Archive of SID

بررسی اثر دزهای متفاوت پرتوگاما بر ژن HPRT لنفوسیتهای T خون محیطی انسان

*دکتر محمد تقی بحرینی طوسی، **دکتر طیبه حمزه لوئی، *** محمد رضایی

*بخش فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

**بخش ژنتیک مولکولی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ***کارشناس ارشد فیزیک پزشکی

خلاصه

پرتوهای یونیزان به عنوان موتاژن، سبب تغییرات ژنتیکی متعددی می شوند. اغلب این تغییرات ژنتیکی، حذفها می باشند. روش مناسب و رایج برای بررسی این تغییرات، مطالعه جهش های ژنی سلول سوماتیک ناشی از پرتوهای یونیزان است. در این مقاله، حذفهای داخل ژنی و کل ژنی ناشی از دو دز متفاوت پرتو گاما (۲و۳ گری) در ۱۸ نمونه از لنفوسیتهای T موتانت HPRT، با استفاده از روش PCR، مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین رابطه بین تعداد سلولهای موتانت و دزهای متفاوت پرتو گاما تعیین شد. نتایج نشان می دهد که رابطه خطی بین سلولهای موتانت و دز پرتو گاما وجود دارد. در این رابطه، تعداد سلولهای موتانت در دزهای بالاتر از ۲گری، با شیب افزایش می یابند.

موتانتهای HPRT توسط مجاور سازی نمونه های پرتو گرفته با ۶- تیوگوانین جدا شدند. آنالیز PCR موتانتهای HPRT در دزهای ۲و۳ گری پرتو گاما نشان داد که تفاوت معنی داری در تعداد موتانت های حاوی حذفهای داخل ژنی و کل ژنی وجود ندارند. نتایج مربوط به مطالعه نقاط شکست در داخل ژن، مشخص کرد که قسمت میانی ژن HPRT نسبت به پرتو گاما حساس می باشد و با افزایش دز، این حساسیت بیشتر می‌شود. همچنین دز پرتو گاما، اندازه حذفها را تحت تاثیر قرار می دهد، به طوری که با افزایش دز پرتو، اندازه حذفها بزرگتر می شوند. باتوجه به این نتایج، پیشنهاد می شود که تغییرات ناشی از پرتوهای LET پائین در تعداد لنفوسیتهای T موتانت، ایجاد حذفها، اندازه حذفها و محل نقاط شکست DNA، وابسته به دز پرتو LET پائین می باشد.

کلمات کلیدی: LET ، mPCR، PCR، HPRT ، لنفوسیتهای T ، ۶- تیوگوانین، حذف

مقدمه

با کشف اچ. جی. مولو (H. J. Muller) در سال ۱۹۲۷، که پرتوهای یونیزان سبب ایجاد جهشها در دروزوفیلا می‌شوند، توجهات به آزمایشاتی درمورد اثرات و خطرات ناشی از پرتو جلب شد (۶). در ابتدا، اغلب تحقیقات رادیوبیولوژیک، در سیستمهای ساده ای ازجمله باکتری ها انجام گرفت. به تدریج با پیشرفت دانسته ها و روشهای بیولوژی، سلولهای پستانداران و درنهایت سلولهای انسانی مورد استفاده قرار گرفت. درک مکانیسم های اساسی اثرات پرتوهای یونیزان بر سلول با توسعه روشهای بیولوژی مولکولی، سرعت گرفت (۷).

پاسخ بیولوژیک سلولهای سوماتیک در شرایط in vivo ، امکان قابل توجهی در پرتوگیری انسانها را فراهم می سازد. در گذشته، علائم بیولوژیک برای این مقصود، ناهنجاریهای کروموزومی در لنفوسیتهای خون محیطی بود. امروزه گروه دیگری از علائم بیولوژیک موثر در انسانها به منظور ارزیابی تاثیر موتاژنها، مورد استفاده قرار می گیرد که به عنوان جهش های ژن سلول سوماتیک شناخته شده است. اطلاعات مولکولی که از سیستمهای سنجش حاصل می گردد، در تعیین مکانیسمهای موتاژنز، پرتوی، ارزیابی پرتوگیری و برآورد خطر در آسیب ژنتیکی انسان ناشی از پرتو، ضروری می باشد (۲، ۸). در اغلب سیستمهای موجود برای تعیین جهش های سلولهای سوماتیک، از لنفوسیتهای T خون محیطی استفاده می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

سیستم سنجش سلولهای T، اجازه ارزیابی تاثیر موتاژنها را در شرایط in vitro و امکان مدل سازی این تاثیرات در شرایط in vivo را فراهم می سازد (۲). سنجش جهش براساس نقص لکوس هایپوگزانتین - گوانین فسفوریبوزیل ترانسفراز (HPRT)، در لنفوسیتهای T خون محیطی، اولین روش توسعه یافته بود. ژن Phosphoribosiltransfrase Hypoxanthine-Guanine موجب تولید آنزیم HPRT می شود که در بیوسنتز پورینها نقش دارد (۴، ۱۹). آنالوگهای سمی پورین، ازجمله ۶- تیوگوانین، با فعالیت آنزیم HPRT به متابولیتهای سمی تبدیل شده و سبب آسیب DNA می‌شوند. در غیاب آنزیم HPRT، این تبدیل متابولیك صورت نمی گیرد، در نتیجه آنالوگهای پورین برای سلول سمی نمی شوند. مطالعات قبلی در مورد تاثیر پرتوهای یونیزان بر جهشهای لکوس HPRT نشان می دهد که جهش غالب ناشی از پرتوهای یونیزان، حذفها می باشند (۱۲، ۱۶).

در این مطالعه، موتانتهای HPRT ناشی از پرتو گاما در دزهای ۲و۳ گری که مقاوم به ۶- تیوگوانین بودند، با استفاده از روش PCR آنالیز شدند و حذفهای داخل ژنی و کل ژنی آنها مورد بررسی قرار گرفت. PCR یك واکنش زنجیره ای و روشی سریع با توانایی های بسیار برای تکثیر توالی مورد نظر از یك منبع DNA می باشد.

اهداف این تحقیق عبارتند از:

۱- تعیین تغییرات حذف اگزون ژن HPRT ناشی از دزهای متفاوت پرتو گاما

۲- تعیین تمرکز حذفهای ناشی از پرتو گاما در ژن HPRT

مواد و روش کار

کشت لنفوسیتها: ۲۰ میلی لیتر خون محیطی از یك مرد بالغ تهیه شد و لنفوسیتهای هر ۱۰ میلی لیتر خون با استفاده از روش Ficoll-paque جدا گردید. در این روش به ۵ میلی لیتر خون آغشته به EDTA که با نرمال سالین رقیق شده است، ۵ میلی لیتر فایکول به آرامی اضافه گردید و سپس ترکیب فوق به مدت ۱۵ دقیقه در سانتریفوژ با ۲۰۰۰ rpm قرار داده شد. بعد از اتمام سانتریفوژ لنفوسیتها که به صورت لایه سفید رنگی در ته لوله آزمایش باقی می ماند، از لوله خارج شدند. لنفوسیتها ۲ بار توسط نرمال سالین سرد شستشو شد، سپس در فلاسکهای ml ۲۰۰ همراه با ml ۲۰ محیط کشت حاوی RPMI 1640 ، ۱۵ درصد سرم جنین گاوی (FCS) ، ۱ µl/ml پنی سیلین، ۱ µl/ml آمفوتریسین و ۴ µl/ml استرپتومایسین قرار گرفتند. به منظور رشد و تکثیر لنفوسیتها، ۰/۱ µg/ml فیتوهموگلوتینین (PHA) به هر فلاسك اضافه گردید. فلاسك ها در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد CO_2 و ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفتند. بعد از ۴۸ ساعت سلولها شمارش شدند و سپس در معرض پرتو گاما قرار گرفتند.

شرایط پرتودهی: برای پرتودهی فلاسکهای حاوی لنفوسیت، از چشمه کبالت ۶۰ موجود در بخش رادیوتراپی بیمارستان امید مشهد استفاده شد. دو فلاسك A و B به ترتیب در معرض ۲و۳ گری پرتو گاما قرار گرفتند. دستگاه کبالت مورد استفاده، Picker Apc c9 بود که دزیمتری آن توسط اطاقك یونیزان ۰/۶ میلی لیتری و فارمر مدل ۰/۱ ۲۵۷ انجام گرفته بود.

جداسازی لنفوسیتهای موتانت: بعد از پرتودهی، فلاسك ها به انکوباتور منتقل شدند. ۴۰-۳۶ ساعت بعد از پرتودهی، هر فلاسك به ۹ فلاسك حاوی ۷ میلیون سلول پاساژ داده شد. سپس به منظور رشد لنفوسیتهای T موتانت، اینترلوکین ۲ (IL-2) به مقدار unit/ml ۱۵ همراه با ۶- تیوگوانین به مقدار µg/ml ۱ به هر فلاسك اضافه گردید. سه و پنج روز بعد از پرتودهی، محیط کشت تعویض شد (subculture) و در روز هفتم، استخراج DNA صورت گرفت.

استخراج DNA از لنفوسیتهای T موتانت: برای استخراج DNA از لنفوسیتهای T موتانت، از کیت DXP™ تهیه شده از شرکت سینا ژن استفاده گردید. این کیت، با استفاده از روش آنزیماتیك، منجر به استخراج DNA می گردد.

واکنشهای PCR: تکثیر ۸ قطعه از توالی ژنوم HPRT که محتوی ۹ اگزون ژن HPRT بود، انجام گرفت. مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ آمده است.

www.SID.ir

Archive of SID

در ابتدا multiplex PCR (mPCR) در دو واکنش برای هر نمونه انجام گرفت. در واکنش اول، اگزونهای کوچك شامل ۱، ۲، ۴ و ۶ در واکنش دوم اگزونهای بزرگ شامل ۳، ۵، ۷+۸ و ۹ تقویت شدند. غلظت پرایمرها در واکنش mPCR برابر بودند با ۰/۱ µM برای اگزونهای ۲و۴، ۰/۱۶ µM برای اگزونهای ۳و۶، ۰/۲ µM برای اگزون ۹، ۰/۲۴ µM برای اگزون ۵و ۷+۸ ، ۰/۵ µM برای اگزون ۱. بافر مورد استفاده حاوی $MgCl_2$ (۶/۸ mM)، $(NH_4)_2SO_4$ (۱۶/۶ mM)، 2ME (۵mM)، EDTA (۶/۸ µM) و Tris–HCL (۸/۸ pH ، ۶۷ mM) بود. واکنش با اضافه نمودن بافر، پرایمر، DMSO (۱۰٪) و ۱/۵ mM از هر dNTP به DNA در لوله PCR آغاز شد. روش انجام واکنش، Hot star PCR بود.

به لوله فوق، ۳۰ میکرولیتر Mineral Oil اضافه گردید و به مدت ۴/۵ دقیقه در درجه حرارت ۸۰ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۴ واحد آنزیم پلیمراز Taq به لوله اضافه شد و واکنش در ۳۳ سیکل، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه و ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه، انجام گرفت. واکنش با ۶۸ درجه سانتیگراد به مدت ۷ دقیقه پایان گرفت (۵، ۱۵). برای بررسی دقیق تر اگزونهای حذف شده و حذفهای داخل اگزونی، PCR هر اگزون به تنهائی نیز صورت گرفت. غلظت پرایمرها به جز پرایمرهای اگزون ۱، ۰/۶ µM بود. غلظت پرایمرهای اگزون ۱، ۱۰ µM بود. شرایط واکنش مانند mPCR بود (۵، ۱۵).

نتایج

آنالیز mPCR و PCR اگزونهای ژن HPRT نشان می دهد که در نمونه هایی که ۲ گری پرتو گرفته اند (۹ نمونه)، ۱۰ حذف مشاهده شد که تمام آنها حذفهای داخل ژنی بودند. ۲ حذف داخل اگزون و ۸ حذف اگزونی مشاهده گردید. برخلاف انتظار، در این نمونه ها هیچ حذف کل ژن دیده نشد. حذفهای داخل اگزونی، در اگزون های ۱و۹ وجود داشتند. در دو نمونه هیچ حذفی مشاهده نشد. در نمونه هایی که ۳ گری پرتو گرفته اند (۹ نمونه)، ۱۲ حذف داخل ژنی و یك حذف کل ژنی مشاهده شد. ۱۲ حذف داخل ژنی شامل ۲ حذف داخل اگزونی (اگزونهای ۱و۲) و ۱۰ حذف اگزونی بود. در یك نمونه هیچ حذفی مشاهده نشد. اطلاعات مربوط به نوع، محل و اندازه حذفها در نمونه هایی که ۲ و۳ گری پرتو گرفته اند، در جدول ۲ آمده است.

تعداد و نوع حذف ها در نمونه هایی که ۲و۳ گری پرتو گرفته اند، با هم مقایسه شدند و نتایج آن در جدول ۳ آمده است. با افزایش دز، حذف کل ژن افزایش می یابد، ولی این افزایش معنی دار نیست (آزمون X^2). تعداد نمونه هایی که دارای حذفهای داخل ژنی بودند، برابر نمونه هایی که بدون حذف بودند، با افزایش دز کاهش یافتند، ولی این کاهش معنی دار نبود.

بررسی اندازه حذفها: در این بررسی حذفهای بیشتر و کمتر از Kbp ۱ با هم مقایسه شدند. نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان می دهد که با افزایش دز، حذفهای با اندازه بیش از Kbp ۱ افزایش می یابند (P-Value =۰/۱۳۴ با استفاده از آزمون X^2). در این بررسی فرض شد که اگزون های حذف شده مجاور هم حاصل از یك حذف می باشد.

تعداد حذفهای داخل ژنی در نمونه ها: در این بررسی نمونه ها به دو دسته تقسیم شدند. نمونه هایی که تنها دارای یك حذف داخل ژنی بودند و نمونه هایی که بیش از یك حذف داخل ژنی داشتند. اطلاعات مربوط به این بررسی در جدول ۵ آمده است. با افزایش دز، نمونه هایی که تنها شامل یك حذف بودند، کاهش معنی داری یافتند. همچنین نمونه هایی که بیش از یك حذف داشتند، به طور معنی داری افزایش پیدا کردند (P-Value = ۰/۰۶۵۳).

تعداد اگزونهای حذف شده: اگزونهای حذف شده در ۹ نمونه ای که ۲ گری و ۸ نمونه ای که ۳ گری پرتو گرفته اند، با هم مقایسه شدند. اطلاعات مربوط به این بررسی در جدول ۶ آمده است. نتایج نشان می دهد که با افزایش دز، تعداد حذفها در اگزونهای ۳، ۴ و۵ افزایش می یابد. این ازدیاد با سطح اطمینان ۶۸ درصد معنی دار می باشد (آزمون X^2).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای ژن HPRT

	توالی پرایمر (3' به 5')	اگزون	اندازه (bp)
1F 1R	TGG GAC GTC TGG TCC AAG GAT TCA CCG AAC CCG GGA AAC TGG CCG CC	۱	۶۲۷
2F 2R	TGG GAT TAC ACG TGT GAA CCA ACC GAC TCT GGC TAG AGT TCC TCC TCC	۲	۵۷۲
3F 3R	CCT TAT GAA ACA TGA GGG CAA AGG TGT GAC ACA GGC AGA CTG TGG ATC	۳	۱۰۵۹
4F 4R	TAG CTA GCT AAC TTC TCA AAT CTT CTA G AAT AAC CTA GAC TGC TTC CAA GGG	۴	۳۳۴
5F 5R	CAG GCT TCC AAA TCC CAG CAG ATG GGG AAC CAC ATT TTG AGA ACC ACT	۵	۷۰۸
6F 6R	GAC AGT ATT GCA GTT ATA CAT GGG G CCA AAA TCC TCT GCC ATG CTA TTC	۶	۴۴۱
7F 8R	GAT CGC TAG AGC CCA AGA AGT CAA AAC G TAT GAG GTG CTG GAA GAA AAC	۷+۸	۱۵۳۳
9F 9R	GAG GCA GAA GTC CCA TGG ATG TGT CCG CCC AAA GGG AAC TGA TAG TC	۹	۱۲۷۸

جدول ۲: الف- اندازه، نوع و محل حذفهای نمونه های A (نمونه هایی که ۲ گری پرتو گرفته اند)

نمونه	نوع حذف	اگزون (اگزونهای) حذف شده	اندازه حذف (جفت باز bp)
A_1	اگزون	۵	۷۰۸
A_2	اگزون	۴	۳۳۴
A_3	اگزون	۴	۳۳۴
A_4	اگزون	۷+۸	۱۵۳۳
A_5	اگزون	۲	۵۷۲
A_6	داخل اگزون	۱	~۵۰۰
A_7	اگزون	۱-۳-۶-۷+۸	-۴۴۱-۱۵۳۳(۵۳۰۰) * ۶۲۷-۱۰۵۹
	داخل اگزون	۹	~۷۰۰
A_8	اگزون	-	-
A_9	اگزون	-	-

اندازه حذف داخل پرانتز مربوط به حذفی است که اگزون ٦ و ۷+۸ را در بربگیرد.

جدول ۲: ب- اندازه، نوع و محل حذفها در نمونه های B (نمونه هایی که ۳ گری پرتو گرفته اند)

نمونه	نوع حذف	اگزون (اگزونهای) حذف شده	اندازه حذف (جفت باز bp)
B_1	اگزون	۵	۷۰۸
B_2	اگزون	۴	۳۳۴
B_3	کل ژن	تمام اگزون ها	۵۶/۷۳۷ کیلو جفت باز
B_4	-	-	-
B_5	اگزون	۴-۵-۹	-۳۳۴-۷۰۸ (۴۳۳۵)-۱۲۷۸
B_6	اگزون	۴	۳۳۴
B_7	اگزون	۳	۱۰۵۹
	داخل اگزون	۱-۲	۵۰۰-۳۰۰
B_8	اگزون	۴-۵-۷	۳۳۴-۷۰۸ (۴۳۳۵)-۱۵۳۳
B_9	اگزون	۳-۴	۱۰۵۹-۳۳۴-(۱۱۳۱۴)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳: مقایسه حذفهای مشاهده شده در نمونه های A و B

غونه (دز)	تعداد غونه ها	تعداد حذف کل ژن	تعداد حذف داخل ژنی	تعداد غونه های بدون حذف
A(۲Gy)	۹	–	۷(٪۷۸)	۲(٪۲۲)
B(۳Gy)	۹	۱(٪۱۱)	۷(٪۷۸)	۱(٪۱۱)

جدول٤: مقایسه اندازه حذفها در نمونه های A و B

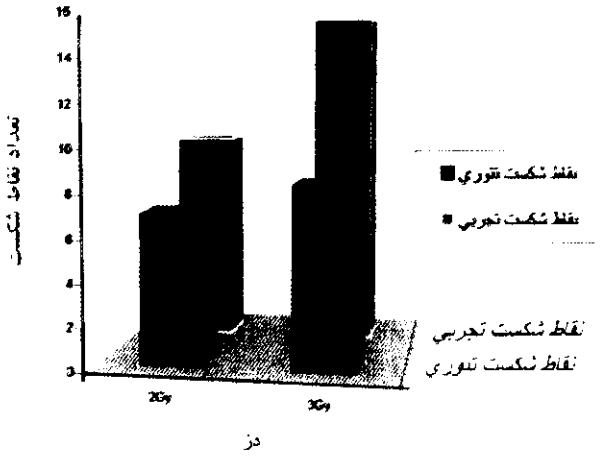
اندازه حذف	A(۲Gy)	B(۳Gy)
بزرگتر از یك کیلو جفت باز	۳	۸
کوچکتر از یك کیلو جفت باز	۷	۵

جدول ۵: مقایسه تعداد حذفهای داخل ژنی در نمونه های A و B

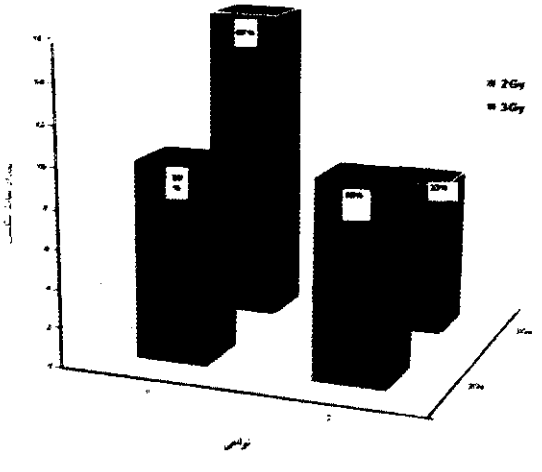
غونه	تعداد غونه های دارای یك حذف	تعداد غونه های دارای بیش از یك حذف
A	۶	۱
B	۲	۵
P-Value	۰/۰۶۵۳	–

جدول ٦: مقایسه تعداد اگزون های حذف در نمونه A و B

غونه	تعداد غونه	Ex۱	Ex۲	Ex۳	Ex۴	Ex۵	Ex۶	Ex۷+A	Ex۹
A	۹	۲	۱	۱	۲	۱	۱	۱	۱
B	۸	۱	۱	۳	۴	۴	–	۱	۲
P-Value	–	.	–	۰/۲۱۱۷۶	۰/۲۳۱۵۶	۰/۰۷۹۰۲	–	–	–



شکل ۱: مقایسه نقاط شکت باتوجه به نتـایج تجربـی (آزمایشـگاهی) و تئوری در دوزهای ۲و۳ و در ناحیه پرتودوست



شکل ۲: مقایسه نقاط شکست در دزهـای ۲و۳ گری در دو ناحیـه ۱و۲. ناحیه ۱ منطقه پرتو دوست و ناحیه ۲ بقیه نواحی ژن می باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

تمرکز حذفهای داخل ژنی: در این بررسی تعداد نقاط شکست و محل تقریبی آنها در ژن مورد مطالعه قرار گرفت. حداقل تعداد نقاط شکست در نمونه هایی که ۲و۳ گری پرتو گرفته اند به ترتیب ۲۰ و۲۴ نقطه شکست بود. باتوجه به نقاط شکست، ناحیه متمرکزی بین اگزون ۲ و۶ وجود دارد. ۱۰/۲۰ (۵۰ درصد) نقاط شکست در نمونه هایی که ۲ گری پرتو گرفته اند و ۱۶/۲۴ (۶۷ درصد) نقاط شکست در نمونه هایی که ۳گری پرتو گرفته اند، در این ناحیه متمرکز قرار داشت (شکل ۲،۱). نتایج نشان می دهد که این ناحیه متمرکز نسبت به پرتو گاما حساس می باشد. با افزایش دز تعداد نقاط شکست در ناحیه متمرکز افزایش می یابد (P-Value =۰/۲۶۲).

بحث

تحقیقات درمورد تغییرات ژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان به عنوان موتاژن، با دو هدف عمده انجام می گیرد. این دو هدف شامل ایجاد یك دزیمتر بیولوژیك و مشخص کردن مکانیسم های رادیوموتاژنیك (Radiomutagenic) می باشد. اکثر مطالعات در این زمینه، نشان می دهد که حذفها، غالب ناشی از پرتو یونیزان می باشند (۱۲، ۱۶). در این مطالعه، حذفهای داخل ژنی و کل ژنی ناشی از دزهای متفاوت پرتو گاما در ژن HPRT لنفوسیتهای T خون محیطی انسان، مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق، ۱۸ نمونه حاوی لنفوسیتهای T موتانت در معرض پرتو گاما با دزهای ۲و۳ گری قرار گرفته اند (۹ نمونه دز ۲ گری و ۹ نمونه دز ۳ گری)، با روش mPCR و PCR آنالیز شدند. در دزهای ۲و۳ گری، تعداد نمونه هایی که دارای حذف کل ژن و حذف داخل ژنی بودند، تفاوت معنی داری نداشتند. ۱۱ درصد نمونه هایی که دز ۳ گری پرتو گرفته اند، دارای حذف کل ژن بودند. این مقدار مشابه با مقدار مشاهده شده در مطالعات ریچارد. جی. آلبرتینی و همکارانش بود. در آن مطالعه از پرتو گاما حاصل از سزیم ۱۳۷ با دز ۳ گری استفاده شده بود (۲). در مطالعات دیگر، حذفهای کل ژن در سلولهای دیگر و دزهای متفاوت نیز تعیین شدند که در آنها حذفهای کل ژن بیشتر از مقدار آن در مطالعه حاضر می باشد (۳، ۱۳، ۱۴، ۱۶). در دز ۲ گری هیچ حذف کل ژن مشاهده نشد.

درحالی که در مطالعات گذشته، حذفهای کل ژن در دز ۲ گری دیده شده بود. به نظر می رسد که باید در این دز، تعداد نمونه های مورد مطالعه، افزایش یابد. در ۲۲ درصد نمونه هایی که دز ۲ گری گرفته بودند، هیچ حذف مشاهده نشد. در همین دز و در سلولهای لنفوبلاستوئید B، ۳۳ درصد نمونه ها، حذف را نشان ندادند (۱۳)، در سلولهای فیبروبلاست پوست انسان، این مقدار به ۴۱ درصد افزایش یافت (۱۶).

همچنین در مطالعه حاضر، ۱۱ درصد از نمونه هایی که ۳ گری پرتو گرفته اند، بدون حذف بودند. درصد نمونه های دارای حذفهای داخل ژنی در هر دو گروه برابر بودند (۷۸ درصد). مرور مطالعات گذشته در این زمینه، مشاهدات متفاوتی را نشان می دهد:

در دز ۲ گری، ۶۷ درصد نمونه های حاوی لنفوبلاستوئید B انسان (۱۳) و ۴۱ درصد نمونه های حاوی فیبروبلاست پوست انسان (۱۶) دارای حذفهای داخل ژنی بودند. در دزهای دیگر نیز، مقادیری متفاوت مشاهده شده است (۳، ۱۴، ۱۶). در مقایسه بین دو گروه، با افزایش دز افزایشی در حذفهای کل ژن مشاهده می شود، ولی این افزایش معنی دار نیست. افزایش حذفهای کل ژن در سلولهای فیبروبلاست پوست انسانی نیز همراه با افزایش دز مشاهده شد، ولی این افزایش نیز معنی دار نبود (۱۶).

در مطالعات مختلف برروی سلولهای لنفوبلاستوئید B انسانی، این افزایش دیده شد (۳، ۱۳). باتوجه به تغییرات ژنتیکی حاصل از پرتوهای یونیزان، این افزایش طبیعی به نظر می رسد. با افزایش دز، تغییرات ژنتیکی حاصل از عمل مستقیم و غیرمستقیم پرتو، افزایش می یابد. بنابراین تعداد رادیکالهای آزاد و همچنین احتمال ایجاد SSBs نزدیك به هم که منجر به DSBs می شود، افزایش می یابند. درنتیجه باید تعداد

www.SID.ir

Archive of SID

شکست های دو رشته ای افزایش یابند که در عمل نیز مشاهده شد. با افزایش دز، نمونه هایی کـه دارای بیـش از یـك حـذف داخل ژنی بودند، به طور معنی داری افزایش یافتند. ۶۷ درصـد نمونه هایی که ۳ گری پرتو گرفته اند، بیش ازیك حذف داخـل ژنی داشتند، درحالی که این مقدار برای نمونه هـایی کـه ۲گری پرتو گرفته اند، به ۱۱ درصد رسـید (P-Value = ۰/۰۰۵۴). این مشاهدات نسبت به مطالعـات مشـابه در سـلولهای دیـگر نتیجه عکس دارد. در سلولهای فیبروبلاست پوست انسـانی، بـا افزایش دز، حذفهای داخل ژنی کاهش می یابند (۱۶). این نتایج پیشنهاد می کند که نوع سـلول ازجملـه فاکتورهـای موثـر در تغییرات ژنتیکی می باشد (۱۱).

توزیع ناحیه شکست و تعیین نقاط حساس به پرتـو در ژن HPRT، از موارد قابل توجه در چنین مطالعاتی مـی باشـد. در مطالعات متعدد بر روی سلولهای متفاوت، نتایج مختلفی نیز بـه دست آمده است. در سلولهای فیبروبلاست پوست انسانی، تمایل توزیـع نقـاط شکسـت بـه سمـت ′۳ ژن HPRT (۱۶) و در سلولهای لنفوبلاستوئید B انسانی، تمایل توزیع بـه سمت ′۵ ژن HPRT (۱۳) گزارش شـده اسـت. لنفوسـیتهای T، حذفـهای داخـل اگزونی در اگزون هـای ۲، ۳و۶ گزارش شـده اسـت (۹، ۱۲، ۱۳، ۱۸).

در مطالعه حاضر نیز این نتیجه بـه دسـت آمـد کـه نقـاط شکست به طور تصادفی توزیع نمی شوند. تقریبا قسـمت میـانی ژن HPRT نسبت به پرتو گاما حساس می باشد که با افزایش دز پرتو، این حساسیت بیشتر می گردد. این ناحیه بین اگزون ۲ و۶ قرار دارد و تقریبا یك سوم ژن HPRT را تشکیل می دهد. با درنظر گرفتن حداقل نقـاط شکسـت، ۵۰ درصـد (۱۰/۲۰) نقاط شکست در نمونه هایی که ۲ گری پرتو گرفته انـد و ۶۷ درصد (۱۶/۲۴) نقاط شکست در نمونه هایی که ۳ گری پرتـو گرفته اند، در این ناحیه قرار دارد. این نتـایج،نظریـه جـان بی. لیتل (John B. Little) و همکـارانش را درمـورد سـلول کـه فاکتوری موثر در تغییرات ژنتیکی می باشد را تایید می کنـد (۱۱). مکانیسمی مشخص برای پرتو دوستی ایـن ناحیـه تعیـین نشـده اسـت، امـا از مکانیسـمهای محتمـل مـی تـوان بـه مکانیسـم lipage-misalignment (۱۳، ۱۸)، نوترکیـبی onhomologus و توالی های تکراری ALU اشـاره نمـود. در مطالعات گذشته، مشخص شده است که اندازه تغییرات ژنتیکی وابسته به دز پرتو است (۱، ۱۶). نتایج مطالعه حاضر نیز، ایـن موضوع را تائید می کند. با افزایش دز تعداد حذفهای بزرگتـر از یك کیلو جفت باز افزایـش مـی یـابد. ۶۲ درصـد (۸/۱۳) حذفهای داخل ژنی در نمونه هایی که ۳ گری پرتو گرفتـه انـد بیش از یك کیلو جفت باز را شـامل شـدند، درحـالی کـه ایـن مقدار در نمونه هایی که ۲ گری پرتو گرفتـه انـد، ۳۰ درصـد (۳/۱۰) بود. به طـور خلاصـه، دزهـای پرتـو یونـیزان LET پائین، عاملی موثر در تغییرات ژنتیکی می باشد.

به طوری که تغییرات در دز پرتو سبب ایجاد تغیـیرات در ایجاد حذفها، اندازه حذفها و محل نقـاط شکسـت در داخـل ژن می گردد. با این حال پیشنهاد می شود که اینگونه مطالعات بـا تعداد نمونه های بیشتری انجام گیرد تا بتوان بـه روابـط کمـی دیگر نیز دست پیدا کرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می داننـد کـه از معـاونت محـترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشـکی و خدمـات بهداشـتی درمـانی مشهد که با مساعدتهای آن معاونت انجـام ایـن تحقیـق میسـر گردید، جناب آقای دکتر جلیل توکلی افشار که درمدت انجـام این تحقیق از راهنماییهای با ارزش ایشان استفاده نمودیم، جنـاب آقای غلامین مسئول آزمایشـگاه ژنتیـك انسـانی پژوهشـکده بوعلی، سرکار خانم صیفی، مسئول آزمایشـگاه کشـت سـلولی پژوهشکده بوعلی، جناب آقای غلامحسینیان و جناب آقای لایق کارشناسان فیزیك بخش رادیوتراپـی بیمارسـتان امیـد مشـهد صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Aghamohammadi S. Z., Morris T., Stevens D. L., Thacker J., 1992, Rapid screening for deletion mutations in the harp gene using the polymerase chain reaction: X-ray and α -particle mutant spectra, Mut. Res., 265:269,1-7.

www.SID.ir

Archive of SID

2. Albertini R. J., Scott clork L. J., Nicklas A., O'Neill J. P., Hai T. E., Jostes R., 1997, Radiation quality affects the efficiency of induction and the molecular spectrum of HPRT mutations in human T ce'ls, Radiat. Reas., 198, S76-S86.
3. Bao C. Y., Evans H. H., Horng M. F., Enel J. M., Hui T. E., Sedwich W. D., 1995, Molecular analysis of hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene deletions induced by α and X-radiation in human lymphoblastoid cells, Mutat. Res., 326,1-15.
4. Davidson B. L., Tarle S. A., Palella T. D., Kelley W. N., 1989, Molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase deficiency in ten subjects determined by direct sequencing of amplified transcripts, J. Clin. Invest., 84, 342-349.
5. Gibbs R. A., Nguyen P. N. Edwards A., Civitello A. B., Caskey C. T., 1990 Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine phophoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families, Genomics, 7, 235-244.
6. Hall E. J., 1994, Radiobiology for the Radiologist; Fourth Edition J. B. Lippincott company, philadelphia.
7. Hall E. J., 1997, what will molecular biology contribute to our understanding of radiation-induced cell killing and carcinogensis?, Int. J. Radiat. Biol., 53(3), 110-115.
8. Hsie A. W., Porter R. C., Xu Z., Yu Y., Sun J., Meltz M. L., Schwartz J. L., 1996, Molecular markers of ionizing radiation-induced gene mutations in mammalian cells, Env. Heal. Persp., 104(3), 675-678.
9. Khiadakov M., Young D., Erfle H., Mortimer A., Voron Y., Kovand B. W., 1997, Glickman; Molecular analysis of mutations in T-lymphocytes from experience Soviet Cosmonauts, Env. and Mol. Mutag., 30,21-30.
10. Kondalis A. S., Aa A. D., Cruz J., Curry A., Nohturfft M. P., Curado B. W., 1997, Glickman; Molecular analysis of T-lymphocyte HPRT mutations in individual exposed to ionizing radiation in Goiania, Brazil, Env. and Mol. Mutag., 29,107-116.
11. Little J. B., Nagasawa H., Pfenning T., Vetrovs H., 1997, Radiation-induced genomic instability: delayed mutagenic and cytogenetic effects of X -rays and alpha particles, Radiat. Res.,148, 299-307.
12. Nell J. P. O., Sullivan L. M., Albertini R. J., 1990, In-Vitro induction, expression and selection of thioguanine resistant mutants with human T-lymphocytes, Mutat. Res.,240, 135-142.
13. Nelson S. L., Giver C. R., Grosovsky A. J., 1994, Spectrum of X-ray-induced mutations in the human hprt gene, Carcin., 15(3), 495-502.
14. Nelson S. L., Jones I. M., Fuscoe J. C. Burkhart K. J., Grosovsky A. J., 1995 Mapping the end points of large deletions affecting the hprt locus in human peripheral blood cells and cell lines, Radiat. Res.,191,2-10.
15. Osterholm A. M., Falt S., Lambert B., Hou S. M., 1995, Classification of mutations of the human hprt locus in T-lymphocytes of bus maintenance worker by multiplex-PCR and reverse Transcriptase-PCR analysis, Carcin., 16(8),1909-1912.
16. Parks M. S., Jaberabonsari A., Chen D. J., 1995, Molecular analysis of gamma-ray-induced mutations at the hprt locus in primary human skin fibroblasts by multiplex polymerase chain reaction, Radiat. Res.,141,11-18.
17. Podlutsky A., Osterholm A. M., Hox S. M., Hofmair A., Lambert B., 1998, Spectrum of point mutations in the coding region of the phypoxanthine guanine phosphoribosylteransferase (hprt)gene in human T-lymphocyte in-vivo, Carcin., 19(4),557-566 .
18. Shimahara H., Ato T. K., Hirai Y., Akiyama M., 1995, Spectrum of in-vivo hprt mutations inT-lymphocytes from atomic bomb survivors. I.Sequence alteration in cDNA, Carcin., 16(3),583-591.
19. Wilson J. M., Kelley W. N., 1983, Molecular basos if hypoxanthine-guanine hosphoribosylteransferase deficiency in a patient with the Lesch-Nyhan Syndrome, J. Clin. Invest., 71,1335.

www.SID.ir