

سورة الاحقاف



دانشگاه علوم پزشکی و  
خدمات بهداشتی درمانی قزوین

پایان نامه:

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد علوم تشریحی

عنوان:

بررسی اثرات میدان الکترومغناطیسی بر میزان فراگمنته شدن DNA  
در بلاستوسیست موش سوری

استاد راهنما:

دکتر فرزاد رجایی

اساتید مشاور:

دکتر علیرضا شمس

دکتر مجید سیرتی

مهندس امیر جوادی

نگارش:

نسیم برهانی

شماره پایان نامه: ۴

سال تحصیلی ۸۵-۸۶

معاونت آموزشی  
رئیس

۱۳۸۷ / ۳ / ۲۸

۹۶۵۷۱

تقدیم به پدر بزرگم

که عشق به آموختن را در من بیدار کرد.

تقدیم به پدر و مادرم

که همواره مرهون لطف و مهربانی شان هستم.

پس از شکر گزاری به درگاه خداوند متعال، وظیفه خود می دانم، از زحمات افرادی که در کلیه مراحل این پایان نامه اینجانب را یاری فرمودند، تشکر و قدردانی نمایم:

- استاد راهنمای گرامی، جناب آقای دکتر فرزاد رجایی که در دوره کارشناسی ارشد و بخصوص در تمامی مراحل پایان نامه اینجانب بودند و موفقیت های خویش را مرهون محبت های ایشان میدانم.
- جناب آقای دکتر مجید سیرتی و جناب آقای دکتر علیرضا شمس که مشاوره این پایان نامه را پذیرفتند و از راهنمایی های ایشان بهره مند شدم.
- جناب آقای مهندس امیر جوادی که مشاوره آماری این پایان نامه را پذیرفتند و از راهنمایی های ایشان بهره مند شدم.
- جناب آقای دکتر علی صفری که در تهیه دستگاه مولد میدان های الکترومغناطیسی با اینجانب همکاری کردند.
- همکلاسی های عزیزم خانم ها فاطمه صباغ زیارانی و مرضیه مردانی که در طول انجام این طرح از کمک های بی شائبه شان بهره مند شدم.
- وهمه همکاران و دوستان خوبم در گروه علوم تشریح که هر یک به گونه ای در انجام این طرح صمیمانه با من همکاری کردند.

## فهرست مطالب :

عنوان	صفحه
چکیده فارسی.....	۱
فصل اول: مقدمه	
۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع.....	۳
۱-۲- کلیات	
۱-۲-۱- پرتوهای الکترومغناطیس.....	۴
۱-۲-۲- مکانیسم اثر میدان های الکترومغناطیس.....	۶
۱-۲-۳- پدیده آپتوز.....	۱۱
۱-۲-۴- روش های شناسایی سلول های آپتوتیک.....	۱۵
۱-۳-۱- مروری بر تحقیقات انجام شده.....	۱۸
۱-۴-۱- ضرورت تحقیق، اهداف و فرضیات.....	۳۰
فصل دوم: مواد و روش کار	
۱-۲- مشخصات دستگاه تولید کننده امواج الکترومغناطیسی.....	۳۱
۱-۲- حیوانات و جمع آوری جنین ها.....	۳۱
۱-۲-۳- رنگ آمیزی TUNEL.....	۳۵
۱-۲-۴- روش های آماری.....	۳۷
فصل سوم: یافته ها	
۱-۳- میزان فراوانی پلاک واژنی.....	۳۸
۲-۳- میزان فراوانی جنین به ازای هر مادر.....	۳۸
۳-۳- تعداد بلاستومرها و میزان ایندکس فراگمته شدن بلاستوسیست ها.....	۳۹
فصل چهارم : بحث	
۱-۴- بحث مربوط به اثر امواج الکترومغناطیس بر تعداد موش های پلاک مثبت (حامله).....	۴۰
۲-۴- بحث مربوط به اثر امواج الکترومغناطیس بر تعداد بلاستوسیست به ازای هر مادر.....	۴۲
۳-۴- بحث مربوط به اثر امواج الکترومغناطیس بر تعداد بلاستومرها.....	۴۵
۴-۴- بحث مربوط به اثر امواج الکترومغناطیس بر میزان فراگمته شدن DNA.....	۴۷
نتیجه گیری کلی.....	۵۴
پیشنهادات.....	۵۵
خلاصه انگلیسی.....	۵۶
منابع مورد مطالعه.....	۵۷

# فصل اول

## مقدمه

## چکیده

زمینه: زندگی روی زمین غوطه ور شدن در دریایی از میدان های الکترومغناطیس طبیعی است. این محیط طبیعی، به دلیل حضور طیف وسیع و در حال گسترش میدان های مصنوعی به شدت تغییر کرده است. نتایج مطالعات انسانی، ارتباط میان اثرات قرار گیری در معرض منابع گوناگون میدان های الکترومغناطیسی و سیستم تولید مثل به ویژه سقط های خود به خودی، کاهش وزن هنگام تولد و ناهنجاری های مادرزادی را مورد بررسی قرار می دهد.

هدف: هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات احتمالی میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس های بسیار پایین بر میزان فراگمنته شدن DNA در بلاستوسیست موش سوری بود.

مواد و روش ها: ۸۰ عدد موش سوری ماده به صورت تصادفی به دو گروه تقسیم شدند. موش های گروه کنترل، در معرض میدان قرار نگرفتند و موش های گروه تجربی به مدت دو هفته، هفته ای ۶ روز و روزانه ۴ ساعت در معرض میدانی با فرکانس ۵۰ هرتز و شدت ۰/۵ میلی تسلا قرار گرفتند. در روز هشتم قرار گیری در معرض میدان، تحریک تخمک گذاری در موش های هر دو گروه به کمک PMSG و hCG انجام شد و موش های ماده جهت جفت گیری در مجاورت موش های نر قرار گرفته و صبح روز بعد موش های پلاک مثبت بعنوان موش های حامله تلقی شدند. ۱۰۲ ساعت پس از تزریق hCG، موش ها به روش جابجایی مهره های گردنی بیهوش شدند؛ عمل خارج کردن بلاستوسیست ها با استفاده از روش Flushing در شاخ های رحمی انجام شد. بلاستوسیست ها پس از فیکس شدن و رنگ آمیزی با تکنیک TUNEL، در زیر میکروسکوپ فلورسنت از نظر تعداد بلاستومرها و سلول های آپوپتوتیک مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس تعداد موش های حامله، تعداد جنین به ازای هر حاملگی، تعداد بلاستومرها در هر بلاستوسیست و ایندکس فراگمنته شدن DNA در گروه های تجربی و شاهد مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج نشان داد که درصد موش های پلاک مثبت در گروه در معرض میدان (۵۰٪) نسبت به گروه شاهد (۶۷/۵٪) کاهش یافته ولی این کاهش از نظر آماری معنی دار نبود. میانگین تعداد جنین در گروه کنترل  $4/8 \pm 9$  و در گروه تجربی  $5/7 \pm 5/5$  بود. آزمون آماری اختلاف معنی داری را بین میانگین رتبه ای دو گروه نشان داد ( $P < 0/03$ ). تعداد بلاستومرها در گروه در معرض میدان  $45/94 \pm 7/30$  و در گروه شاهد  $48/3 \pm 7/2$  است ولی این کاهش معنی دار نبود. ایندکس فراگمنته شدن DNA در گروه شاهد  $7/14\%$  و در گروه تجربی  $10/53\%$  بود. که این افزایش از نظر آماری، معنی

دار بود  $P < 0/001$ .

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که میدان الکترومغناطیسی با فرکانس های بسیار پایین بر باروری موش های ماده و همچنین با افزایش میزان فراگمنته شدن DNA بر تکامل جنین آنها در مرحله قبل از لانه گزینی اثرات منفی دارد.

کلید واژه ها: میدان الکترومغناطیسی، بلاستوسیست موش، فراگمنته شدن DNA



## ۱-۱- مقدمه و اهمیت موضوع

زندگی روی زمین غوطه ور شدن در دریایی از میدان های الکترومغناطیس طبیعی است. این محیط طبیعی، به دلیل حضور طیف وسیع و درحال گسترش میدان های مصنوعی به شدت تغییر کرده است (۱) و امروزه بیشتر مردم در معرض میدان های الکترومغناطیسی منتشر شده از خطوط برق فشار قوی و دستگاه های الکتریکی می باشند. نتایج نشان می دهد، میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس بسیار پایین (ELF-EMF)<sup>۱</sup>، باعث ایجاد آسیب در ساختمان DNA و در نتیجه افزایش جهش های ژنتیکی می شوند (۲).

نتایج نشان داده است که انواع گوناگونی از محرک های آسیب رسان خفیف مثل گرما و پرتوها میتوانند آسیب های غیرقابل ترمیمی در DNA ایجاد کنند و این حالت به صورت خود به خود، مسیر خودکشی سلولی را فعال می نماید (۳). فراگمنته شدن DNA که از نظر مورفولوژیکی آپتوز نامیده میشود (۴)، مرگ سلولی برنامه ریزی شده است که در تکامل رویانی با حذف سلول های ناخواسته نقش مهمی را ایفا می نماید و این پدیده تحت تاثیر عوامل مختلف می تواند دچار تغییر گردد (۵). امروزه از روشی بنام TUNE<sup>۲</sup> برای رنگ آمیزی سلولهای آپتوتیک بطور رایج استفاده می شود در این روش حتی سلولهایی که در مراحل اولیه آپتوز هستند نشان دار می شوند (۴). ثابت شده است که این تکنیک در اندازه گیری کمی مرگ سلولی در جنین موش و انسان، که در آن تعداد سلول های کمی و بنابر این مقادیر کمی از DNA وجود دارد بسیار مفید است (۶ و ۷). با توجه به اطلاعات ما تاکنون مطالعه ای که ارتباط بین میدان های الکترومغناطیسی و میزان فراگمنته شدن DNA را در بلاستوسیت های حیوانی و انسانی نشان دهد، صورت نگرفته است. لذا هدف از این مطالعه این بود که اثرات نامطلوب میدان های الکترومغناطیسی با فرکانس های بسیار پایین بر میزان فراگمنته شدن DNA در بلاستوسیت های موش مورد بررسی قرار گیرد.

<sup>۱</sup> Extremely low-frequency electromagnetic fields

<sup>۲</sup> - TDT- Mediated dutp-biotin nick end labeling

## ۱-۲- کلیات

### ۱-۲-۱- پرتوهای الکترومغناطیس (Electromagnetic radiation)

پرتوهای الکترومغناطیس ترکیبی از یک میدان الکتریکی و یک میدان مغناطیسی (متغیر) است که عمود بر هم و در جهت عمود بر دو میدان در فضا انتشار می یابند. در حقیقت پرتوهای الکترومغناطیس انرژی هستند که به شکل میدان های نوسانی الکتریکی و مغناطیسی از نقطه ای به نقطه دیگر انتقال و انتشار می یابند به وجهی که این دو میدان علاوه بر عمود بودن در امتداد انتشار، بر یکدیگر نیز عمود می باشند؛ به این ترتیب شدت یا بزرگی (Magnitude)، هر دو میدان تابعی (Function) از زمان و مکان خواهد بود. بسیاری از تظاهرات فیزیکی مثل پرتوهای X و امواج ماورای بنفش، نور، پرتوهای مادون قرمز (Infrared) و سرانجام امواج رادیویی و رادار همگی از جنس پرتوهای الکترومغناطیس می باشند. از مهمترین ویژگی های پرتوهای الکترومغناطیس ماهیت دوگانه و مضاعف آنها است به این معنی که پرتوهای الکترومغناطیس هم دارای تظاهر و خاصیت موجی بوده و هم دارای خاصیت ذره ای که به ظاهر دو کیفیت یا دو ماهیت متضاد می نمایند (۸).

### الف) خاصیت موجی پرتوهای الکترومغناطیس:

پدیده های مهمی مانند تداخل (Interferenc)، تفرق (Diffraction)، انعکاس (Reflection) و سرانجام شکست یا انکسار (Refraction) پرتوهای الکترومغناطیس، خاصیت موجی آنها را آشکارا محقق می سازند. با توجه به ساختمان پرتوهای الکترومغناطیس، این پرتوها جزء امواج متقاطع یا عرضی (Transvers) محسوب می گردند. زیرا امتداد ارتعاش عمود بر جهت انتشار می باشد. در خصوص پرتوهای الکترومغناطیس، دو میدان نوسان الکتریکی و مغناطیسی عمود بر جهت انتشار پرتو یا موج الکترومغناطیس است و در عین آن که دو میدان بر یکدیگر عمود می باشند انتقال امواج الکترومغناطیس برخلاف سایر امواج احتیاج به ماده واسط (Medium) ندارد و به همین علت از خلاء عبور می نماید. به طور کلی امواج و پرتوهای الکترومغناطیس دارای ۴ مشخصه اصلی به شرح زیر می باشند (۸):

۱- طول موج ( $\lambda$ , Wave length): فاصله نقاط مشابه (هم ارز) در موج، مثلا فاصله دو ماکزیمم یا مینیمم متوالی را

طول موج می نامند. طول موج پرتو، تابع انرژی آن است و واحد آن نیز واحد طول است.

۲- فرکانس ( $\nu$ , Frequency): عبارت است از تعداد نوسانات کامل یا تعداد سیکل ها در ثانیه

۳- سرعت ( $c$ , Velocity): مسافتی است که موج در مدت یک ثانیه می پیماید. همانطور که می دانیم همه پرتوهای

الکترومغناطیسی سرعت ثابتی دارند که همان سرعت نور ( $c$ ) یعنی  $300/000$  کیلومتر یا  $186000$  مایل در ثانیه در

خلاء می باشد.

۴- دامنه ( $\alpha$ , Amplitude): در واقع قدرت (نیرومندی) موج را مشخص می نماید.

### ب) خاصیت ذره ای پرتوهای الکترومغناطیس:

همانطور که قبلا اشاره شد، پرتوهای الکترومغناطیس در عین خاصیت موجی، دارای خاصیت ذره ای نیز می باشند و این به آن معنی است که پرتوهای الکترومغناطیس را می توان به صورت گلوله های ریز که با سرعت نور در حرکتند و مقدار معینی انرژی را حمل می کنند، در نظر گرفت؛ در حقیقت این گلوله ها چیزی جز بسته های انرژی نیستند و هر بسته انرژی را یک کوانتوم (Quantum) یا یک فوتون می نامند. به زبان علمی تر " فوتون "، یک کوانتوم انرژی تشعشی است و انرژی که به یک پرتو نسبت داده می شود، انرژی است که یک فوتون دارد (۸).

### طیف الکترومغناطیس

طیف الکترومغناطیس شامل تمام امواج الکترومغناطیسی است که بر اساس فرکانس و طول موج تقسیم بندی شده اند. این طیف شامل نور مرئی، مادون قرمز، امواج میکروویو، امواج رادیویی و اشعه X می باشد. خورشید، زمین و دیگر اجسام امواج الکترومغناطیس را در طول موج های مختلف تابش می کنند. نکته با اهمیت در طیف الکترومغناطیس آن است که مناطق مختلف به صورت یک خط کاملا مشخص از یکدیگر جدا نمی شوند، بلکه لبه های مناطق بر روی هم قرار می گیرند (Overlap)، در نتیجه تغییرات ناگهانی در خصوصیات و ویژگی های هر منطقه نسبت به مناطق مجاور خود رخ نمی دهد؛ به عبارت کاملتر وقتی از منطقه امواج رادیویی به منطقه مادون قرمز یا از منطقه ماوراء بنفش به منطقه اشعه X حرکت نماییم، تغییرات تدریجی اند (۸). در فرکانس های بالای طیف، مانند uv و X-ray فوتون ها انرژی قابل ملاحظه ای برای شکستن پیوندهای شیمیایی دارند؛ این شکسته شدن باندها، یونیزاسیون نامیده می شود و این قسمت از طیف تحت عنوان یونیزان خوانده می شود. در فرکانس های پایین مانند نور قابل رویت MV و RF، انرژی یک فوتون برای جدا کردن باندهای شیمیایی خیلی پایین است و این قسمت از طیف الکترومغناطیس، غیر یونیزان خوانده می شود. بنابر این اثرات بیولوژیک امواج الکترومغناطیس را می توان به دو قسمت زیر تقسیم کرد:

۱- بخش تابشی یونیزان، جایی که آسیب شیمیایی به صورت مستقیم روی می دهد. مثل X-ray.

۲- بخش تابش غیر یونیزان که خود به زیر گروه هایی تقسیم می شود.

الف) بخش تابش نوری که تحریک الکترونی می تواند روی دهد (مثل نور قابل رویت و مادون قرمز)

ب) بخشی که طول موج کوتاهتر از بدن می باشد و گرما بوجود می آید (مثل MV-RF با فرکانس بالا)

ج) بخشی که طول موج بلندتر از بدن است و گرما به ندرت بوجود می آید (مانند RF با فرکانس پایین - فرکانس های قوی میدان های ثابت) (۹).

واحدهای مورد استفاده برای اندازه گیری میدان های مغناطیسی ثابت به شرح زیر می باشد (۹):

$$1T = 1000 \text{ mT}$$

$$1 \text{ Mt} = 1000 \text{ micro T}$$

$$1G = 100 \text{ micro T}$$

$$10G = 1 \text{ m T}$$

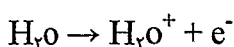
### ۱-۲-۲- مکانیسم اثر میدان های الکترومغناطیس:

در مورد مکانیسم اثر میدان های الکترومغناطیس نیز مطالعات متعددی صورت گرفته و فرضیه هایی ارائه شده است. این فرضیات بیان می کند که تشعشع ها را می توان به دو دسته یونیزان مستقیم و غیر مستقیم تقسیم کرد. ذرات باردار مانند پروتون، نوترون و الکترون پوزیترون، پرتوهای یونیزان مستقیم هستند. یعنی هر ذره دارای انرژی جنبشی کافی است، به طوری که مستقیماً می تواند ساختمان اتمی ماده جاذبی را که از آن عبور می کند، شکسته و در آن تغییر شیمیایی و بیولوژیکی ایجاد کند؛ ولی تشعشعات الکترومغناطیس، پرتوهای یونیزان غیرمستقیم هستند. این پرتوها خود ایجاد صدمات شیمیایی و بیولوژیکی نمی کنند، بلکه در حین عبور از ماده جاذب، انرژی جنبشی خود را از دست داده و تولید ذرات باردار سریع (الکترون های سریع) می کنند. پدیده جذب اشعه های یونیزان غیر مستقیم بستگی به انرژی فوتون مورد نظر و ترکیبات شیمیایی ماده جاذب دارد. وقتی یک فوتون با الکترون مداری یک اتم جاذب برخورد می کند؛ فوتون با الکترونی که معمولاً الکترون آزاد نامیده می شود، برخورد می کند و قسمتی از انرژی فوتون به صورت انرژی جنبشی به الکترون انتقال داده می شود. فوتون با انرژی باقیمانده، احتمالاً با انحراف از مسیر اصلی به راه خود ادامه می دهد. در محل وقوع برخورد فوتون، یک الکترون سریع و یک فوتون با انرژی تقلیل یافته وجود دارند که ممکن است در برخوردهای بیشتری شرکت کنند. در هر حالت فوتون، مقدار کم یا زیادی انرژی از دست می دهد. در واقع کاهش انرژی فوتون از نقطه ای به نقطه دیگر، ممکن است از صفر تا ۸۰ درصد متغیر باشد. در عمل، وقتی شعاعی از پرتو، توسط نسجی جذب می شود، تعداد بسیار زیادی از فوتون ها، با تعداد بی شماری از اتم ها برخورد کرده و بر مبنای آماری، امکان از دست دادن انرژی به هر طریقی وجود دارد. نتیجه این برخوردها تولید تعداد زیادی الکترون های سریع است که بسیاری از آنها قادر به یونیزه کردن اتم های دیگر ماده جاذب و شکستن باندهای شیمیایی حیاتی هستند؛ بدین ترتیب وقایع زنجیره ای که منتهی به صدمات بیولوژیکی می شود، شروع می گردد. وقتی که پرتو جذب مواد حیاتی می شود، انرژی در سلول ها و بافت ها ذخیره می

شود. این انرژی پخش نمی شود بلکه به صورت بسته های جداگانه ای باقی می ماند. مقدار بسیاری از انرژی به قسمت هایی از بعضی سلول ها منتقل می شود و اگر باقی بماند، کمی به سلول های دیگر منتقل می شود. انرژی به صورت بسته های بزرگ جداگانه قادر است یک باند شیمیایی را بشکند و زنجیره ای از وقایع را که تغییرات بیولوژیکی هستند، شروع نمایند. اختلاف اساسی بین پرتوهای یونیزان و غیر یونیزان در اندازه انرژی بسته های منفرد (فوتون ها) می باشد و نه در کل انرژی (۹).

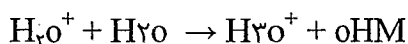
### عمل مستقیم و غیر مستقیم تشعشع:

DNA در کروموزوم ها نماینده بحرانی ترین هدف است، اما اهمیت غشای هسته را نیز نباید از نظر دور داشت، در سلول مناطقی وجود دارد که قبل از کشته شدن سلول می بایستی آسیب ببینند. هنگامی که شکلی از تشعشع در مواد بیولوژیکی جذب می شوند، این امکان وجود دارد که به طور مستقیم با هدف های بحرانی در سلول برخورد کند. اتم های خود هدف نیز ممکن است یونیزه یا تهییج شوند. بنابراین زنجیره ای از وقایع که منتهی به تغییرات بیولوژیکی می شود، شروع می گردد. این پدیده، عمل مستقیم تشعشع نامیده می شود. به تناوب، اشعه ممکن است با اتم ها یا مولکول های دیگر (بخصوص آب) برخورد کرده و رادیکال های آزاد ایجاد کند. این رادیکال های آزاد با رساندن خود به هدف های حساس قادر به نفوذ و ایجاد آسیب هستند. این پدیده، عمل غیر مستقیم تشعشع نامیده می شود. رادیکال های آزاد، یک اتم یا مولکول آزاد (ترکیب نشده) حامل یک الکترون مداری جفت نشده است. یک الکترون مداری نه تنها به دور هسته می چرخد، بلکه به دور محور خود نیز در گردش است. این گردش الکترون ممکن است در جهت عقربه ساعت یا عکس آن باشد. در یک اتم، یا مولکول با یک جفت الکترون، گردش ها به صورت زوجی انجام می گیرد. یعنی برای هر الکترون در حال گردش در جهت عقربه ساعت، یک الکترون در جهت عکس حرکت عقربه ساعت نیز در گردش است. صرف نظر از اینکه اتم یا مولکول از نظر الکتریکی خنثی یا باردار (یونیزه) باشد، این حالت باعث ثبات شیمیایی زیادی می شود. در یک اتم، یا مولکول با تعداد الکترون های فرد، یک الکترون تنها وجود دارد و الکترون دیگری وجود ندارد تا چرخش عکس آن را انجام دهد؛ این یک الکترون جفت نشده است. صرف نظر از اینکه اتم یا مولکول از نظر الکتریکی خنثی یا باردار باشد، این وضعیت همراه با قابلیت ترکیب شیمیایی زیادی می باشد. برای سهولت درک مطلب چون ۸۰ درصد سلول از آب تشکیل شده است، آنچه که در برخورد اشعه با مولکول آب، انجام می گیرد را در نظر می گیریم. در نتیجه برخورد یک فوتون یا یک ذره باردار مثل یک الکترون، یا پروتون، ممکن است مولکول آب یونیزه شود. این رویداد را می توان با معادله زیر نشان داد:

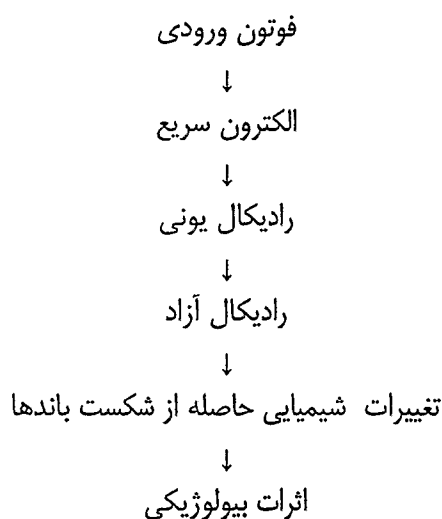


$H_2O^+$  یک رادیکال یونی است. «یون» اتمی می باشد که دارای بار الکتریکی است؛ زیرا یک الکترون خود را از دست داده است. یک «رادیکال آزاد» شامل یک الکترون جفت نشده در پوسته خارجی خود است؛ در نتیجه از نظر واکنش شیمیایی بسیار فعال می باشد.  $H_2O^+$  هم باردار است و هم دارای الکترون جفت نشده می باشد، یعنی هم یون و هم رادیکال آزاد است (۱۰).

از آنجایی که در زیست شناسی پرتوی، رادیکال های آزاد اهمیت بسیار دارند، بحث و توضیح بیشتری روی آن انجام می شود. از تجزیه رادیکال های یونی «رادیکال های آزاد» تشکیل می شود که باردار نیستند، اما هنوز دارای الکترون جفت نشده هستند. در مورد آب از واکنش رادیکال یونی با یک مولکول دیگر آب، رادیکال هیدروکسیل ( $OH^\bullet$ ) که بسیار فعال است تولید می شود.



$OH^\bullet$  مجموعاً دارای ۹ الکترون می باشد، بنابراین یکی از آنها جفت نشده است. رادیکال هیدروکسیل یک رادیکال آزاد بسیار فعال است که می تواند در فواصل کمی در سلول نفوذ کند و به هدف حساس سلول برسد. به طوری که تصور می شود، رادیکال آزاد می تواند به اندازه استوانه ای به شعاع ۲۰ آنگستروم در DNA نفوذ کند. حدس زده می شود که ۷۵ درصد صدمات حاصله از پرتوها به DNA در سلول های پستانداران در اثر رادیکال آزاد  $OH^\bullet$  می باشد. البته در عمل مستقیم پرتو، این وضعیت حتی در آب نیز بسیار پیچیده است و زمانی که مواد جاذب متشکل از مواد بیولوژیکی متعددی باشند، پیچیده تر خواهد شد. در عمل غیر مستقیم پرتو، زنجیره وقایع از جذب فوتون تا تغییر بیولوژیکی مشاهده شده نهایی را می توان به صورت زیر خلاصه کرد:

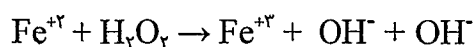


در مدت زمان لازم برای ایجاد وقایع گوناگون، اختلاف های فاحشی وجود دارد. رادیکال های یونی دارای عمر کوتاه در حدود  $10^{-10}$  ثانیه و رادیکال های آزاد شاید  $10^{-5}$  ثانیه هستند. در حالی که مرحله بین شکست باندهای شیمیایی و ظهور اثر بیولوژیکی ممکن است روزها، ماه ها و یا سال ها نسبت به نوع عارضه به طول بیانجامد (۱۰). گذشته از این،

ریشه های آزاد باعث بروز واکنش های خود تجزیه ای می شوند که در نتیجه آن، مولکول هایی که وارد واکنش شده اند به ریشه های آزاد تبدیل می شوند و به این ترتیب زنجیره آسیب را گسترش می دهند. ریشه های آزاد ممکن است ابتدا از انرژی تشعشعی (مثل نور فرابنفش و یا اشعه ایکس) و یا واکنش های اکسیداسیون و احیایی که در خلال فرآیندهای فیزیولوژیک طبیعی روی می دهند، ایجاد شوند یا اینکه ممکن است این ریشه ها در نتیجه سوخت و ساز مواد شیمیایی توسط آنزیم ها ایجاد شوند. انرژی تشعشعی می تواند آب را تجزیه و ریشه های OH (یون هیدروکسیل) و H<sup>•</sup> تولید کند. یون هیدروکسیل بسیار سمی است، این یون قادر به ایجاد اثرات بیولوژیک مولکولی است و باعث شکست و تغییر اساسی در DNA و کراس لینک های اسیدهای نوکلئیک و پروتئین ها، غیر فعال کردن آنزیم ها و پراکسیداسیون چربی ها می شود. بنابراین می تواند در فرآیندهای رشد و تکامل سلول دخالت کند. قرارگیری در معرض ترکیبات متعدد شیمیایی و اشعه های غیر یونیزان باعث تولید رادیکال های آزاد در سلول می شود (۱۱).

یافته های اخیر در رابطه با مولکول های ناپایدار و کوچک (NO) نیتریک اکسید به عنوان مدیاتور (واسطه) فیزیولوژیکی، اهمیت رادیکال های آزاد اکسیژن را در سیستم های بیولوژیکی نشان داده است. NO یک نوروترانسمیتر در تنظیم جریان خون شریانی مغز است که به عنوان یک عامل مؤثر در پاتوژنز بیماری آلزایمر شناخته شده است (۱۱ و ۱۲).

ریشه آزاد دیگری که می تواند در نتیجه احیاء اکسیژن مولکولی پدید آید، ریشه سوپراکسید (O<sub>۲</sub><sup>•</sup>) است. روش طبیعی این است که اکسیژن به آب احیاء شود ولی در برخی از واکنش هایی که در آن اکسیدازها (مثل گزانتین اکسیداز) وارد عمل می شوند (درمیتوکندری ها، لیزوزوم ها و غشاء پلاسمایی)، O<sub>۲</sub><sup>•</sup> ایجاد می شود. برخی فلزات مثل آهن و مس، فلزات انتقالی نامیده می شوند؛ چون قادرند ظرفیت شیمیایی خود را تغییر دهند. بنابراین در خلال انتقال یا الکترون هایی آزاد می کنند یا می گیرند؛ در نتیجه تشکیل ریشه های آزاد را تسریع می کنند. چنین موردی را می توان در واکنش فنتون (Fenton) مشاهده کرد:



به این ترتیب آهن در آزار ناشی از اکسیژن، ماده سمی مهمی به شمار می رود؛ چرا که OH<sup>-</sup> تولید شده بسیار سمی است. با این وجود آهن آزاد به شکل فریک (Fe<sup>+۳</sup>) است؛ ولی می تواند به شکل فروری خود (Fe<sup>+۲</sup>) احیاء شده و در واکنش فنتون دخالت نماید. در این مورد می توان فرض کرد که امواج میکروویو یک فرآیند با واسطه آهن است که تشکیل هیدروکسیل رادیکال آزاد را در سلول افزایش می دهد و منجر به شکست باندهای DNA و تغییرات سلولی می شود. سلول هایی با قدرت جذب بالای آهن، به عنوان مثال بررسی سلول های درحال تکثیر، بیشترین زمان آسیب پذیری در طول فاز G/S از سیکل سلولی است یعنی زمانی که رسپتورهای ترانسفرین بیان شده و آهن به مقدار زیادی نفوذ می کند. رادیکال های آزاد

مقدار زیادی از پراکسید هیدروژن را از طریق واکنش فنتون در حضور آهن تولید می کنند. سلول ها با نسبت متابولیکی بالا مقدار زیادی پراکسید هیدروژن را از طریق انتقال الکترون میتوکندری تولید می کنند؛ بنابراین بیشتر به اثرات میدان های الکترومغناطیس آسیب پذیر می شوند. از طرف دیگر اثرات سوء میدان های الکترومغناطیس بستگی به توانایی سلول ها در ذخیره آهن به شکل فریتین دارد؛ برای مثال سلول های کبدی نسبت به اثرات میدان های الکترومغناطیس حساسیت کمتری دارند؛ حتی زمانی که ورودی آهن زیادی داشته باشند؛ زیرا آنها دارای مقدار زیادی از فریتین هستند. سلول های سرطانی با داشتن گیرنده های ترانسفرین زیاد در سطح خود شناخته می شوند و در نتیجه مقدار جذب آهن بالایی دارند (۱۳).

آثار رادیکال های آزاد بسیار وسیع و گسترده است؛ ولی چهار واکنش وجود دارد که بالاخص با آزار سلولی در ارتباط است: (۱) پراکسیداسیون چربی های غشاء: ریشه های آزاد در حضور اکسیژن می توانند باعث پراکسیداسیون چربی های درون پلاسما و غشاء اندامک ها و آسیب به شبکه رتیکولوم اندوپلاسمیک و میتوکندری ها و سایر اجزاء میکروزومی شوند. چربی های اشباع نشده مثل چربی هایی که در غشاءها وجود دارند، دارای پیوندهای دو گانه بین برخی از اتم های کربن خود هستند. این پیوندها در برابر تهاجم ریشه های آزاد مشتق از اکسیژن آسیب پذیرند. فعل و انفعالاتی که بین ریشه ها و چربی ها روی می دهند، پراکسیدهایی پدید می آورند که ناپایدار و واکنش دهنده هستند. بنابراین واکنش های زنجیره ای خود تجزیه ای پدید می آید که منجر به آسیب وسیع غشاءها، اندامک ها و خود سلول می شوند.

(۲) آسیب به میتو کندری ها: این اثر ارتباطی با پراکسیداسیون چربی ها ندارد ولی باعث از دست رفتن عملکرد میتوکندری ها شده و درست همان آثار هایپوکسی را بر روی میتوکندری ها بروز می دهد.

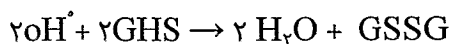
(۳) ضایعات DNA: واکنش هایی که بر روی تیمین انجام می شوند، منجر به شکستن یکی از رشته های DNA می شود. آسیب به DNA نیز باعث مرگ سلول و یا تبدیل ماهیت آن به سلول بدخیم می شود.

(۴) ایجاد پیوندهای عرضی در پروتئین ها: ایجاد پیوند های عرضی در اسیدهای آمینه ناپایداری چون متیونین، هیستیدین، سیستئین و لیزین باعث آسیب به تمامی سلول و بالاخص آنزیم های غیرفعالی مانند آنزیم های سولفیدریل می شود. ریشه های آزاد ممکن است خودبخود از میان بروند؛ برای مثال پراکسید چون ناپایدار است به طور کامل تجزیه و به اکسیژن و پراکسید هیدروژن تبدیل می شود. سرعت این تجزیه را فعالیت کاتالیک سوپراکسید دیسموتازها (SOD) که در بسیاری از انواع سلول ها یافت می شوند، به میزان قابل توجهی افزایش می دهند.





تعداد دیگری از آنزیم ها مثل (گلوکوتیون پراکسیداز) از سلول در مقابل ریشه های آزاد محافظت می کنند.



از نظر تکامل این آنزیم ها ممکن است برای حفاظت سلول ها از گزند و آزار ریشه های آزاد، خود را به حد اعلی رسانده باشند. از سوی دیگر ضد اکسیدان های برونزاد و یا درونزاد مثل ویتامین E، سولفیدریل چون سیستئین یا گلوکوتیون و سرولوپلاسمین نیز ممکن است باعث توقف مرحله شروع تشکیل ریشه های آزاد و یا غیر فعال کردن آن ها شوند (۱۴).  
بر اساس مطالعات انجام شده پرتوهایی که خاصیت یونسازی ندارند می توانند اثرات سوء بر سلامت انسان داشته باشند به عنوان مثال افرادی که در اطراف کابل فشار قوی کار می کنند، می توانند به عوارضی مانند سر درد، فشارهای عصبی، خستگی و اضطراب و استرس مبتلا شوند (۱۵). همان طور که پیشتر ذکر شد، انواع گوناگونی از محرک های آسیب زای خفیف مثل گرما و پرتوها میتوانند آسیب های غیرقابل ترمیمی در DNA ایجاد کنند و این حالت نیز به صورت خود بخود مسیر خودکشی سلولی را فعال می نماید (۴). خود کشی یا مرگ برنامه ریزی شده سلول که در لاتین آپوپتوزیس گفته می شود، پدیده بیولوژیکی مهمی است که در ادامه به تفصیل شرح داده می شود.

### ۱-۳-۳- پدیده آپوپتوز

آپوپتوز، اولین بار در سال ۱۹۷۲ میلادی شناخته شد و در متون زیست شناسی و پزشکی برای بیان شیوه جداگانه ای از مرگ سلولی برای از دست دادن سلول در بافت های زنده مطرح شد و به خاطر نمای مورفولوژیک خاص خود آپوپتوز نام گرفت (۱۵)، که در زبان یونانی به معنای ریختن و افتادن برگ درخت است. آپوپتوز شکلی از مرگ سلولی است که طی آن سلول های ناخواسته میزبان، به دنبال فعالیت هماهنگ و برنامه ریزی شده سلسله ای از وقایع، که توسط مجموعه دقیقی از ژن ها کنترل می شوند، از بین می روند. اگرچه آپوپتوز یک واقعه مورفولوژیک است که همیشه نمی توان آن را مطابق با تعریف عملکردی "مرگ برنامه ریزی شده سلول" که توسط جنین شناسان بکار می رود دانست، با این حال هر دو بیان، بطور رایجی توسط اکثر محققین هم معنی، انگاشته می شوند (۱۶).

♦ ویژگی های میکروسکوپی: ویژگی های میکروسکوپی زیر که تعدادی از آن ها با میکروسکوپ الکترونی بهتر قابل

مشاهده هستند، مشخصه آپوپتوز هستند (۱۵، ۱۷ و ۱۸).

چروکیده شدن سلول یکی از مشخصات بارز آپوپتوزیس است. سلول از نظر اندازه کوچک شده، سیتوپلاسم متراکم گشته و ارگانل ها، اگرچه نسبتاً طبیعی هستند ولی بصورت متراکم تری قرار می گیرند.

مشخص‌ترین ویژگی آپوپتوز تراکم کروماتین می‌باشد. کروماتین، به‌طور محیطی در زیر غشاء هسته تجمع می‌یابد و بصورت توده‌های متراکم با حدود مشخص و به اشکال و اندازه‌های مختلف دیده می‌شود. هسته ممکن است تخریب شده و به دو یا چند قطعه تقسیم شود. در مرحله بعد سلول‌های آپوپتوتیک در ابتدا حباب‌های زیادی را در سطح خود نشان می‌دهند، سپس بصورت چندین جسم آپوپتوتیک وابسته به غشاء، قطعه‌قطعه می‌شوند، که از سیتوپلاسم و ارگانل‌های درهم فشرده، با یا بدون قطعات هسته، تشکیل شده‌اند.

فاگوسیتوز سلول‌ها یا اجسام آپوپتوتیک: اجسام آپوپتوتیک سریعاً توسط سلول‌های سالم پارانشیمی اطراف یا ماکروفاژها در لیزوزوم‌ها تخریب می‌شوند و سلول‌های مجاور با مهاجرت یا تکثیر، جای خالی سلول‌های آپوپتوتیک را پر می‌کنند. تصور می‌شود که غشاهای پلاسمایی در هنگام آپوپتوز، که تا مراحل آخر دست نخورده می‌مانند، نسبت به مواد محلول طبیعی داخل سلول نفوذپذیر می‌شوند. این توصیف کلاسیک در مورد آپوپتوز در طی شرایط فیزیولوژیک مثل دوره رویانی و حذف سلول‌های ایمنی صدق می‌کند.

◆ **ویژگی‌های بیوشیمیایی:** سلول‌های آپوپتوتیک، مجموعه‌ای از وقایع بیوشیمیایی را نشان می‌دهند که زمینه‌ساز تغییرات ساختمانی پاتولوژیک است که بعضی از این ویژگی‌ها ممکن است در سلول‌های نکروتیک نیز مشاهده شوند؛ با این حال مابقی تغییرات بیشتر، اختصاصی هستند (۱۵، ۱۶، ۱۷ و ۱۸). این ویژگی‌ها عبارتند از:

۱ - **شکست پروتئینی:** یکی از ویژگی‌های خاص آپوپتوز، هیدرولیز پروتئینی است که لازمه آن فعال شدن چندین عضو از یک خانواده پروتئین‌های سیستئینی، به نام کاسپازها است. تجزیه داربست هسته‌ای و پروتئین‌های اسکلت سلولی (همراه پیوندهای پروتئینی) توسط کاسپازها، زمینه‌ساز تغییرات ساختمانی هسته‌ای و سیتوپلاسمی است که در سلول‌های آپوپتوتیک مشاهده می‌شوند. فعالیت کاسپاز، همچنین اندونوکلازها را فعال می‌کند.

۲ - **پیوندهای متقاطع پروتئینی:** ایجاد پیوندهای متقاطع پروتئینی توسط فعالیت ترانس گلوتامیناز، باعث تبدیل پروتئین‌های سیتوپلاسمی به پوسته چروکیده‌ای می‌شوند که با پیوندهای کوالان به هم متصلند. این پوسته ممکن است بصورت اجسام آپوپتوتیک بشکند.

۳ - **شکست DNA:** سلول‌های آپوپتوتیک نوع خاصی از شکست DNA را نشان می‌دهند، بدین صورت که DNA بوسیله یک اندونوکلاز وابسته به یون کلسیم و منیزیم، به قطعات بزرگ ۵۰ تا ۳۰۰ کیلوبازی می‌شکند.

۴ - **شناسایی فاگوسیستی:** سلول‌های آپوپتوتیک، فسفاتیدیل سرین را در لایه خارجی غشاء پلاسمایی خود بروز می‌دهند، چرا که فسفولیپیدها از لایه داخلی بیرون می‌آیند. در بعضی از انواع آپوپتوز، ترمبوسپوندین که یک گلیکوپروتئین

اتصال است، بر سطح اجسام آپوتوتیک بارز می‌شود. این تغییرات اجازه می‌دهد که سلول‌های مرده سریعاً توسط ماکروفاژها و سلول‌های سالم اطراف برای فاگوسیتوز شناسایی بشوند، بدون اینکه اجزاء پیش‌آماسی سلولی در محیط آزاد شوند. بدین ترتیب، در طی پاسخ آپوتوتیک، سلول‌ها با کمترین صدمه به بافت‌های اطراف، از میان برداشته می‌شوند (۱۹ و ۲۰).

◆ **مکانیسم‌ها:** با بررسی وضعیت‌هایی که در آن آپوتوز رخ می‌دهد می‌توان نتیجه گرفت که آپوتوز بدنال تعدادی از پیام‌های آغاز کننده مرگ شروع می‌شود که از فقدان عوامل رشد یا هورمون‌ها، و یک کنش و واکنش لیگاند-گیرنده، تا عوامل آزاررسان خاص متفاوتند. علاوه بر این، ارتباط هماهنگ اما اغلب معکوسی بین رشد سلولی و آپوتوز وجود دارد. آپوتوز در تنظیم تراکم جمعیت سلول‌های طبیعی اهمیت خاصی دارد و مهار مرگ سلولی ناشی از آپوتوز شاخص مهمی در تعیین رشد سرطان است. به این دلایل ساز و کارهای آپوتوز، موضوع تحقیقات وسیعی هستند. آپوتوز، نقطه انتهایی یک سلسله وقایع مولکولی وابسته به انرژی است، که توسط محرک‌های خاصی ایجاد می‌شود و شامل چهار مرحله مجزا است که تا حدی با یکدیگر همپوشانی دارند (۲۱، ۲۲ و ۲۳).

۱ - مسیرهای پیام‌رسانی که آپوتوز را شروع می‌کنند (۱۷ و ۱۹).

۲ - کنترل و یکی شدن، که طی آن مولکول‌های داخل سلولی تنظیم کننده مثبت و منفی، آپوتوز را تحریک، مهار یا در مرحله‌ای متوقف کرده و بنابراین ماحصل کار را تعیین می‌کنند.

۳ - یک مرحله اجرایی مشترک، شامل برنامه‌های مرگ که بطور عمده توسط پروتئازهای خانواده کاسپاز انجام می‌پذیرد.

۴ - برداشت سلول‌های مرده توسط فاگوسیتوز.

مسیرهای پیام‌رسانی: محرک‌های آپوتوتیک، پیام‌هایی تولید می‌کنند که یا از طریق غشاء پلاسمایی به مولکول‌های تنظیمی داخل سلولی منتقل می‌شوند و یا به صورت مستقیم روی اهداف خود در داخل سلول عمل می‌کنند. پیام‌های عبور کننده از غشا (Transmembrane)، ممکن است تعیین کننده‌های مثبت یا منفی آپوتوز باشند. بطور مثال، هورمون‌های خاص، عوامل رشد و سایتوکین‌ها، آبخاری از وقایع انتقال پیام به راه می‌اندازند که برنامه‌های مرگ از قبل موجود را سرکوب کرده و در واقع محرک‌های بقای طبیعی هستند. برعکس، عدم وجود بعضی از این عوامل منجر به عدم مهار برنامه‌های مرگ و در نتیجه باعث آغاز آپوتوز خواهد شد. دیگر تنظیم کننده‌های مثبت آپوتوز، کنش و واکنش لیگاند - گیرنده در سطح غشاء پلاسمایی است که پیام‌هایی در جهت فعال کردن برنامه‌های مرگ می‌فرستند. مورفوزن‌ها، عوامل رشد و عوامل تمایز که همگی در تکامل رویانی دخالت دارند، ممکن است بعنوان تنظیم کننده‌های مثبت یا منفی عمل کنند.

مرحله کنترل و یکی شدن: این مرحله توسط پروتئین‌های خاصی که پیام‌های مرگ را به برنامه‌های اجرایی ارتباط می‌دهند، صورت می‌گیرد. این پروتئین‌ها از اهمیت خاصی برخوردار هستند، چرا که فعالیت آنها ممکن است یا منجر به تعهد (یعنی تصمیم غیر قابل برگشت به مرگ سلول) یا به از بین رفتن پیام‌های بالقوه کشنده شود. پروتئین‌های درگیر در این تنظیم اهمیت بالینی زیادی دارند. بدین صورت که با تصمیم‌گیری در مورد مرگ یا زندگی اجتماعات سلولی شرکت کننده در فرآیندهای مهم بیولوژیک (مثل پاسخ‌های ایمنی یا سرطان) می‌توانند نتیجه نهایی بیماری را تعیین کنند.

مرحله اجرایی: این مرحله از آپوپتوز، قسمت نهایی است و در واقع یک آبشار پروتئولیتیک است که در آن مکانیسم‌های پیام‌رسانی و تنظیمی متعددی شرکت دارند. در این مرحله علیرغم تفاوت‌های موجود، وجوهی نیز وجود دارد که بین انواع آپوپتوز مشترک هستند. پروتئازهایی که مرحله اجرایی را آغاز کرده و آنرا به انجام می‌رسانند، در میان گونه‌های مختلف جانوران بسیار شبیه یکدیگر هستند و همانطور که قبلاً گفته شد، به خانواده کاسپاز تعلق دارند. خانواده کاسپاز امروزه، بیشتر از ده عضو دارد و می‌توان آنها را از نظر عملکردی به دو گروه اصلی، آغازگران و اجرا کنندگان تقسیم کرد. شبیه بسیاری از پروتئازها، کاسپازها بصورت زیموژن هستند و برای آغاز آپوپتوز حتماً باید شکسته شوند تا فعال گردند. کاسپازها، محلی برای شکسته شدن دارند که نه تنها توسط دیگر کاسپازها، بلکه بطور اتوکاتالیتیک هم هیدرولیز می‌شوند. بعد از اینکه یک کاسپاز آغازگر فعال شد، برنامه مرگ آنزیماتیک با فعالیتی سریع و متوالی آغاز می‌شود. کاسپازهای اجرایی با شکستن پروتئین‌های اسکلت سلولی و ماتریکس هسته‌ای، اسکلت سلولی را تخریب می‌کنند (۱۹، ۲۰، ۲۱ و ۲۲).

برداشت سلول‌های مرده: سلول‌های آپوپتوتیک و قطعات آنها، مولکول‌های شاخصی بر سطح خود دارند که تشخیص سریع آن‌ها را توسط سلول‌های مجاور و یا بیگانه‌خوارها تسهیل می‌کند تا طی عمل بیگانه‌خواری از محیط خارج شوند. این فرآیند به حدی مؤثر است که سلول‌های مرده، بدون باقی گذاشتن اثری ناپدید می‌شوند و هیچگونه آماسی بوجود نمی‌آید (۱۷ و ۱۹). به طور کلی تعداد سلولی و میزان آپوپتوزیس نشانه‌های مفیدی از سلامت و تکامل جنین می‌باشد. مرگ سلولی حتی در طول تکامل اولیه جنینی در حالت *in vivo* و *in vitro* اتفاق می‌افتد (۲۴). در بلاستوسیست‌های سالم، برخی از سلول‌ها بطور خودبخودی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (آپوپتوزیس) را طی می‌کنند که منجر به تنظیم تعداد سلولی یا حذف سلول‌های آسیب دیده، در طول تکامل جنینی می‌شوند (۲۵). علی‌رغم اثرات مفید آپوپتوزیس، در صورتی که تعداد و نسبت سلول‌های آپوپتوتیک افزایش یابد، ممکن است دارای اثرات مضر و مخرب باشد (۲۶). عوامل استرس‌زای محیطی نظیر افزایش PH داخل سلولی، محلول‌های سمی و نسبت‌های سمی یون کلسیم ممکن است منجر به آپوپتوز بلاستومرها شود (۲۷).