

حساسیت اشعه ایکس در جنین *Xenopus*

سمیرا جلالی پور

۱- کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم پزشکی آبادان، ایران.

Dr.samira.jalalipoor761@gmail.com

چکیده

با تمرکز بر *Xenopus laevis* ما اثرات تابش اشعه ایکس را بر روی قرار گرفتن در معرض قبل و بعد از لقاح بررسی کردیم. ما دوزهای اشعه ایکس ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰، ۱۰ اعمال کردیم. ۵۰ درصد از ۳۶۰ تخمک تابش شده در ۲۵۰ گری نتوانستند بارور شوند در حالی که تخمک‌های بارور شده به طور معمول تا مرحله گاسترولا رشد کردند. دوزهای ۱۰ تا ۲۵۰ گری باعث ناهنجاری‌های رشدی می‌شود. میزان مرگ و میر بالا در دوزهای ۱۰۰ تا ۵۰۰ گری مشاهده شد. تابش پس از لقاح در ۵۰ تا ۱۰۰ گری منجر به مرگ ۱۰۰٪ شد. در حالی که قرار گرفتن در معرض ۱۰ گری تنها منجر به مرگ ۱۳٪ شد. اگرچه هر دو سطح قرار گرفتن در معرض انواع مشابهی از ناهنجاری‌های رشدی را در مقایسه با تابش قبل از لقاح ایجاد کردند. این مطالعه نشان می‌دهد که چگونه زمان و شدت قرار گرفتن در معرض اشعه ایکس به طور جدی بر زنده ماندن جنین تاثیر می‌گذارد، به ویژه در طول مراحل حساس لقاح و گاستولاسیون ما دوز لازم و کافی را برای بررسی بیشتر مکانیزم‌های مولکولی آسیب اشعه ایکس به DNA و پروتئین ایجاد می‌کنیم.

کلمات کلیدی: ناهنجاری‌های تکوینی (رشدی)، جنین‌زایی دوزیستان، حساسیت به اشعه ایکس، پروتئین

۱. مقدمه

اشعه ایکس عمدتاً از طریق پرتوهای یونیزه کننده‌ای که از خود ساطع کنند با سلول‌های انسانی و حیوانی در تعامل است که بسته به دوز و مدت زمان قرار گرفتن در معرض اشعه اثرات مختلفی دارد سطوح یونیزاسیون بالا می‌تواند الکترون‌های محکم را از اتم‌ها حذف کند و یون ایجاد کند این فرایند می‌تواند منجر به شکستن DNA آسیب رساندن به مکانیزم‌های ترمیم سلولی و در نهایت مرگ سلولی شود (Huang and Zhou, 2021; Saini and Gurung, 2025). علاوه بر آسیب DNA اشعه ایکس می‌تواند به طور مستقیم یا غیر مستقیم بر پروتئین‌هایی که برای ساختار و عملکرد سلولی حیاتی هستند تاثیر بگذارد پرتوهای یونیزان از طریق یونیزاسیون مستقیم و اکسیداسیون با واسطه ROS (به عنوان مثال رادیکال‌های هیدروکسیل) باعث آسیب پروتئین می‌شود که منجر به کربو نیلاسیون، تکه تکه شدن و اتصال متقابل زنجیره‌های جانبی سید آمینه می‌شود (Dalle -Donne et al; Hall & Giaccia, 2018). این امر فعالیت آنزیمی



مسیرهای انتقال سیگنال، یکپارچگی ساختاری را مختل می‌کند و اختلال عملکرد سلولی را تشدید می‌کند آسیب انباشته بر سیستم‌های پروتئوستاز (مانند یوبی کوییتین- پروتئازوم، چاپرون‌ها) غلبه می‌کند، باعث ایجاد استرس ER تجمعات نادرست تا خوردگی و آپوپتوز می‌شود (Malhotra & Kaufman, 2007) پروتئین‌های کربونیل‌شده به عنوان نشانگرهای زیستی استرس اکسیداتیو، مرتبط با تخریب عصبی، پیری و آسیب‌شناسی‌های مرتبط با تشعشع عمل می‌کنند (Azzam, 2003; Stadtman & Levine, 2012; et al., 2012). گامت‌ها و زیگوت‌ها در مقایسه با سلول‌های سوماتیک به دلیل آسیب DNA حاصل از تشعشع، تداخل با چرخه سلولی و تمایز در طول این مراحل حساس به پرتو هستند این یک مدل مناسب برای القا و مطالعه آسیب و تجمع پروتئین به روشی کنترل شده ارائه می‌دهد. دوزیستان از جمله *Xenopus laevis* به عنوان مدل‌هایی برای مطالعه اثرات طیف وسیعی از دوزهای تشعشع در طول رشد جنینی قبل از دگردیسی و مراحل بزرگسالی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Hamilton, 1967; Ijiri, 1979; Landreth and Dunway, 1974; Anderson et al., 1997; Dong et al., 2010; Stark et al., 2015; Carotenuto et al., 2016).

این مطالعات به طور کلی دوزهای کشنده را در مراحل مختلف چرخه زندگی دوزیستان نشان داد تحقیقات همیلتون در اواخر دهه ۱۹۶۰ نشان داد که جنین‌های هاپلوئید *Xenopus* نسبت به هم‌تایان دیپلوئید خود در مواجهه به اشعه ایکس حساس‌تر هستند (Hamilton, 1967). همیلتون این تفاوت در پاسخ دوز اشعه ایکس را به عوامل ژنتیکی مرتبط با تعداد کروموزوم نسبت داد با این حال مطالعه او این احتمال را افزایش می‌دهد که آسیب DNA به تنهایی ممکن است نتایج مشاهده شده را به طور کامل توضیح ندهد و نشان می‌دهد که آسیب پروتئین نیز می‌تواند نقش مهمی ایفا کند.

۲. مواد و روش‌ها

آماده سازی حیوانات، برای آماده سازی حیوانات ماده برای تخمک گذاری ۷۲ ساعت قبل از لقاح با ۱۰۰ واحد بین المللی گونادو تروپین انسانی (hCG) پرایم شدند شب قبل از لقاح هر حیوان یک تزریق تقویت کننده hCG 750 IU دریافت کرد و در ظرف جداگانه در دمای ۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری شد تا تخمک گذاری آغاز شود.

در روز لقاح بیضه‌های نر طبق پروتکل جراحی استخراج شد بیضه‌های استخراج شده سپس در محلول 1xMMR

(NaCl 1M, KCl 20 mM, MgSO₄ 1mm, CaCl₂ Dihydrate 20mm, HEPES 50 mm) در محلول ۴

درجه سانتیگراد نگهداری شدند.



مجموعه تخم تقریباً ۱۲ ساعت پس از افزایش hCG ماده‌ها به ظروف حاوی 1X محلول بارت با نمک بالا (NaCl 1.095 M, KCl 0.010 M, NaHCO₃ 0.024 M, MgSO₄ · 7H₂O 0.008 M, HEPES 0.0100 M, Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.003 M, CaCl₂ · 2H₂O 0.004 M) منتقل شدند پس از حدود ۹۰ دقیقه برای لقاح یا تابش جمع آوری شدند.

فرایند لقاح پس از تخلیه محلول بارت با نمک بالا تخم‌ها با استفاده از بیضه‌های خیس شده در 1X MMR بارور شدند مخلوط اسپرم و تخم به مدت ۴ دقیقه همگن شد و سپس 0.1 X MMR اضافه شد چرخش سطحی در ۲۰ دقیقه رخ داد. محلول سیستئین ۲٪ اضافه شد و جنین‌ها ۵ بار هر دو ۲ دقیقه در آمیخته شدند سپس با 0.1 X MMR شسته شدند و در ۱۸ درجه سانتیگراد کشت داده شدند.

روش پرتودهی تابش با استفاده از دستگاه اشعه ایکس Rad Source RS 1800 Q انجام شد. یک دوره خنک کننده اجباری سه ساعته بین جلسات در آزمایشات با ۵۰۰ گری لازم است هر جلسه تابش بیش از ۲۰ دقیقه محدود بود دوزهای ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ گری در محفظه 2 ابزار (۹.۵ سلنتی متر از منبع) با نمونه‌ها متمرکز برای اطمینان از قرار گرفتن در معرض تابش بهینه تجویز شد تابش ۱۰ گری بر روی کف ابزار (۲۱.۵ سانتی متر از منبع) با رعایت اصول توزیع یکسان انجام شد همه نمونه‌ها در ظروف پتری ۳۵ میلیمتری حاوی ۵۰ تا ۱۲۰ تخم یا جنین هر کدام تحت تابش قرار گرفتند تخم‌های پرتودهی شده قبل از لقاح در مقدار کمی محلول ۱X بارت با نمک بالا برای نگهداری معلق شدند. جنین‌ها بلافاصله پس از مرحله شستشوی سیستئین و قبل از اولین مرحله برش در محلول ۰.۱ XMMR تحت تابش قرار گرفتند.

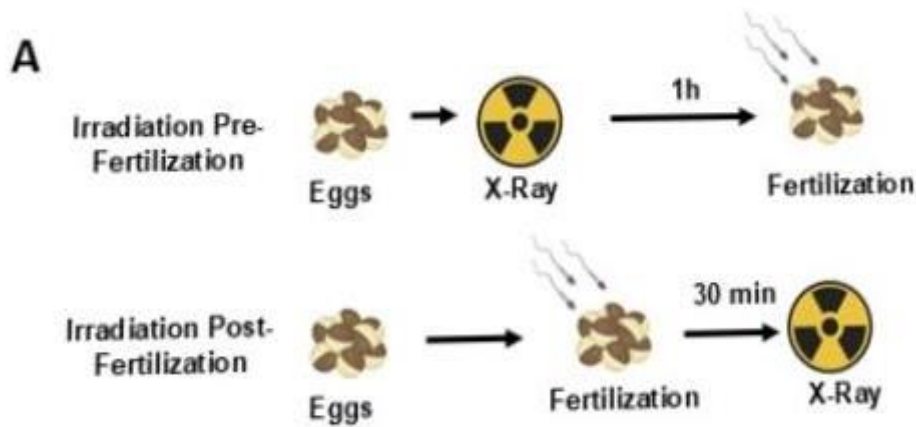


Reagents

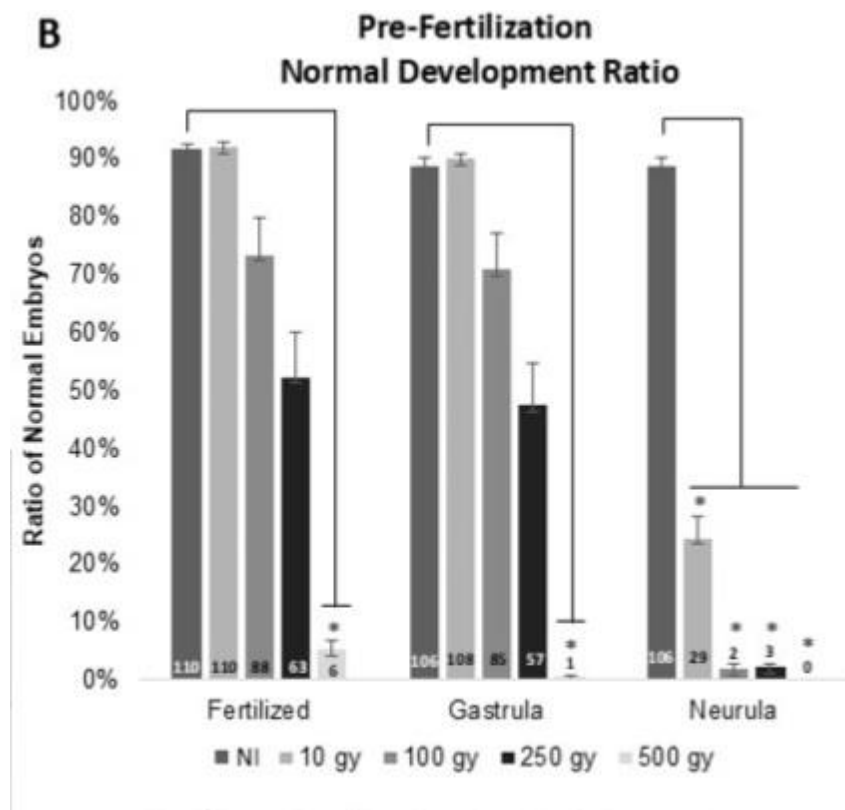
Reagent	N° catalog	Available From
Chorulon 5000 IU (hCG)	A002377	Merck
cysteine	1.028838.0100	Millipore
Falcon 35 mm Petri dishes	353001	Corning
NaCl	SX0420-5	Millipore
KCl	7300-500GM	Millipore
MgSO4.7H2O	230391-500G	Sigma
HEPES	H-400-1	Goldbio
Ca(NO3)2.4H2O	A16645.36	Thermoscientific
CACL2	C8106-1KG	Sigma
CACL2.2H2O	C3881-500G	Sigma

۳. نتایج

در حالی که این مطالعات نشان داده‌اند که دوزیستان چگونه به تشعشعات واکنش نشان می‌دهند تحقیقات بیشتری برای درک مقاومت آنها در برابر دوزهای شدید مورد نیاز است ما تصمیم گرفتیم اثرات پرتوهای قبل و بعد از لقاح را بر بقا و رشد جنینی *Xenopus Laevis* بررسی کنیم.

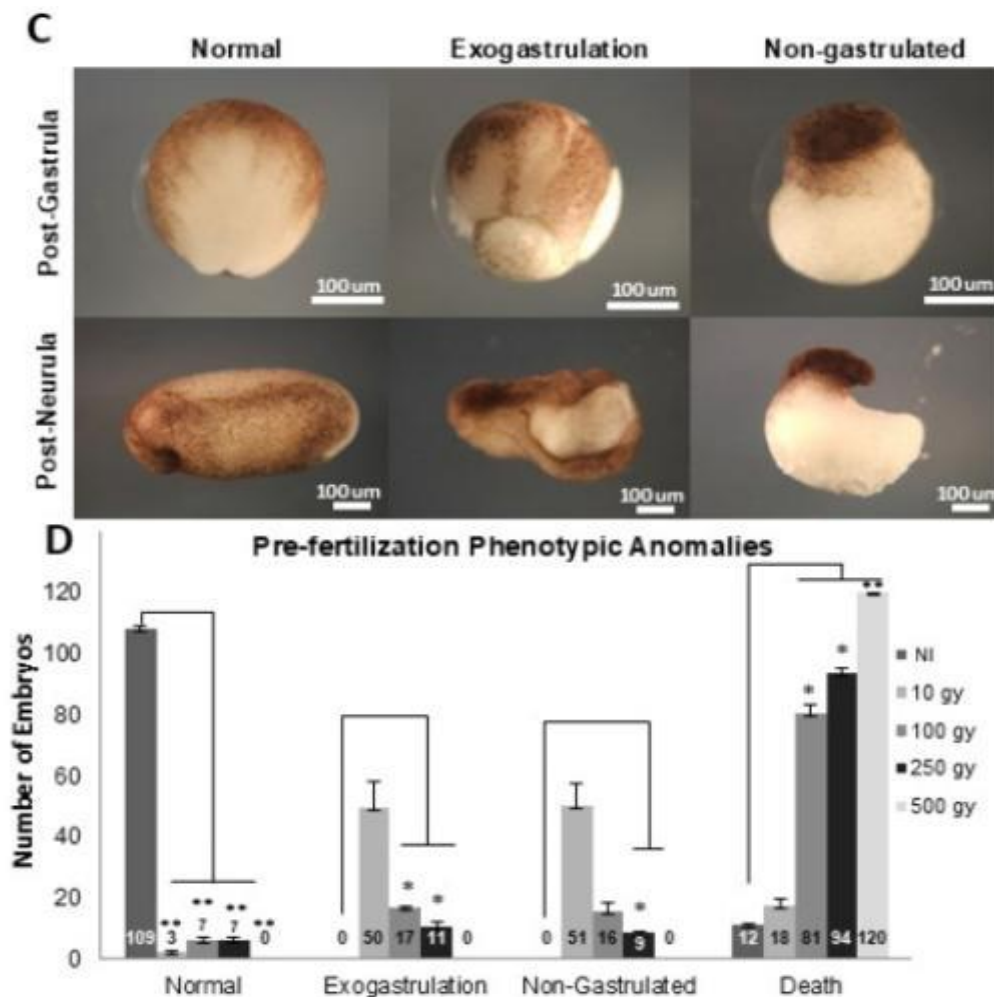


شکل ۱: اعمال دوزهای مختلف اشعه ایکس، ۱۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و ۵۰۰ گری به تخم‌های *Xenopus* و سپس بارور کردن آنها ۱ ساعت پس از تابش. همچنین تابش ۵۰۱۰ و ۱۰۰ گری روی جنین‌های تازه بارور شده شکل (A).





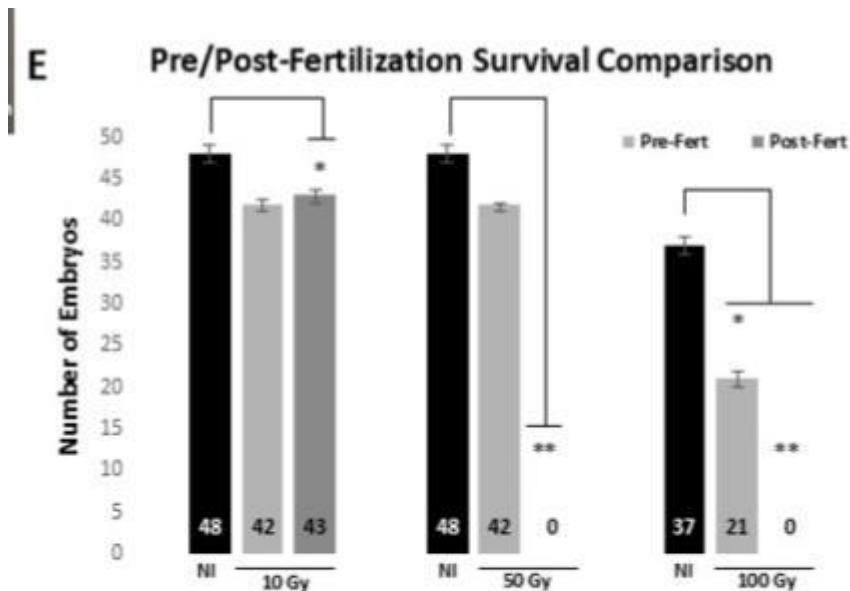
شکل ۲. کاهش قابل توجه در نرخ لقاح به ویژه در بالاترین دوزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ گری که در آن نرخ لقاح به ترتیب به طور متوسط به حدود ۵۰٪ و ۵٪ کاهش یافت (B ستون اول) سپس متوجه شدیم که تخم‌های بارور شده تا مرحله بلاستولا رشد طبیعی داشتند ما همچنین افزایشی را در میانگین تعداد جنین‌هایی مشاهده کردیم که با افزایش دوز تشعشع نمی‌توانند معده شوند (B ستون دوم) از گاسترولا تا نورولا اثر تشعشع چشم گیر بود تنها در دوز ۱۰ گری به طور متوسط ۷۶٪ نتوانست به مرحله نورولا برسد و در ۵۰۰ گری هیچ جنینی موفق به انتقال از مرحله گاسترولا به نورولا نشد (B ستون سوم)



شکل ۳. در آزمایش مستقل دیگری، چهار دسته فنوتیپی مشاهده شده در تخم‌های پرتودهی و پرتودهی نشده از قبل بارور شده ارزیابی شد (C و D) در شرایط بدون تشعشع به طور متوسط ۹۱ درصد از جنین‌ها



رشد طبیعی داشتند (C و D). برعکس چندین ناهنجاری در دوزهای تشعشع از ۱۰ تا ۵۰۰ گری مشاهده شد از جمله مرگ برون معده و غیر معده (C و D) مرگ و میر بالا عمدتاً در گروه‌هایی مشاهده شد که ۱۰۰ و ۲۵۰ و ۵۰۰ گری دریافت کردند که نرخ مرگ و میر به ترتیب به ترتیب ۶۷.۵، ۷۹، و ۱۰۰ درصد جنین را نشان می‌دهد. (شکل D۱) تنها به طور متوسط ۲.۵-۶٪ از جنین‌های تحت تابش رشد طبیعی را مدیریت کردند.



شکل ۴: قرار گرفتن ۵۰ زیگوت در هر شرایط را در سه نسخه از دو ماده مجزا در معرض دوزهای تشعشع ۰، ۱۰، ۵۰، ۱۰۰ گری و مقایسه میانگین بقای قرار گرفتن در معرض تابش قبل از لقاح تا پس از لقاح. شمارش تعداد جنین‌های زنده مانده در اواخر مرحله نورولا (E۱) هیچ جنینی در دوزهای ۵۰ و ۱۰۰ گری به مرحله نورولا نرسید (شکل E۱ نوارهای خاکستری تیره) در دوز ۱۰ گری میانگین تعداد جنین‌های نورولای زنده مانده تقریباً مشابه بود اما به طور قابل توجهی کمتر از جنین‌های بدون تابش بود (E۱ سه نوار اول)



9th National Conference on

**Innovation in Agriculture, Animal
Sciences and Veterinary Medicine**

نهمین کنفرانس ملی
**نوآوری در کشاورزی،
علوم دامی و دامپزشکی**

این مطالعه بر روی اثرات پرتوهای ایکس انجام شده و بیشتر توضیح می‌دهد و کار بنیادی همیلتون (۱۹۶۷) را گسترش می‌دهد با بررسی مجدد این موضوع شرایط تابش قبل از لقاح را معرفی کردیم و مشاهده کردیم که ناباروری تخمک متناسب با دوزهای پرتوهای بالاتر افزایش می‌یابد. در مقابل تخم‌هایی که در معرض سطوح کمتر تشعشع قرار می‌گیرند نرخ بالاتری از ناهنجاری‌های فنوتیپی را نشان می‌دهند اما کشندگی کمتری را در طول رشد جنینی نشان می‌دهند یافته‌های ما با مشاهدات (همیلتون ۱۹۶۷) مطابقت دارد و نشان می‌دهد که جنین‌های تحت تابش قبل و بعد از لقاح می‌توانند تا مرحله بلاستولا بدون ناهنجاری زنده بمانند با این حال با شروع گاسترولاسیون ناهنجاریهای قابل توجهی ظاهر می‌شود که اغلب منجر به مرگ جنین می‌شود.

۵. منابع

Saini ,P Gurung .2025 .A comprehensive review off sensors of radiation induced damage , radiation induced proximal events and cell death . Immunol Rev 329(1) .

R Huang ,P-K Zhou ,2021 .DNA damage repair : historical perspectives mechanistic pathways and clinical translation for targeted cancer therapy : signal transduct target ther9;6(1):254

Hall,E.J.,& Giaccia,A.J.(2018). Radio biology for the radiologist(8 .th ed) Lippincott Williams & Wilkins . Mechanisms of Direct /indirect radiation effects.

Dalle -Donne ,I., Rossi ,R Giu starini ,D., Milzani,A.,& Colombo ,R.(2006) protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress.Clinica Chimica Acta ,364(1-2),23-38.

Malhotra ,J.D.,&Kaufman,R.J.(2007). The endoplasmic reticulum and the un folded protein response . Seminars in cell & developmental biology,18(6),716-731.

Dukan.S.,&Nyström.T.(1998). Bacterial senescence:Protein

Oxidation in non proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. The EMBO journal,17(18),5269-5279.

Stadtman,E.R.,&Levine,R.L.(2003). Free radical mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. Amino acids,25(3),207-218.

Azzam,E.I.,Jay-Gerin.J.P.,D.(2012). Ionizing radiation - induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. cancer letters ,327(1-2),48-60.

L Hamilton.1967. A comparison of the X-ray sensitivity of haploid and diploid zygotes of xenopus laevis .Radiat Res 30(2):248-60.



K1 Ijiri.1979. X-ray effect on the development of xenopus laevis embryos with special reference to pri mordial germ cells.J Radiat Res .20(1):133-6.

HF Landreth ,PB Dunaway ,GE Cosgrove.1974. Effects of whole gamma irradiation on various life stages of the toad ,Bufo woodhousei fowleri.Radiat Res 58(3):432-8.

JA Anderson,AL Lewellyn,JL Maller .1997. Ionizing radiation induces apoptosis and elevates cyclin A1-Cdk2 activity before but not after the midblastula transition in Xenopus.Mol Biol Cell 8(7):1195-206.

JiaJia Dong ,Sean P Mury , Karen E Drahos , Royce K P Zia , Carla V Finkelstein .2010. Shorter exposures to Harder x-rays trigger early apoptotic events in xenopus laevis embryos .PLoS One 29;5(1).

K.Stark ,D.E.Scott,O.Tsyusko D.P.Coughlin ,T.G.Hinton.2015. Multi level effects of low dose rate ionizing radiation on southern toad , Anaxyrus[Bufo] terrestris.PLoS One 30 ;10(4).

R Carotenuto ,M Tussellino ,P Russo .2016.Survival fraction and phenotype alterations of xenepoos laevis embryos at 3 Gy ,150kV X-ray irradiation. biochem biophsy Res Commun 24;480(4):580-585.