Archive of SID

ارائه روشی برای محاسبه شکستگی *DNA* در ماهیان در مطالعات اکوتوکسیکولوژی

پورباقر، ه.[1*]؛ پورمقدم، ن.[1]؛ سهیل ایگدری، م.[1]

[1] *گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران*
Email: poorbagher@ut.ac.ir

در این مطالعه سعی بر این شد تا روشی برای میزان شکستگی *DNA* ارائه شود. ماهی *A. sophiae* در معرض سم سایپرمترین قرار داده شد. *DNA* آبشش استخراج و الکتروفورز گردید. از ژلها عکسبرداری گردید. با استفاده از نرم افزار *ImageJ* منحنی چگالی پیکسل بدست آمده و یک ماکرو هر ستون *DNA* به سه قسمت تقسیم شده و مساحت زیر هر یک از سه قسمت را بدست آورده و تقسیم بر مجموع مساحت سه قسمت گردید تا اثر مقدار متفاوت *DNA* استحصال شده از هر نمونه ماهی از بین برود. به سه قسمت روی ژل ضریبهای ۱ تا ۳ داده شد. ضرایب بزرگتر برای نواحی دورتر از چاهک ژل به دلیل کوچکتر بودن قطعات *DNA* بود. از میانگین حسابی و هندسی برای تخمین *DNA* استفاده شد. میانگین هندسی مقدار شکستگی را بیشتر نشان داد اما میانگین حسابی اختلاف معنی داری بین شکستگی *DNA* نمونه های کنترل و در معرض سم را نشان داد. مطالعه حاضر نشان داد که روش بکار رفته و ماهی آفانیوس توانایی تشخیص شکستگی *DNA* در مواجه با مقادیر سایپرمترین دارد.

کلمات کلیدی: شکستگی *DNA*، آفانیوس، اکوتوکسیکولوژی، الکتروفورز، سایپرمترین، ژل.

مقدمه:

بخش عظیمی از آفت کشها در نهایت به اکوسیستمهای آبی میرسند *(Marino and Ronco, 2005)*. آفت کشها در محیط مانده و در نهایت ممکن است به انسان برسند *(Dich and Wiklund, 1998)*. آفت کشها به مشکل بزرگ جهانی بدل شده اند. این مواد بر اساس ساختار، موجودات هدف و نحوه عملکرد تقسیم بندی شده اند *(Plimmer, 2001)*. ارگانوکلرینها، ارگانوفسفاتها، پایرثروئیدها و کارباماتها از جمله دسته بندیهایی هستند که بر اساس ساختار شیمیایی انجام شده است. از این دسته ارگانوکلرینها دارای ماندگاری بیشتری در محیط هستند و استفاده از آنها ممنوع شده است *(Nandan and Nimila, 2012)*. سایپرمترین یک سم پایرثروئید است که در فعالیتهای کشاورزی مورد استفاده قرار میگیرد و برای موجودات آبزی از جمله ماهی نیز سمیت بالایی دارد *(Singh and Singh, 2008)*. انواعی از علائم پاتولوژیک برای این سم در ماهی گزارش شده است شامل علائم رفتاری، بافت شناختی و شکستگی مواد وراثتی *(Jin et al., 2011)*. روشهای مختلفی برای بررسی اثر مواد شیمیایی بر *DNA* مورد استفاده قرار گرفته است که برخی عبارتند از مطالعه کینتیک سنتز و بازسازی *DNA (Ahmadi and Nafisi, 2001)*، شکستگی زنجیره *DNA (Nelson and Kastan, 1994)*، ریز هسته *(Scarpato et al., 1996)* و آنالیز کامت *(Jin et al., 2011)*. از این میان آنالیز کامت به عنوان روشی دقیق مطرح شده است اما یک رشته از *DNA* را مورد بررسی قرار میدهد. الکتروفورز *DNA* دو رشته ای امکان بررسی مستقیم طول *DNA* را فراهم می آورد. تغییرات *DNA* دو رشته ای در اثر آسیب را متضمن پیامدهای بیولوژیک بیشتری دانسته اند *(Blocher and Pohlit, 1982)*.

در بررسی شکستگی *DNA* با استفاده از الکتروفورز باند یا اسمیر بوجود می آید. در صورت بوجود آمدن باند امکان تعیین طول قطعات شکسته شده با استفاده از لدر وجود دارد. اما مطالعات پیشین نشان میدهد که اسمیر بوجود آمده بنابراین مرز مشخصی برای قطعات *DNA* گسترده شده روی لام وجود ندارد *(Black et al., 1996; Nelson and Kastan, 1994)*. از اینرو

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از لدر در چنین مواقعی غیر ممکن است. از اینرو مطالعه حاضر در نظر دارد تا روشی برای کمی سازی شکستگی *DNA* ارائه نماید که مبتنی بر نظر شخص نبوده و همچنین نیازمند مقدار مساوی از *DNA* بین نمونه ها نباشد. برای این منظور اثر سم سایپرمترین بر شکستگی *DNA* ماهی *Aphanius sophiae* بررسی گردید.

مواد و روش‌ها:

برای این مطالعه از *Aphanius sophaie* استفاده گردید که از رودخانه اشتهارد در استان البرز و با استفاده از تور ساچوک صید گردید. ماهیها دارای میانگین طول ۳/۳ سانتی متر (با انحراف معیار ۰/۲۴) بودند. میانگین وزن نمونه ۰/۶۱ گرم (با انحراف معیار ۰/۲۴) بود. در مطالعات قبلی مقدار سایپرمترین در آبهای سطحی کمتر از ۰/۲ میکرگرم در لیتر گزارش شده است. از اینرو نمونه ها در معرض دو تیمار ۰ (کنترل) و ۰/۰۲ میکروگرم بر لیتر برای مدت ۱۴ روز قرار گرفتند. دوز پایین مورد استفاده برای کاهش احتمال مرگ و میر نمونه ها در طول آزمایش و همچنین به منظور ارزیابی روش الکتروفورز برای تشخیص مقادیر بسیار پایین سم سایپرمترین به عنوان اندیکاتور بود. نمونه ها در آکواریومهای شیشه ای با آب کلرزدایی شده که مجهز به هواده بود نگهداری شدند. بعد از اتمام آزمایش نمونه ها با پودر گل میخک بیهوش گردیده و آبشش آنها جدا شده در اتانول نگهداری گردید.

استخراج*DNA* ، الکتروفورز و استخراج داده از ژل: برای استخراج *DNA 20* تا ۲۵ میلیگرم نمونه مورد استفاده قرار گرفت. استخراج با استفاده از کیت سیناژن و مطابق با دستورالعمل سازنده انجام شد. درنهایت *DNA* استخراج شده بر روی ژل آگارز در بافر *TBE* قرار داده شد. اتیدیم بروماید به ژل افزوده شد تا امکان عکسبرداری از *DNA* فراهم آید. در نهایت، از ژل با استفاده از سیستم ژل داک عکسبرداری گردید. ابتدا یک ماکرو برای برنامه نرم افزار *ImageJ* نوشته شد (شکل ۱). ماکرو در یک فایل متنی با فرمت *.txt* ذخیره شد. برای نصب این فایل در *ImageJ* از منوی *Plugins* استفاده شده و ماکرو نصب گردید.

شکل ۱- ماکرو نوشته شده برای نرم افزار *ImageJ* برای قسمت نمودار سطح زیر منحنی چگالی پیکسل.

```
Width = getWidth; height = getHeight;
//determine the number of segments
N = getString("Enter the number of streing:", N);
x = newArray(N);
for(i =1; i < N; i++){
        x[i] = (width/N)*i;
        drawLine(x[i],0,x[i], height) }
```

سپس عکس های سیاه و سفید گرفته شده از ژل با استفاده از نرم افزار فتوشاپ ورژن ۷ *invert* گردیدند. به این معنی که هر بخش سفید به سیاه و بالعکس تبدیل شدند. عکسهای تغییر داده شده وارد نرم افزار *ImageJ* گردید. هر اسمیر با استفاده از منوی آنالیز و ژل برای هر اسمیر نمودار تراکم پیکسل ترسیم گردیده و با استفاده از ماکروی نوشته شده به سه قسمت تقسیم گردید. هر یک از سه سطح زیر نمودار با استفاده از ابزار *Wand* تعیین مساحت شد که بر اساس تعداد پیکسل بود. برای هر اسمیر که متعلق به یک نمونه ماهی بود، مساحت هر یک از سه سطح بر مجموع سه مساحت تقسیم گردید تا اثر مساوی نبودن مقدار *DNA* در هر اسمیر از بین برود. روند کار در شکل ۲ آمده است.

آنالیز داده ها: از میانگین وزنی برای تعیین شکستگی *DNA* استفاده گردید. برای این منظور وزن ۱، ۲ و ۳ برای هر یک از سه قسمت اول، وسط و سوم ستون ژل در نظر گرفته شد. زیادتر شدن وزن با توجه به دور شدن از چاهک الکتروفورز بر این مبنا بود که قطعات کوچکتر سریعتر به انتهای ستون ژل رسیده و سهم مهمتری در این نتیجه گیری که *DNA* خرد شده است دارند. برای هر ستون ژل میزان شکستگی با فرمول زیر محاسبه شد:

www.SID.ir

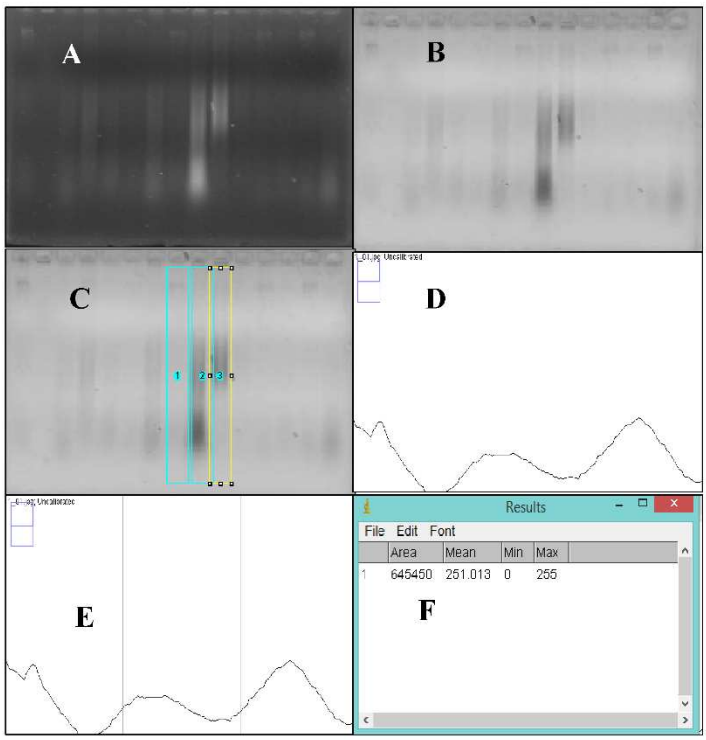
Archive of SID

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^{n} w_i x_i}{\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

که در این فرمول $\bar{x}$، میانگین حسابی وزنی برای شکستگی *DNA* هر نمونه ماهی، x_i، عدد بدست آمده برای هر ناحیه از سطح زیر نمودار در هر ستون ژل، w_i، وزن داده شده به هر یک از سه قسمت زیر نمودار و i، قسمت زیر نمودار بود که از ۱ تا ۳ در تغییر بود. برای محاسبه میانگین هندسی وزنی از فرمول زیر استفاده شد:

$$\bar{x} = (\prod_{i=1}^{n} x_i^{wi})^{1/\sum_{i=1}^{n} w_i}$$

میانگین حسابی و هندسی وزنی بدست آمده برای هر نمونه ماهی با استفاده از آزمون t بین ماهیان دریافت کننده سم و گروه کنترل مقایسه گردید.



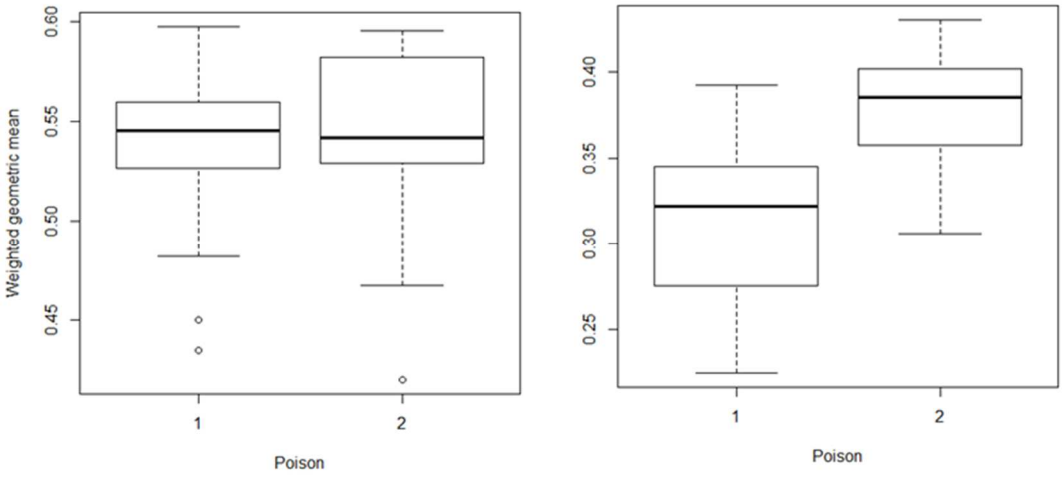
شکل ۲- مراحل استخراج داده از ژل. *A*- عکسبرداری از ژل. *B*- اینورت نمودن تصویر. *C*- تعیین محدوده هر ستون از *DNA*. *D*- نمودار تراکم پیکسل بدست آمده برای هر ستون ژل. *E*- تقسیم هر منحنی به سه قسمت با استفاده از ماکرو. *F*- استخراج مساحت هر یک از سه قسمت زیر سطح نمودار.

نتایج:

مقدار شکستگی *DNA* محاسبه شده با روش میانگین حسابی و هندسی در شکل ۳ آورده شده است. محاسبات صورت گرفته بر اساس میانگین حسابی مقدار شکستگی *DNA* را کمتر از آنچه میانگین هندسی برآورد نمود. میزان شکستگی *DNA* برآورد شده بر اساس میانگین حسابی از ۰/۲۲ تا ۰/۴۳ و بر اساس میانگین هندسی از ۰/۴۱ تا ۰/۵۹ در تغییر بودند.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۳- تغییرات میزان شکستگی *DNA* اندازه گیری شده با میانگین حسابی و هندسی.

آزمون *t* وجود اختلاف معنی دار بین میزان شکستگی *DNA* نمونه های گروه کنترل و نمونه های قرار گرفته در معرض سم را بر اساس محاسبه میانگین حسابی نشان داد (*t = -7.4397, df = 74.743, p-value = 1.404e-10*). همین آزمون اختلاف معنی داری را بین دو گروه بر اساس محاسبه میانگین هندسی نشان ندادند (*t = -1.003, df = 83.644, p-value = 0.3187*).

بحث:

از اسید نوکلئیک برای ارزیابی اثرات ترکیبات شیمیایی بسیار استفاده شده است *(Das and Mukherjee, 2003)*. اندازه گیری شکستگی *DNA* به ندرت به صورت کمی *(Black et al., 1996)* و همچنین کیفی صورت گرفته است. مطالعه حاضر نشان داد که سایپرمترین در غلظتهای پایین نیز میتواند تاثیرات شدید بر شکستگی *DNA* در ماهی *A. sophaie* داشته باشد. مطالعه حاضر همچنین نشان داد زنجیره دوتایی *DNA* حساسیت لازم نشان دادن این سم را در محیط دارد و غلطتهایی کمتر از آنچه در محیط وجود دارد را منعکس مینماید. اثرات مخرب سایپرمترین در ماهیان دیگر نیز مورد بررسی قرار گرفته است و اثرات تخریبی *DNA* به استرس اکسیداسیونی *(Jin et al., 2011)* و ظرفیت سرکوب شده تعمیر *DNA (Shi et al., 2011)*نسبت داده شده است .

اندازه گیری *DNA* بر اساس چگالی آن بر روی یک ستون ژل نیازمند وجود باندهای مشخص است. وقتی *DNA* بر روی ژل گسترش پیدا می کند نمیتوان مرز مشخصی برای آن یافت و با استفاده از لدر اقدام به تعیین وزن مخصوص بخشی از گسترش را معین نمود. در مطالعه حاضر روشی عملی و بدور از قضاوت شخصی ارائه دهد.

همچنین نشان داده شد که نوع محاسبه انجام شده بر نتیجه گیری نهایی اثر میگذارد. محاسبه بر اساس محاسبه بر اساس میانگین هندسی میزان شکستگی را بزرگتر از محاسبه صورت گرفته بر اساس میانگین حسابی ارزیابی مینماید اما اختلاف معنی دار بین تیمارها را نشان نداده است. در مطالعه حاضر، تعداد قسمتهای در نظر گرفته شده برای هر ستون ژل سه عدد بود، مطالعه

www.SID.ir

Archive of SID

ای دیگر لازم است تا مشخص شود بکار بردن تعداد قسمتهای بیشتر بر روی ژل بر نتایج دو روش بکار برده چه اثری میتواند داشته باشد.

منابع:

1- Ahmadi, M. R. and M. Nafisi (2001). Identification of bioindicator invertebrates in running waters. Khabir Press. Iran, 240 p.
2- Black, M. C., J. R. Ferrell, R. C. Horning and L. K. Martin (1996). DNA strand breakage in freshwater mussels (Anodonta grandis) exposed to lead in the laboratory and field. Environmental Toxicology and Chemistry, 15: 802-808.
3- Blocher, D. and W. Pohlit (1982). DNA double strand breaks in Ehrlich ascites tumour cells at low doses of X-rays. II. Can cell death be attributed to double strand breaks? International Journal of Radiation Biology, 42: 329-338.
4- Das, B. K. and S. C. Mukherjee (2003). Toxicity of cypermethrin in Labeo rohita fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C Toxicology and Pharmacology, 134: 109-121.
5- Dich, J. and K. Wiklund (1998). Prostate cancer in pesticide applicators in Swedish agriculture. The Prostate, 34: 100-112.
6- Jin, Y., S. Zheng, Y. Pu, L. Shu, L. Sun, W. Liu and Z. Fu (2011). Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (Danio rerio). Chemosphere, 82: 398-404.
7- Marino, D. and A. Ronco (2005). Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 75: 820-826.
8- Nandan, S. B. and P. J. Nimila (2012). Lindane toxicity: Histopathological, behavioural and biochemical changes in Etroplus maculatus (Bloch, 1795). Marine Environmental Research, 76: 63-70.
9- Nelson, W. G. and M. B. Kastan (1994). DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. Molecular and Cellular Biology, 14: 1815-1823.
10- Plimmer, J. R. 2001. Chemistry of Pesticides. In: R.I. Krieger (Ed.). Handbook of pesticide toxicology. USA, Academic Press. 1. pp: 95-107.
11- Scarpato, R., L. Migliore, G. Angotzi, A. Fedi, L. Miligi and N. Loprieno (1996). Cytogenetic monitoring of a group of Italian floriculturists: no evidence of DNA damage related to pesticide exposure. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 367: 73-82.
12- Shi, X., A. Gu, G. Ji, Y. Li, J. Di, J. Jin, F. Hu, Y. Long, Y. Xia and C. Lu (2011). Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. Chemosphere, 85: 1010-1016.
13- Singh, P. B. and V. Singh (2008). Cypermethrin induced histological changes in gonadotrophic cells, liver, gonads, plasma levels of estradiol-17β and 11-ketotestosterone, and sperm motility in Heteropneustes fossilis (Bloch). Chemosphere, 72: 422-431.

www.SID.ir