده که در جمعیتهای گیاهی و حیوانی که به طور طبیعی تحت تأثیر اشعه قرار گرفته اند ناپایداری ژنتیکی مشاهده شده است که به شکل تغییر صفات ژنتیکی زیادی، از جمله موتاسیونهای کشنده غالب خود را نشان می دهند (۱، ۸، ۱۲، ۱۸، ۱۹، ۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳). در این تحقیق سعی بر آن بوده که تأثیر اشعه یونیزان را روی ارگانسیم های زنده در شرایط آزمایشگاهی مدل سازی کرده و اثر آنها را روی دستگاه ژنتیکی سلول با روشهای مولکولی نشان داده شود. هدف بررسی پلی مورفیسم RAPD در زاده های حاصل از والدینی که ۳ گری و نیز والدینی که به طور مزمن (مجموع دز ۳۷ سانتی گری) اشعه دریافت کرده بودند بوده است.

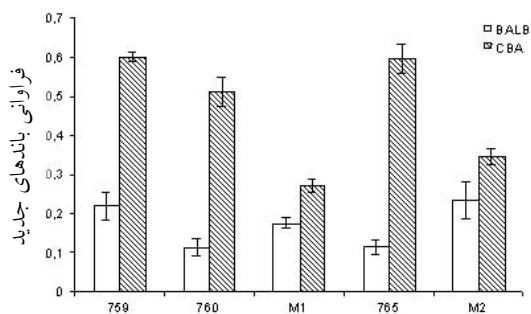
روش RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) به طور گسترده ای برای طبقه بندی نژادها، لاینها، ارقام و محیط کشتها و نیز برای رسم نقشه های فیلو ژنتیکی استفاده می شود (۲۱). از نقطه نظر مانیتورینگ ژنتیک تشعشع، نکته مثبت روش RAPD این است که بررسی ژنوم بچه های والدین اشعه دیده خیلی سریع امکان پذیر است و نیازی به دانستن توالی ژنوم موجود از قبل نیست (۲ و ۷). برای انجام این تحقیقی برای اولین بار روش RAPD اتصال دو مرحله ای (2 Step annealing) استفاده گردید (۱۶ و ۱۷). علاوه بر این، حساسیت مراحل اسپرماتوژنز را به اثر دزهای بزرگ و بر همین اساس چگونگی افزایش پلی مورفیسم DNA مورد مقایسه قرار گرفت و نیز برای اولین بار اثرات ژنتیکی تشعشع حاد و مزمن با هم مقایسه شد.

### مواد و روشها

در این آزمایش از موشهای لاین *BALB/c*، *CBA/lac* و ماده های هیبرید (*CBA/lac* × *c57/black*) استفاده شد که از آزمایشگاه آکادمی علوم پزشکی روسیه تهیه شده بودند.

بصورت جداگانه و هم بصورت مخلوط برای تکثیر مورد استفاده قرار گرفت (۲) که تعداد زیادی باند قابل تشخیص تولید کردند. نتیجه اصلی آزمایش این بود که با استفاده از این پرایمر ها بیشترین تغییرپذیری مارکر های RAPD در زاده های موشهای نری مشاهده شد که تحت اشعه گامای حاد با دز ۳ گری سه ماه قبل از جفتگیری قرار داشتند. همچنین افزایش سطح پلی مور فیسیم DNA در زاده های موشهایی که تحت اشعه گامای مزمن بودند مشاهده گردید.

پلی مور فیسیم خود بخودی (spontaneous) در زاده های موشهای لاینهای *BALB/c* و *CBA/lac* که تحت اشعه نبوده اند: آنالیز مقایسه ای پلی مورفیسیم محصولات RAPD نشان داد که بین زاده های موشهای لاین *BALB/c*، که تحت تأثیر اشعه نبوده اند و زاده های ماده های *CBA/lac* و هیبرید از نظر فراوانی باندهای جدید تفاوت وجود دارد (شکل ۱). برای تمام پرایمر ها و مخلوط پرایمر ها، متوسط سطح پلی مور فیسیم DNA در گروه آخر ۶-۳ بار بیشتر از این سطح در زاده های حاصل از تلاقی نرهای *BALB/c* با ماده های همین لاین بود.



شکل ۱- متوسط فراوانی باندهای جدید در زاده های موشهایی که تحت تشعشع نبوده اند. پرایمرهای استفاده شده عبارت بودند از: ۷۵۹، ۷۶۰، M1 (۷۶۱ و ۷۶۳)، ۷۶۵، M2 (۷۶۶، ۷۶۸، ۷۶۹ و ۷۷۵).

باروری لاینهای نر- ماده *BALB/c* تحت اشعه هنگام آمیزش در زمانهای متفاوت بعد از تشعشع: در جدول ۲ مقایسه تعداد زاده های موشهای نر هنگام آمیزش در جریان هفته دوم، سوم و سه ماه بعد از تشعشع حاد و نیز باروری موشهای نر لاین *CBA/lac* داده شده است.

و برای مرحله دوم (اتصال داغ) ۵۸ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه و دمای سنتز ۷۴ درجه به مدت ۸۰ ثانیه. تعداد کل سیکلها ۳۵ بود. توالی پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ داده شده است. چهار سیکل اول شامل اتصال سرد (درجه حرارت اتصال ۴۲ درجه) و سه سیکل باقیمانده شامل اتصال گرم (درجه حرارت اتصال ۵۸ درجه) بود. در این تحقیق همچنین از مخلوطهای PCR استفاده شد که لیوفیلیزه بودند (Freeze drying=lyophilization) و این امر امکان می دهد که با پرایمر های تصادفی نتایج قابل تجدیدی (reproducible) به دست آید.

جدول ۱- توالی و نام پرایمر های مورد استفاده

نام پرایمر	توالی
759	5'-gga cag gga cat aac aat gc
760	5'- gcg cag ggc cac aat aat gg
M1: 761 763	5'- gca cag gga cat aat aat gg 5'- gct cag ggt tta aac aat gg
765	5'- cga cct aaa gga aac tga tc
M2: 766 768 769 775	5'- cgt cca aaa gga aac tga tc 5'- cgt ccc aaa gga tac tga tc 5'- cgt cca agg gga tac tga tc 5'- cgt cct aaa gga aac tgg tc

جهت کنترل غلظت DNA استخراج شده از ژل آگارز ۱ درصد و برای مشاهده غلظت محصولات PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده شد. ده میکرولیتر از محصولات PCR را، پس از انجام PCR در هر چاهک ریخته و نتایج تحت اشعه ماورا بنفش مشاهده و با Gel Documentation عکسبرداری گردید. برای آنالیز نتایج از نرم افزار STATISTICA استفاده شد.

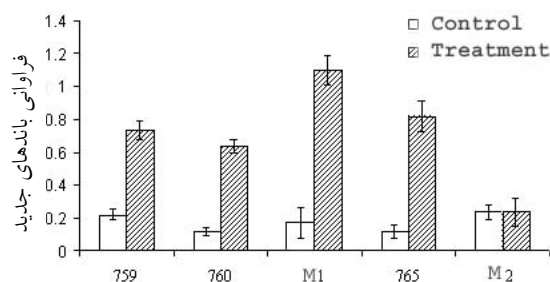
## نتایج

تنظیم شرایط تکثیر: در ابتدا ۹ پرایمر (جدول ۱) هم

جدول ۲- تعداد زاده های موشهای نر کنترل و تیمار هنگام آمیزش بعد از تشعشع حاد و مزمن

تعداد متوسط در هر خانواده	تعداد مینیمم و ماکزیمم زاده ها	تعداد کلی زاده ها در هر گروه	تعداد خانواده های دارای زاده	گروه	
۸/۳۶±۱/۵۵	۳ و ۱۲	۹۷	۸	کنترل	تشعشع حاد
۳/۸۳±۰/۰۴	۳ و ۴	۲۳	۶	تلاقی در مرحله اسپرماتید	تشعشع حاد
۶/۲۹±۱/۳۹	۲ و ۱۰	۹۸	۱۵	تلاقی در مرحله اسپرماتوگونی	
۸±۰/۱۲	۷ و ۹	۴۸	۶	کنترل	تشعشع مزمن
۷±۰/۱۹	۵ و ۸	۴۹	۷	تیمار	تشعشع مزمن

نر لاین *CBA/lac* تحت اشعه مزمن: مثل حالت قبل، DNA ی ۴۸ زاده از نرهای تحت اشعه مزمن و ۴۹ زاده از نرهای کنترل مورد آنالیز قرار گرفت. در جدول ۴ و شکل ۳ نتایج آنالیز داده شده است. تفاوت معنی دار در سطح پلی مورفیسم DNA گروه تیمار فقط با استفاده از پرایمر ۷۵۹ (۳۳/۲۹ درصد) و مخلوط پرایمر های M1 (۵۵/۰۵ درصد) و M2 (۲۳/۶۶ درصد) به دست آمد.



شکل ۲- متوسط فراوانی ظهور باندهای غیر والدینی در یک فرزند گروه کنترل و تیمار هنگامی که در مرحله اسپرماتید تحت تشعشع بوده اند. پرایمرهای استفاده شده عبارت بودند از: M1 (۷۶۰، ۷۵۹)، M2 (۷۶۳، ۷۶۵ و ۷۶۶، ۷۶۸، ۷۶۹ و ۷۷۵).

خاطر نشان ساخته که هنگام آنالیز نتایج RAPD در زاده های موشهای تحت اشعه حاد هم این پرایمر ها تفاوت معنی داری را با گروه کنترل نشان دادند.

### بحث

زمان تلاقی بعد از تشعشع طوری انتخاب شد که اسپرماتوزویدهایی در لقاح تخمک شرکت کنند که در جریان سه ماه بعد از تشعشع با تقسیمات متعدد بوجود آمده اند. هنگام جفتگیری در جریان هفته دوم و سوم

از این جدول مشخص می شود که در جریان هفته دوم- سوم بعد از تشعشع حداکثر کاهش در باروری رخ می دهد.

پلی مورفیسم مارکر های RAPD در زاده های موشهای تحت تشعشع حاد لاین *BALB/c* در مرحله اسپرماتید: DNA تعداد ۲۳ زاده از گروههای تحت تشعشع و ۹۷ زاده از گروههای کنترل مورد آنالیز قرار گرفت. همانطور که از هیستوگرام مشخص است سطح پلی مورفیسم گروه تیمار از گروههای کنترل چند برابر بالاتر است به جز خانواده M2 بسته به پرایمر هر ستون هیستوگرام برای گروه تیمار ۲ تا ۴ برابر بیشتر از گروه کنترل است (جدول ۳). فراوانی متوسط باندهای جدید در گروههای کنترل تقریباً یکسان بود (شکل ۲).

پلی مورفیسم مارکرهای RAPD در زاده های موشهای تحت تشعشع حاد لاین *BALB/c* در مرحله اسپرماتوگونی: هنگام تلاقی سه ماه بعد از تشعشع، DNA ی ۹۸ زاده از موشهای تحت تشعشع با دز ۳ گری مورد آنالیز قرار گرفت. درصد و متوسط فراوانی باند های غیر والدینی در زاده های گروههای تحت اشعه افزایش یافت. بسته به پرایمر، ستونهای هیستوگرام برای گروه تیمار ۳ تا ۶ برابر بیشتر از گروههای کنترل بود (جدول ۳ و شکل ۳). متوسط فراوانی باندهای جدید در گروه کنترل تقریباً یکسان بود.

پلی مورفیسم مارکرهای RAPD در زاده های موشهای

می یابد. در گروه اسپرماتوگونی تعداد متوسط زاده ها در هر خانواده کمتر از گروه کنترل بود، اما تقریباً دو برابر بیشتر از گروه اسپرماتید بود (جدول ۲). چنین تفاوتی در تحقیقات زیادی روی مطالعه توالی ژنتیکی نشان داده شده است (۱۱، ۱۴ و ۱۵).

اسپرماتوزوئیدهایی در لقاح شرکت می کنند که در مرحله اسپرماتید هستند. کاهش شدید باروری نرها در مراحل اولیه بعد از تشعشع ثابت می کند که سلولهای جدید که در مرحله اسپرماتید هستند به اثر کشنده اشعه یونیزان بسیار حساس می باشند (۹ و ۱۰). در ادامه باروری نرها افزایش

جدول ۳- درصد باند های غیر والدی در الکتروفورز محصولات PCR زاده های گروههای کنترل و تیمار

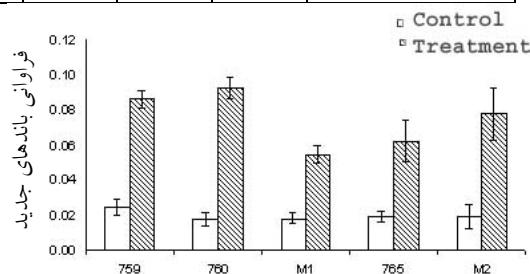
مرحله	۷۵۹		۷۶۰		M1		۷۶۵		M2		
	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	
اسپرماتیدها (زاده در هر گروه)	تعداد کل باند ها		۲۰۱	۵۹۲	۱۵۳	۷۹۰	۲۰۹	۵۹۳	۱۵۷	۶۹۲	۱۸۳
	تعداد باند های جدید (در هر گروه)		۱۷	۱۰	۱۵	۱۴	۲۵	۱۱	۱۹	۱۳	۲۲
	درصد باند های جدید (در هر گروه)		۸/۴۶	۱/۶۹	۹/۸۰	۱/۷۷	۱۱/۹۶	۱/۸۵	۱۲/۱۰	۱/۷۸	۱۲/۰۲
اسپرماتوگونی	تعداد کل باند ها (در هر گروه)		۸۵۸	۵۹۲	۶۴۸	۷۹۰	۸۲۹	۵۹۳	۶۲۷	۶۹۲	۷۴۴
	تعداد باند های جدید (در هر گروه)		۷۴	۱۰	۱۴۶۰	۱۴	۴۵	۱۱	۳۹	۱۳	۵۸
	درصد باندهای جدید (در هر گروه)		۸/۶۵	۱/۶۹	۹/۲۶	۱/۷۷	۵/۴۳	۱/۸۵	۶/۲۲	۱/۷۸	۷/۸

جدول ۴- درصد باند های غیر والدی در الکتروفورز محصولات PCR زاده های گروههای کنترل و تیمار با اشعه مزمن لاین CBA/lac

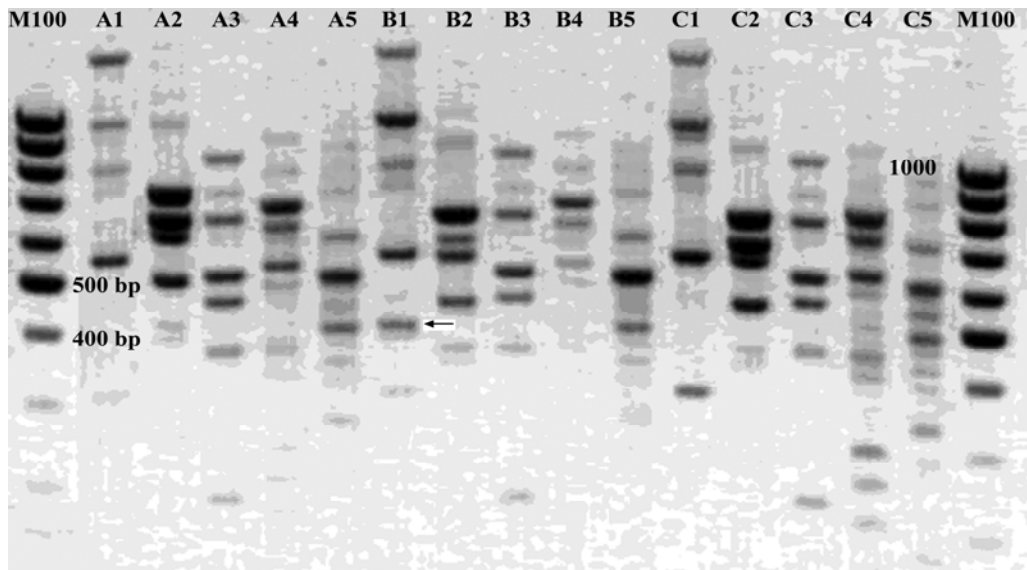
مرحله	۷۵۹		۷۶۰		M1		۷۶۵		M2		
	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	تیمار	کنترل	
تعداد کل باند (در گروه)	۳۷۹		۳۷۳		۳۱۶		۳۹۴		۷۴۴		
	تعداد باند جدید (در گروه)		۲۷	۲۱	۲۰	۱۴	۴۵	۱۱	۳۹	۱۳	۵۸
	متوسط درصد باند جدید (در گروه)		۶/۹۴	۵/۹۱	۵/۸۱	۲/۳۷	۵/۱۴	۲/۳۷	۸/۸۹	۲/۲۳	۳/۰۵
		±۰/۰۲	±۰/۰۵	±۰/۰۴	±۰/۰۱	±۰/۰۵	±۰/۰۷	±۰/۰۹	±۰/۰۱	±۰/۰۱	

افزایش سطح پلی مورفسم DNA احتمالاً به دلیل صدمات بیشتر اسپرماتیدهایی که زنده می مانند می باشد و در زاده ها به شکل موتاسیونهایی در می آیند که منجر به ظهور آللهای جدید و غیر معمول مارکرهای RAPD می شود (شکل ۴ و ۵).

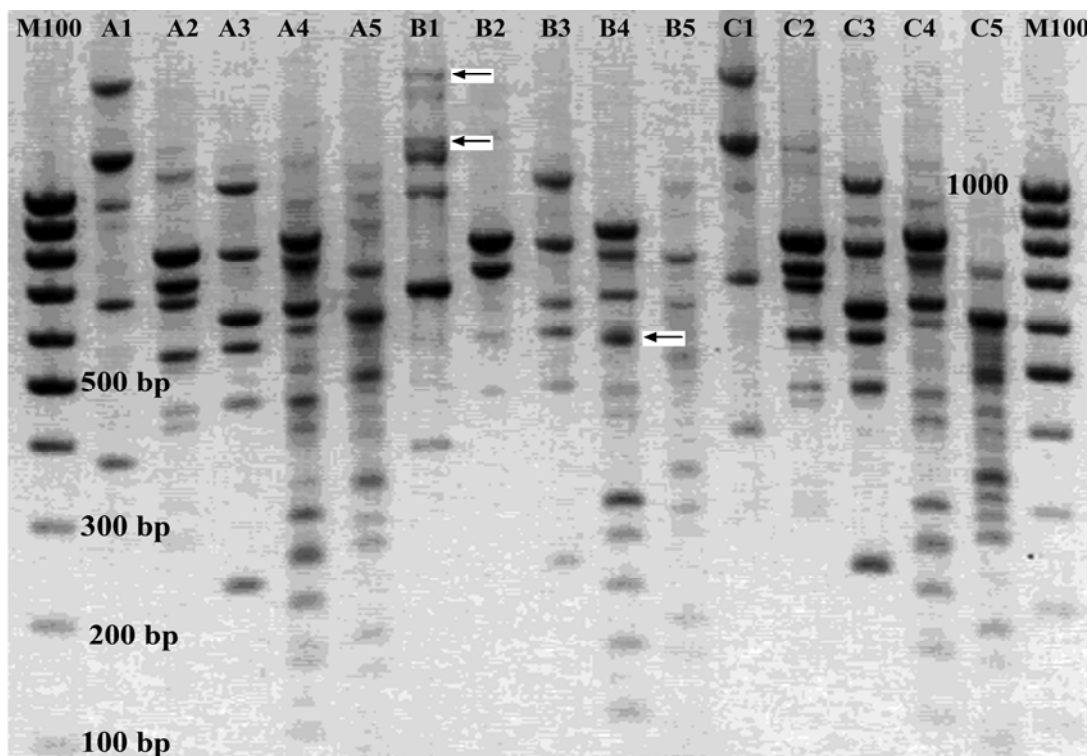
اسپرماتوگونی هایی که به اثر کشنده تشعشع مقاوم ترند مکانیسمهایی دارند که اجازه می دهند در کوتاه مدت جمعیت سلولی را ترمیم کنند.



شکل ۳- متوسط فراوانی ظهور باندهای غیر والدینی در یک فرزند گروه کنترل و تیمار تحت تشعشع در مرحله اسپرماتوگونی. پرایمرهای استفاده شده عبارت بودند از: ۷۵۹، ۷۶۰، M1 (۷۶۱ و ۷۶۳)، ۷۶۵ و M2 (۷۶۶، ۷۶۸، ۷۶۹ و ۷۷۵).



شکل ۴- نمونه ای از باندهای به دست آمده با روش RAPD بعد از الکتروفورز. A (از ۱ تا ۵) مربوط به نرهای اشعه دیده، B (۱ تا ۵) مربوط به زاده ها و C (از ۱ تا ۵) مربوط به ماده ها است. M100 نشانگر وزنی (از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) است. باند غیر والدی که در زاده ها ظاهر شده با فلش مشخص گردیده است. در هر سه مورد شماره ۱ پرایمر ۷۵۹، شماره ۲ پرایمر ۷۶۰، شماره ۳ پرایمر ۷۶۵، شماره ۴ پرایمر M1 (۷۶۱ و ۷۶۳) و شماره ۵ پرایمر M2 (۷۶۶، ۷۶۸، ۷۶۹ و ۷۷۵) می باشد.



شکل ۵- نمونه ای از باندهای به دست آمده با روش RAPD بعد از الکتروفورز. A (از ۱ تا ۵) مربوط به نرهای اشعه دیده لاین *CBA/lac*، B (۱ تا ۵) مربوط به زاده ها و C (از ۱ تا ۵) مربوط به ماده های *CBA/lac X C57/black* است. M100 نشانگر وزنی (از ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ جفت باز) است. باندهای غیر والدی که در زاده ها ظاهر شده با فلش مشخص گردیده است. در هر سه مورد شماره ۱ پرایمر ۷۵۹، شماره ۲ پرایمر ۷۶۰، شماره ۳ پرایمر ۷۶۵، شماره ۴ پرایمر M1 (۷۶۱ و ۷۶۳) و شماره ۵ پرایمر M2 (۷۶۶، ۷۶۸، ۷۶۹ و ۷۷۵) می باشد.

لاین CBA/H، که تحت تأثیر حاد و مزمن نوترون ها (۰/۵ تا ۰/۱۲۵ گری) و تشعشعات رنتگنی (۰/۵-۱ گری) بودند مشاهده نمودند. در فرزندان والدینی که در نواحی آلوده به مواد رادیو اکتیو در منطقه ماگیلوفسکی بعد از حادثه چرنوبیل تحت اشعه بودند سطح موتاسیونهای مینی ساتلیت به طور غیر منتظره ای بالا بود. سطح این موتاسیونها در زاده های والدین تحت اشعه از مقدار مورد انتظار برای موتاسیونهای نقطه ای، که بر اساس جایگاههای کد کننده تعیین شده بودند به طور معنی داری بالاتر بود (۴، ۵، ۶، ۱۹). لذا نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج قبلی مطابقت دارد. همچنین در سالهای ۵۰ تا ۶۰ قرن بیستم نشان داده شد که در حساسیت به اثر موتاسیونزایی تشعشعات یونیزان سلولهای جنسی در مراحل مختلف اسپرماتوزنز تفاوتی وجود دارد. بر اساس مطالعات انجام شده قبلی کمترین حساسیت ژنتیکی به مواد رادیواکتیو را اسپرماتوگونی ها نشان می دهند. بنابراین، اسپرماتیدها و اسپرماتوزوئیدها بیشترین حساسیت به مواد رادیواکتیو را دارند. اما باید خاطر نشان کرد نتایج تحقیقات حساسیت ژنتیکی سلولهای جنسی و اسپرماتوگونی ها به مواد رادیواکتیو ناهمگون و متفاوت هستند (۳).

سطح بالاتر پلی مورفیسم در لوکوسهای غیر کد کننده که با کمک RAPD مشخص شده در نتیجه افزایش فراوانی موتاسیونها در اثر تشعشع پدیدار شده است. ظاهراً سطح بالاتر پلی مورفیسم توانست در نتیجه کم کردن فعالیت سیستمهای ترمیم کننده در قسمت هایی از ژنوم که ژنهای با معنی را حمل نمی کنند پدیدار شود.

افزایش فراوانی باندهای غیر والدی احتمالاً هم نتیجه به ارث بردن موتاسیونهای ژنتیکی منظم از والدین و هم پدیده ترانس جنراسیون (transgeneration) ناپایداری ژنومی در زاده های والدین اشعه دیده است (۱۳ و ۲۰). ناپایداری می تواند هم در جریان تکثیر سلولی تحقق یابد، که این تکثیر سلولی در فرآیند گامتوزنز والدینی که در

آنالیز پلی مورفیسم با کمک RAPD سطح بالایی از تغییر پذیری DNA را در زاده های موشهای تحت تشعشع نشان دادند، که این زاده ها از تلاقی موشها ۳ ماه بعد از تشعشع بوجود آمدند. ضمن اینکه سطح کلی تغییر پذیری DNA زاده های گروه اسپرماتوگونی از زاده های گروه اسپرماتیدی بالاتر بود. این امر نشان می دهد که حساسیت به تشعشع در سلولها قبل از میتوز (اغلب اسپرماتوگونی ها) خیلی بیشتر از حساسیت آنها بعد از میتوز (در اینجا اسپرماتیدها) می باشد. آزمایش برای تشعشع مزمن با استفاده از رادون انجام شد. تحقیقات بلند مدت انجام شده برای یافتن اثرات سوماتیکی اثر اشعه گامای مزمن با شدت کم نشان داد که، علی رغم ایجاد تغییرات در اوایل تشعشع، در ادامه ارگانسیم موشها به شرایط افزایش تشعشع سازگار می شود (۱۶ و ۱۷). برای مطالعه اثرات ژنتیکی در آزمایش، موشهای اشعه دیده با هم آمیزش داده شدند. نتایج مشخص کرد که سطح پلی مورفیسم در موشهای اشعه دیده در مقایسه با موشهای کنترل ۲۷-۵۰ درصد بالاتر است. آزمایشهای خیلی ابتدایی با مطالعه فراوانی ایجاد اسپرمهای با سر غیرطبیعی و جابجایی متقابل (دو طرفه) نشان داد که بر اساس این پارامترها بین موشهای تیمار و کنترل تفاوتی وجود ندارد (۱۷). در تحقیقات زیادی نشان داده شده است که سطح پلی مورفیسم مارکرهای RAPD و نیز فراوانی موتاسیون در جایگاههای میکروساتلیت و مینی ساتلیت در موشهای تحت اشعه مزمن و یا حاد افزایش می یابد. برای نمونه، Bezlepkin و همکاران (۲۰۰۰) در زاده های موشهای لاین BALB/c، که تحت اشعه مزمن با دزهای ۰/۲۵ تا ۰/۵ گری بودند افزایش فراوانی ظهور باند های غیر والدینی را در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نمودند. تشعشع حاد در دزهای ۰/۵ تا ۲ گری نیز منجر به افزایش سطح پلی مورفیسم DNA در زاده ها گردید (۲). Dubrova و همکاران (۱۹۹۶) افزایش فراوانی موتاسیونهای مینی ساتلیتی با روش انگشت نگاری (DNA fingerprinting) را در زاده های موشهای

استفاده از این مجموعه پرایمر ها امکان داد که افزایش معنی داری از فراوانی متوسط ظهور باندهای جدید در زاده های گروه تیمار را به دست آید که اجازه می دهد تا این سیستم برای تحقیقات بعدی در حوزه القا ناپایداری ژنومی استفاده گردد. جفتگیری بعد از ۲ و ۳ هفته و ۳ ماه بعد از تشعشع امکان می دهد که نتیجه و اثر تشعشع روی موشهای نر کشف شده و نشان دهد که این اثرات باقی می ماند و علی رغم وجود مراحل انتخابی در مراحل اسپرما توژنز در زاده ها بروز می کنند و خود را نشان می دهند. افزایش سطح پلی مورفیسم مارکرهای RAPD نتیجه موتاسیونهای گامتی منظم و پدیده ترانس جنراسیون (transgeneration) ناپایداری ژنومی در زاده های والدین اشعه دیده است. که این پدیده می تواند در جریان تکثیر سلولی تحقق یابد، که این تکثیر سلول در فرآیند گامتوژنز والدینی که در مراحل مختلف بلوغ اشعه دیده اند جای دارد و نیز می تواند در مرحله رشد رویان یا تکامل موجود بعد از تولد محقق شود.

با مقایسه حساسیت مراحل مختلف اسپرما توژنز، سطوح متفاوت پلی مورفیسم برای پرایمرهای جداگانه را کشف گردید. باید خاطر نشان ساخت که تفاوت سطح پلی مورفیسم بین مراحل می تواند به وسیله درجه متفاوت غربال کردن (screening) قسمتهای DNA بوسیله پروتئینها در فرآیند اسپرما توژنز توضیح داده شود. با استفاده از این روش نتایج ژنتیکی اشعه دادن مزمن با قدرت کم موشها، که به شکل افزایش سطح پلی مورفیسم مارکرهای RAPD خود را نشان می دهد را می توان مشاهده نمود.

مراحل مختلف بلوغ اشعه دیده اند جای دارد و هم می تواند در مرحله رشد رویان یا تکامل موجود بعد از تولد محقق شود. روشی که استفاده شد باعث گردید آسیب هایی که در نتیجه تشعشع به سلولهای جنسی قبل از انجام میتوز وارد می شوند و در زاده ها بصورت افزایش سطح پلی مورفیسم مارکرهای RAPD ظاهر می شوند را کشف گردد. در این شرایط علی رغم فرآیند هایی که با افزایش سطح نقصان و کمبود DNA باعث حذف سلولها می شوند و در جریان بلوغ سلولهای جنسی رخ می دهند، سطح بالایی از پلی مورفیسم پدیدار می گردد.

تفاوت سطح پلی مورفیسم بین محصولات PCR با پرایمر های جداگانه در مراحل مختلف می تواند چنین توضیح داده شود که قسمتهای مختلف ژنوم در مراحل گوناگون بسته بندی می شوند و درجه بسته بندی آنها در فرآیند رشد و تقسیم سلولی به طور متفاوتی تغییر می کند. بنابراین، کاهش یا افزایش سطح پلی مورفیسم می تواند به وسیله درجه متفاوت غربال کردن (Screening) این قسمتها به وسیله پروتئینهایی که مسئول بسته بندی ماده ژنتیکی هستند توضیح داده شود. مطالعات بیشتر پلی مورفیسم مارکر های RAPD با احتساب آنالیز منحنی "زمان - اثر (Time-effect)" و "میزان دز-اثر (dosage rate - effect)" این امکان را خواهد داد که برای گیاهان، حیوانات و انسانهای در معرض تشعشعات حاد و مزمن ارزیابی مختلط (پیچیده) ژنتیکی انجام گیرد. برای ارزیابی کامل تر باید القا پلی مورفیسم و فراوانی موتاسیونها را هم به صورت جایگاههای غیر کد کننده جداگانه (برای نمونه میکروساتلیت ها) و هم به صورت جایگاههای با معنی و کد کننده پروتئینهای مختلف مطالعه نمود.

## منابع

1. Barber R., Plumb M.A., Smith A.G., Cesar C.E., Boulton E., Jeffreys A.J., Dubrova Y.E. (2000). No correlation between germline mutation at repeat DNA and meiotic crossover in male mice exposed to X-rays or cisplatin. *Mutation Research*. 457: 79-91.
2. Bezlepkin V.G., Vasil'eva G.V., Lomaeva M.G., Sirota N.P., Gaziev A.I. (2000). Study of genome instability using DNA fingerprinting of



- the offspring of male mice subjected to chronic low dose gamma irradiation. *Radiats Biol Radioecol.* 40 (5): 506-12.
3. Domshlak M., Elakov A., Osipov A. (2005). Genetic Effects Induced by Nickel Sulfate in Germline and Somatic Cells of WR Mice. *Russian Journal of Genetics.* 41 (7): 728-734.
  4. Dubrova Y.E., Nesterov V.N., Krouchinsky N.G., Ostapenko V.A., Neumann R., Neil D.L. (1996). Human minisatellite mutation rate after the Chernobyl accident. *Nature.* 380: 683-6.
  5. Dubrova Y.E., Plumb M. (2002) Ionizing radiation and mutation induction at mouse minisatellite loci. The story of the two generations. *Mutation research.* 499: 134-150.
  6. Dubrova Y.E., Gemma G., Chumak A.A., Stezhka V.A., Karakasian A.N. (2002). Elevated Minisatellite Mutation Rate in the Post-Chernobyl Families from Ukraine. *The American Journal of Human Genetics.* 71: 801-809.
  7. Dubrova Y.E. (2003). Monitoring of radiation-induced germline mutation in humans. *Swiss Med. WKLY.* 133: 474-478.
  8. Dubrova Y.E. (2005). Mutation induction in mice: reduction in practice. [www.nc3rs.org.uk](http://www.nc3rs.org.uk)
  9. Fan Y.J., Wang Z., Sadamoto S., Ninomiya Y., Kotomura N., Kamiya K., Dohi K., Kominami R., Niwa O. (1995). Dose-response of a Radiation Induction of a Germline Mutation at a Hypervariable Mouse Minisatellite Locus. *International Journal of Radiation Biology.* 68 (2): 177-183.
  10. Hanawalt P.C. (1998). Genomic instability: environmental invasion and the enemies within. *Mut. Res.* 400: 117-125.
  11. Harms-Ringdahl M. (1998). Some aspects on radiation induced transmissible genomic instability. *Mut. Res.* 404: 27-33.
  12. Infante-Malachias M.E., Yotoko K.S.C., de Azeredo Espin A.M.L. (1999). Random amplified polymorphic DNA of screwworm fly populations (Diptera: Calliphoridae) from Southeastern Brazil and Northern Argentina. *Genome.* 42: 772-779.
  13. Koterov A.N. (2005). Genomic instability at exposure of low dose radiation with low let. Mythical mechanism of unproved carcinogenic effects. *Int. J. Low Radiation.* 1 (4): 376-451.
  14. Limoli C.L., Kaplan M.I., Corcoran J., Meyers M., Boothman D.A., Morgan W.F. (1997). Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability. *Cancer Res.* 57 (24): 5557-5563.
  15. Limoli C.L., Kaplan M.I., Phillips J.W., Adair G.M., Morga W.F. (1997). Differential induction of chromosomal instability by DNA strand-breaking agents. *Cancer Res.* 57 (18): 4048-4056.
  16. Osipov A.N., Elakov A.L., Puchkov P.V., Sypin V.D., Pomerantseva M.D., Ramaiya L.K., Shevchenko V.A., Klovov D.Yu. (2004). The influence of very low dose rate gamma-radiation on genetic structures of mice: molecular and cytogenetic study. *International Journal of Low Radiation.* 1 (3): 300-308.
  17. Osipov A.N., Elakov A.L., Puchkov P.V., Pomerantseva M.D., Ramaiya L.K., Klovov D., Sypin V.D., Shevchenko V.A. (2002). The estimation of molecular and cytogenetic effects in mice exposed to chronic low dose gamma-radiation. *Genetika.* 38 (10): 1345-50.
  18. Shevchenko V.A. (2001). Evolution of the ideas of genetic danger of ionising radiation for humans. *Radiats. Biol. Radioecol.* 41:615-626 (Article in Russian).
  19. Shevchenko V.A., Akayeva E.A., Yeliseyeva I.M. (1996). Human cytogenetic consequences of the Chernobyl accident. *Mutat. Res.* 361:29-34.
  20. Streffer C. (2006). Transgenerational Transmission of Radiation Damage: Genomic Instability and Congenital Malformation. *Journal of Radiation Research.* 47: B19-B24.
  21. Tingey S.V., del Tufo J.P. (1993). Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. *Plant Physiol.* 101: 349-352.
  22. Vilarino-Guell C., Smith A.G., Dubrova Y.E. (2003). Germline mutation induction at mouse repeat DNA loci by chemical mutagens. *Mutation Research.* 526: 63-73.
  23. Yauk C.L., Dubrova Y.E., Grant G.R., Jeffreys A.J. (2002). A novel single molecule analysis of spontaneous and radiation-induced mutation at a mouse tandem repeat locus. *Mutation Research.* 500: 147-156 .

## Analysis of induced DNA polymorphism in mice exposed to acute and chronic radioactive irradiations

Moradnasab Badrabadi Sh.<sup>1</sup>, Mohammadabadi M.R.<sup>2</sup>, Shevchenko V.A.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Radiogenetic Dept., Vavilov Institute of Genetics, Russian Academy of Sciences,

<sup>2</sup> Animal Science Dept., Faculty of Agriculture, Shahid Bahonar University, Kerman, I.R. of IRAN

<sup>3</sup> Radiogenetic Dept., Vavilov Institute of Genetics, Russian Academy of Sciences, Russia

### Abstract

Results of many studies have shown that in animal and plant populations, naturally exposed to radiation there are genetic instability. In this study, our goal was evaluation of RAPD polymorphism in offspring (F<sub>1</sub> generation) from parents exposed to acute (3Gy) and chronic (total dose was 37cGy) irradiation. RAPD method widely use for classification of breeds, lines, sorts and cultures and also drawing up phylogenetic maps. In the view of radiogenetic monitoring the positive property of RAPD method is possibility of rapid scanning of genome descendants irradiated parents and no prior genomic sequence information. Male CBA/lac and BALB/c mice and female hybrid (CBA/lac×c57/black) mice are used in study. The results of this experiment indicated that using this primers give the most variability of RAPD markers in offspring from male parents exposed to gamma-radiation (3Gy) 3 months before mating. We also observed increased level of DNA polymorphism in descendants of parents exposed to chronic gamma-radiation. Our results demonstrated that level of polymorphism in irradiated mice is 27-50% more than non-irradiated mice. Using this primer series (759, 760, M1 (761 and 763), 765 and M2 (766, 768, 769 and 775) made possible to receive significant increase in mean frequency of new bands in offspring's treatment group that allow us to use this system in future investigations for studying induction of genomic instability.

**Key words:** Polymorphism, radiation, mice, Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)