

Abberant Lymphocytes Rate after Gamma-Irradiation as a Biomarker of Breast Cancer

ARTICLE INFO

Article Type

Original research

Authors

Mojtahedi F.¹ MSc,
Pooladi A.² MD, PhD,
Sirati F.³ MD,
Keihani E.¹ MD,
Akhlaghpour Sh.⁴ MD,
Karimlou M.⁵ PhD,
Bagherizadeh I.² MSc,
Fallah M.¹ MSc,
Ghasemi Firouzabadi S.¹ MSc,
Behjati F.* PhD

How to cite this article

Mojtahedi F, Pooladi A, Sirati F, Kaihani E, Akhlaghpour Sh, Karimlou M, Bagherizadeh I, Fallah M, Ghasemi Firouzabadi S, Behjati F. Abberant Lymphocytes Rate after Gamma-Irradiation as a Biomarker of Breast Cancer. Sarem Journal of Reproductive Medicine. 2017;1(3):89-95.

*Genetic Research Center, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran

¹Genetic Research Center, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran

²"Sarem Fertility & Infertility Research Center (SAFIR)" and "Sarem Cell Research Center (SCRC)", Sarem Hospital, Tehran, Iran

³Surgery Department, Medicine Faculty, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Navid Medical Center, Tehran, Iran

⁵Statistics Department, Medicine Faculty, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran

Correspondence

Address: -

Phone: -

Fax: -

f_behjati@uswr.ac.ir

Article History

Received: August 28, 2015

Accepted: January 9, 2016

ePublished: August 15, 2017

ABSTRACT

Aims The use of non-invasive laboratory tests based on detection of biomarkers in the blood samples is a good strategy for early diagnosis of breast cancer. The lymphocyte radiosensitivity assessment can be a valuable method to diagnose breast cancer. The objective of this study was to investigate the radiosensitivity indices in sporadic breast cancer among Iranian women and to evaluate the potential of those indices for clinical use in early diagnosis of breast cancer and assessing its susceptibility.

Materials & Methods The present study is a case-control that was conducted on 32 patients with sporadic breast cancer (patient group) and 30 healthy individuals (control group). The obtained blood samples of both groups were exposed to gamma-irradiation (0.4 Gy) and the level of chromosome breakage was determined based on the G2 chromosome breakage assay protocol. In the metaphase lymphocytes, the percentage of the abnormal cells was calculated as the radiosensitivity index for comparing the two groups. Data were analyzed by SPSS 19 software using student t-test, paired t-test, chi-square and Fisher exact test.

Findings There was a significant difference in the percentage of the index of the abnormal cells after irradiation between two groups ($p=0.001$). The area under the curve (AUC) of the percentage of the abnormal cells and odds ratio (OR) were found as 0.725 with 3.818, respectively. The frequency of increased radiosensitivity based on this index (at 61% cut-off point), was 65.6% in the patients and about 33% in the control group.

Conclusion The increased level of chromosome breakage following irradiation with gamma rays can be used as an early diagnostic biomarker of breast cancer or a possible indicator for breast cancer susceptibility.

Keywords Breast Neoplasms; Gamma Irradiation; Chromosome Aberration; Chromosome Breakage; Biomarker

CITATION LINKS

[1] Understanding breast cancer risk -Where do we stand in ... [2] Causes of breast cancer and high-risk ... [3] Breast cancer screening beliefs by practice ... [4] Chromosome instability ... [5] Cancer ... [6] Cancer Patterns in the Middle East Special Report ... [7] Predisposition to cancer and ... [8] Chromosomal radiosensitivity: A study of the chromosomal G(2) assay in human blood lymphocytes indicating significant ... [9] The G2 ... [10] Is chromosome radiosensitivity and apoptotic response to irradiation correlated with cancer ... [11] Lymphocyte radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and implications for breast cancer ... [12] Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic ... [13] Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: A comparison of two ... [14] Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral ... [15] Heritability of cellular radiosensitivity ... [16] Nucleotide Excision Repair Syndromes ... [17] Xeroderma pigmentosum: A human disease in ... [18] Cytogenetic status of ataxia ... [19] Enhanced chromatid damage ... [20] Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a ... [21] Genotoxic effects of radiotherapy and ... [22] Chromosomes, cancer and ... [23] Chromosomal radiosensitivity in G2- phase lymphocytes identifies breast cancer ... [24] Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients ... [25] Deficient DNA repair capacity, apredisposing ... [26] Genetic predisposition in ... [27] Evaluating the effects of genetic variants ... [28] G2 checkpoint control and G2 chromosomal radiosensitivity ... [29] DNA repair capacity as a possible biomarker ... [30] Chromosomal radiosensitivity as a ... [31] Validation of the cell cycle G(2) ... [32] Chromosomal radiosensitivity in ... [33] G2-phase chromosomal radiosensitivity ... [34] Spontaneous and radiation-induced ... [35] Chromosomal radiosensitivity in head and neck cancer patients: Evidence for ...

میزان لنفوسیت‌های غیرطبیعی پس از پرتوتابی با اشعه گاما؛ به عنوان بیومارکر سرطان پستان

فروغ مجتهدی MSc

مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، تهران، ایران

آرش پولادی MD, PhD

"مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صرم" و "پژوهشکده سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صرم"، تهران، ایران

فریدون سیرتی MD

گروه جراحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

الهه کیهانی MD

مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، تهران، ایران

شهرام اخلاق‌پور MD

مرکز پرتو پزشکی نوید، تهران، ایران

مسعود کریم‌لو PhD

گروه آمار زیستی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، تهران، ایران

ایمان باقری‌زاده MSc

"پژوهشکده سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صرم" و "دپارتمان ژنتیک پزشکی صرم"، دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، تهران، ایران

معصومه فلاح MSc

مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، تهران، ایران

سافر قاسمی فیروزآبادی MSc

مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی، تهران، ایران

فرخنده بهجتی MD

"مرکز تحقیقات باروری و ناباروری صرم" و "پژوهشکده سلولی-مولکولی و سلول‌های بنیادی صرم"، تهران، ایران

چکیده

اهداف: یک راهکار مناسب برای تشخیص زودهنگام سرطان پستان استفاده از تست‌های آزمایشگاهی غیرتهاجمی است که بر پایه بررسی بیومارکرها در نمونه‌های خون است. نشانگرهای حساسیت پرتویی لنفوسیت‌ها می‌تواند یکی از این ابزارهای مفید باشند. پژوهش حاضر با هدف بررسی شاخص‌های حساسیت پرتویی در سرطان پستان غیرارثی در زنان ایرانی و ارزیابی امکان استفاده بالینی در تشخیص زودهنگام این بیماری و برآورد استعداد ابتلا به آن انجام شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش یک مطالعه مورد-شاهدی است که در آن ۳۲ فرد مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر (گروه بیمار) و ۳۰ فرد سالم (گروه کنترل) بررسی شدند. به‌منظور ارزیابی حساسیت کروموزومی، طبق برنامه بررسی شکست کروموزومی G₂، لنفوسیت‌های افراد دو گروه در معرض ۰/۴ گری پرتوی ۷ قرار گرفتند. در آنالیز میکروسکوپی لنفوسیت‌های متافازی برای بررسی حساسیت پرتوی از شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های T استیویدنت، T زوجی، مجذور کای و دقیق فیشر با کمک نرم‌افزار SPSS 19 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی پس از پرتودهی بین گروه‌های بیمار و کنترل اختلاف معنی‌داری نداشت (p=۰/۰۰۱). در منحنی ROC، سطح زیر منحنی (AUC) و نسبت شانس (OR) برای شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی به‌ترتیب ۰/۷۲۵ و ۳/۸۱۸ بودند. فراوانی حساسیت به پرتو بر مبنای شاخص اخیر (در حد مرزی ۶۱٪ سلول غیرطبیعی) در گروه بیمار ۶۵/۶٪ و در گروه کنترل حدوداً ۳۳٪ محاسبه شد.

نتیجه‌گیری: آزمون حساسیت کروموزومی در برابر پرتو، قابلیت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیص زودهنگام سرطان پستان یا شاخص احتمالی تعیین استعداد ابتلا به این بیماری را دارد.

کلیدواژه‌ها: سرطان پستان تک‌گیر، پرتوتابی گاما، میزان تغییرات کروموزوم لنفوسیتی، بررسی شکست کروموزومی G₂، زیست-نشانگر

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۴/۰۵

*نویسنده مسئول: f_behjati@uswr.ac.ir

مقدمه

سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی در زنان بوده^[1] و اولین عامل مرگ‌ومیر در زنان ۵۰ تا ۵۵ ساله در ایالات متحده است^[2]. طبق آمار اخیر ۱۲٪ (۱ در ۸ نفر) کلیه زنان ایالات متحده به این بدخیمی مبتلا هستند. سرطان پستان دومین عامل مرگ‌ومیر در زنان غربی است، به‌طوری که تقریباً ۳۰٪ زنان مبتلا می‌میرند^[2, 3]. براساس آخرین آمار انجمن ژنتیک ایالات متحده، ۱/۴ میلیون فرد جدید در سال ۲۰۰۷ به سرطان پستان مبتلا شده و ۵۵۹۰۰۰ نفر بیمار در این سال فوت کرده‌اند^[4]. در کشورهای در حال توسعه نیز فراوانی سرطان پستان در حال افزایش است^[5]. طبق گزارشی پیرامون میزان بروز سرطان در ایران در سال ۲۰۰۰، سرطان پستان شایع‌ترین نوع بدخیمی در میان زنان بوده و ۲۱/۴٪ کلیه بدخیمی‌ها در زنان است^[2]. در شهر تهران نیز سرطان پستان شایع‌ترین بدخیمی زنان (۲۵/۵٪ کلیه سرطان‌ها) گزارش شده است^[6]. طبق شاخص‌های بالینی و هیستولوژیک موجود برای طبقه‌بندی سرطان پستان و استفاده از روش‌های درمانی، فقط ۶۰٪ زنان مبتلا و بدون متاستاز برای مدت طولانی می‌توانند زنده بمانند، بنابراین ابزارهای تشخیصی زودهنگام و نیز طبقه‌بندی دقیق‌تر بیماران مبتلا براساس شاخص‌های جدید برای پیش‌بینی سیر پیشرفت بیماری و انتخاب برنامه درمانی دقیق لازم به نظر می‌رسد^[3]. آزمون‌های آزمایشگاهی از مهم‌ترین و کارآمدترین ابزارها هستند که براساس ارزیابی نشانگرهای موجود در مایعات در دسترس بدن مانند خون محیطی عمل می‌کنند، از جمله نشانگرهای عنوان‌شده، می‌توان به حساسیت پرتویی لنفوسیت‌ها اشاره کرد.

زمانی که مشخص شد که تعدادی از بیماری‌های ژنتیکی مستعدکننده سرطان مانند سندروم بلوم و سندروم‌های سرطانی تومور ویلمز تغییراتی واضح و شدید در حساسیت به اشعه و عوامل شیمیایی ژنوتوکسیک نشان می‌دهند، به حساسیت سلول‌های انسانی در مقابل اشعه توجه شد. این مدارک نشان‌دهنده بیماری‌های ارثی به نام سندروم‌های ناپایداری ژنتیکی یا کروموزومی هستند که به عوامل تخریب‌کننده DNA و اشعه، حساسیت بیشتری نشان می‌دهند^[4]. علاوه بر سندروم‌های ذکرشده کروموزوم‌ها در اغلب سرطان‌ها مانند سرطان پستان، درصدی از سرطان کولورکتال یا سرطان‌های سر و گردن به پرتو حساسیت نشان می‌دهند. حدود ۵ تا ۱۴٪ جمعیت طبیعی نیز به پرتو حساسیت دارند، بنابراین پیشنهاد شده است از حساسیت کروموزومی به پرتو به‌عنوان شاخص استعداد ابتلا به سرطان استفاده شود. تفاوت در توانایی ترمیم DNA ممکن است موجب تنوع در حساسیت به پرتو، بین افراد طبیعی شود^[5]. تقریباً تمامی این موقعیت‌های پاتولوژیک، پیش‌آگهی سرطان را نشان می‌دهند، بنابراین اگر یک رابطه محکم میان حساسیت به پرتو و پیش‌آگهی سرطان وجود داشته باشد جالب توجه خواهد بود^[4]. به‌طور مثال افراد هتروزیگوت آناکسی تلانژکتازی در مقایسه با افراد سالم حساسیت بیشتری به اشعه نشان می‌دهند و حدود ۴ برابر افزایش خطر ابتلا به سرطان دارند^[4].

مرحله G₂ (Growth₂) چرخه سلولی، یکی از مراحل کنترل سلول است. چنانچه سلولی در کروموزوم‌هایش نقص داشته باشد یا در فاز سنتز (Synthesis) خطایی رخ دهد، میتوز تا برطرف شدن مشکل یا ایجاد مرگ سلولی آغاز نخواهد شد. در این پژوهش، سلول‌ها در چرخه سلولی تحت تاثیر تابش پرتو (تکنیک سنجش

دست آوردند. سومین مرحله برداشت، تثبیت سلول‌ها است. در نهایت از نمونه‌ها لام تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی بررسی شدند. از هر نمونه سه نوع کشت تهیه شد که دو کشت تحت تاثیر پرتو قرار گرفتند و کشت سوم به‌عنوان کشت کنترل در تمامی شرایط به غیر از پرتو دهی شبیه به دو کشت دیگر بود. از کشت‌های پرتودیده مجموعاً ۵۰ سلول بررسی و از کشت‌های کنترل نیز ۵۰ سلول به‌منظور شمارش کروموزومی و ارزیابی برداشت شد.

در آنالیز میکروسکوپی لنفوسیت‌های متافازی، برای بررسی حساسیت پرتوی از شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی استفاده شد. ارزیابی وجود این شکست‌ها و ناهنجاری‌ها برای بررسی تاثیر پرتو روی سلول‌ها ضروری است. بر مبنای وجود شکست‌هایی که موجب ایجاد ناهنجاری شده، شکاف‌های کروماتیدی و کروموزومی (زمانی که عدم پیوستگی در ساختمان کروماتید بیشتر از عرض یک کروماتید باشد)، نوآرایی‌ها (مانند کروموزوم‌های حلقوی و دوسانترومیری) و اشکال شعاعی (اشکال ۳ شعاعی و ۴ شعاعی) سلول‌های ناهنجر به شمار می‌آیند. وقتی که عدم پیوستگی در ساختمان کروماتید کمتر از عرض یک کروماتید باشد، شکاف‌های کروماتیدی و کروموزومی به‌عنوان ناهنجاری کروموزومی محسوب نمی‌شوند.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 19 و روش‌های آماری تحلیلی پژوهش‌های مورد- شاهدهی آنالیز شدند. از آزمون‌های پارامتریک (آزمون‌های T استیویدنت و T زوجی) و ناپارامتریک (آزمون‌های مجذور کای و دقیق فیشر) برای ارزیابی وجود اختلاف معنی‌دار بین میانگین اندازه متغیرها استفاده شد.

در رابطه با بهره‌گیری از آزمون‌های پارامتریک وجود معیارهای لازم در به‌کارگیری این آزمون‌ها از جمله وجود توزیع نرمال داده‌های متغیر مستقل، دارابودن مقیاس کمی فاصله‌ای یا نسبتی در متغیر و مستقل بودن نمونه‌های بیمار و شاهد در نظر گرفته شد. در مورد آزمون T زوجی، عدم وجود داده‌های خارج از محدوده و کنترل پراکندگی داده‌ها نیز در نظر گرفته شد تا اطمینان حاصل شود که اختلاف محاسبه‌شده ناشی از تفاوت زیاد و خارج از محدوده در چند نمونه نبوده است. این موضوع، لزوم استفاده از آزمون‌های دیگر همچون تحلیل کوواریانس برای مقایسه نتایج قبل و بعد از پرتو دهی را رفع کرد. ارزیابی شاخص‌های آزمون حساسیت پرتوی بر مبنای منحنی‌های مشخصه عملکرد سیستم یا منحنی‌های عملیاتی دریافت‌کننده (ROC Curves1) و انجام C-statistics انجام شد. در این بررسی‌ها ضمن محاسبه حدمرزی برای هر شاخص آزمون بر مبنای ایندکس بودن نسبت به محاسبه حساسیت و اختصاصی بودن آزمون در نقطه حدمرزی و همچنین برآورد نسبت شانس در فاصله اطمینان ۹۵٪ اقدام شد.

یافته‌ها

میانگین سنی افراد مبتلا ۵۳/۲۵ سال با دامنه سنی بین ۳۲ تا ۸۴ سال بود. محدوده سنی افراد سالم نیز ۱۸ تا ۴۹ سال با میانگین سنی ۳۱/۳۳ سال بود (جدول ۱).
با توجه به اختلاف آماری معنی‌دار در متغیرهای سن و تعداد حاملگی بین دو گروه بیمار و کنترل، این احتمال وجود دارد که بتوان این دو متغیر را مخدوشگر در نظر گرفت و این موضوع می‌تواند نتایج به‌دست‌آمده را با دشواری و تردید مواجه کند که در این ارتباط بررسی‌های لازم انجام شد. از آنجایی که برای مخدوشگر بودن یک متغیر وجود رابطه هم با متغیر مستقل و هم با متغیر وابسته یا همان پیامد، مسلم است، باید گفت که دو

G₂ یا تکنیک بررسی شکست کروموزومی در مرحله G₂) قرار گرفتند. از آنجایی که سلول‌های در معرض پرتو در مرحله G₂ بلافاصله وارد میتوز می‌شوند و فرصت سنتز ندارند، اکثر ناهنجاری‌های ساختاری مشاهده‌شده از نوع کروماتیدی هستند. پژوهش حاضر با هدف بررسی شاخص‌های حساسیت پرتوی در سرطان پستان غیرارثی در زنان ایرانی مبتلا و به‌منظور ارزیابی امکان استفاده بالینی در تشخیص زود هنگام این بیماری و برآورد استعداد ابتلا به آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه یک پژوهش مشاهده‌ای- تحلیلی است که با روش مورد- شاهدهی انجام شد. تعداد ۳۲ فرد مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر در بدو مراجعه به بیمارستان مهراد در تهران بررسی شدند. این بیماران در شروع انجام مطالعه، هیچ درمانی دریافت نکرده بودند. ۳۰ نفر فرد سالم نیز به‌عنوان گروه کنترل انتخاب شد که در بستگان درجه اول و درجه دوم خود سابقه هیچ نوع سرطانی را نداشتند. از آنجایی که دسترسی به افراد سالم داوطلب، به‌گونه‌ای که دارای تمامی معیارهای ورود به پژوهش به همراه معیارهای همسان‌سازی براساس متغیرهای زمینه‌ای باشند، محدودیت داشت، بنابراین در برخی متغیرها مانند سن در اولین بارداری، سن منارک و سن منوپوز افراد دو گروه همسان بود و در برخی دیگر مانند سن و تعداد حاملگی این همسانی محقق نشد که با کمک ارزیابی‌های آماری تاثیر این متغیرها بررسی شد تا در صورت وجود تاثیر بر نتیجه، بتوان اثر آن را خنثی کرد. از تمامی افراد شرکت‌کننده، قبل از نمونه‌گیری رضایت‌نامه کتبی گرفته شد.

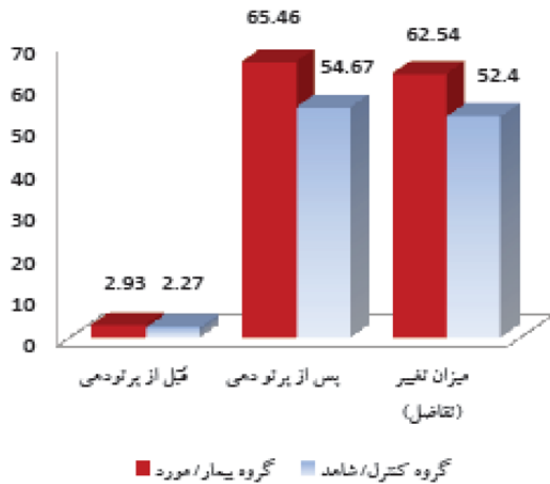
از شرکت‌کنندگان ۵ سی‌سی خون هپارینه گرفته شد. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد باقی ماندند و سپس کشت داده شدند. در گروه بیمار، تمامی شاخص‌های بالینی از جمله سایز تومور، وضعیت درگیری غدد لنفاوی، وضعیت گیرنده‌های استروژن و پروژسترون، وضعیت بیان ژن‌های p53، HER-2 و grade stage از طریق پرونده‌های بیماران بررسی و ثبت شد.

مواد استفاده‌شده برای تهیه محیط کشت سلولی شامل موارد زیر بودند:

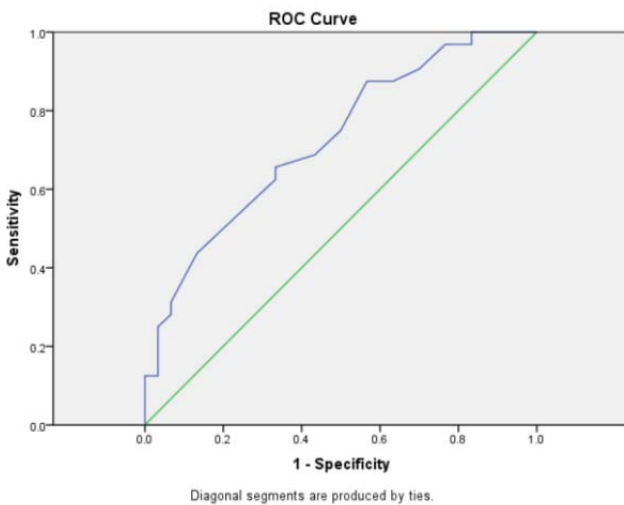
محیط کشت‌های (Eurocolone Lot No:ECM (RPMI 1640) (0495D) واجد بی‌کربنات سدیم و L-گلوتامین، پنی‌سیلین- استریپتومايسين (Eurocolone Cat No:ECB3001D) سرم جنین گاوی (Eurocolone Lot No:ECS0170D) و فیتوها گلویتینین (GIBCO Cat No:10576-015) بود. طبق برنامه بررسی شکست کروموزومی به روش G₂، پرتو دهی ۷۲ ساعت بعد از کشت سلولی انجام شد، زیرا بیشتر سلول‌ها در این زمان در مرحله G₂ چرخه سلولی قرار دارند. پرتوی تابیده‌شده از نوع پرتوی گاما با دوز ۰/۴ گری (Gy) بود.

برداشت سلول‌ها: نیم‌ساعت پس از پرتو دهی با اضافه‌کردن کالسیمید، سلول‌ها در مرحله متافاز متوقف شدند [7-15]. نقش کالسیمید ممانعت از تشکیل رشته‌های دوک در مرحله متافاز است. در نتیجه کروموزوم‌ها قادر نخواهند بود به سمت قطب‌های سلولی حرکت کنند و تقسیم سلولی متوقف می‌شود. دومین مرحله اصلی در برداشت سلول‌ها، مجاور کردن آنها با محلول کم‌فشار (هیپوتون) بود. در اثر این مجاورت، سلول‌ها حجیم شدند و کروموزوم‌ها فضای کافی برای پراکندگی درون لنفوسیت‌ها را به

می‌تواند شاخص معنی‌داری با سطح زیر نمودار (AUC) قابل قبول (۰/۷۲۵) باشد ($p < 0.05$) که از لحاظ بالینی و تصمیم‌گیری با میزان نسبت شانس می‌تواند در این ارتباط کمک‌کننده باشد (نمودار ۲).



نمودار ۱) مقایسه میانگین درصد سلول‌های غیرطبیعی در دو گروه بیمار و کنترل، قبل و بعد از پرتو درمانی (آزمون آماری T زوجی برای مقایسه میانگین نتیجه قبل و بعد از پرتو درمانی در هر گروه، گروه بیمار $t=31/32$; $df=31$; $p \leq 0.0001$ و گروه کنترل: $t=20/98$; $df=29$; $p \leq 0.0001$. آزمون آماری T استیوودنت برای مقایسه میانگین نتایج میان دو گروه بیمار و کنترل، قبل از پرتو درمانی: $t=0/831$; $df=60$; $p=0/49$. پس از پرتو درمانی: $t=3/381$; $df=60$; $p=0/001$ و تفاضل قبل و بعد از پرتو درمانی: $t=3/187$; $df=60$; $p=0/002$



نمودار ۲) منحنی ROC و محاسبه سطح زیر نمودار (C-statistics). محاسبه حدمرزی برای شاخص تعداد سلول‌های غیرطبیعی در آزمون حساسیت به پرتو ۷ در مرحله G2، نسبت شانس و حساسیت و ویژگی در حدمرزی محاسبه شد (شاخص درصد سلول‌های غیرنرمال پس از پرتو درمانی: $AUC=0/725$ ، $Std.Error=0/064$ ، $CI95\%=0/60-0/85$ ، $p=0/002$ ، $C=61$ ، $OR=3/818$ ، $CI95\%=1/332-10/942$ ، حساسیت=۶۵/۶٪ و اختصاصیت=۶۶/۶٪ ROC Curve = منحنی مشخصه محرکه گیرنده، $AUC=0/725$ سطح زیر منحنی بالاتر از ۰/۵ معنی‌دار بوده و با در نظر داشتن p کمتر از ۰/۰۵ نشانگر ارزش آزمون در تفکیک بیمار از سالم بیش از حالت شانس بود. $CI=95\%$ فاصله اطمینان ۹۵٪: $C=$ حدمرزی مناسب‌ترین عدد در آزمون برای مثبت یا منفی تلقی کردن آزمون بود. $OR=$ نسبت شانس نشان داد که افراد دارای آزمون مثبت تا چند برابر افراد دارای آزمون منفی ممکن است بیمار باشند. فاصله اطمینان محاسبه شده نیز تا ۹۵٪ برای آن رایج شد

متغیر سن و تعداد حاملگی حداقل با شرط ارتباط با حساسیت پرتویی، رابطه قابل توجه معین و مسلمی نداشتند، با این حال آنالیز آماری در این راستا صورت گرفت. آزمون‌های همبستگی پیرسون و اسپیرمن، عدم وجود همبستگی با نتایج آزمون‌ها ($p < 0.05$) را نشان داد و از لحاظ احتمال مخدوش‌کنندگی از آنها رفع ابهام شد.

جدول ۱) مقایسه میانگین آماری داده‌های دموگرافیک گروه بیماران (۳۲ نفر) و افراد سالم (۳۰ نفر)

متغیر	گروه کنترل	گروه بیمار	سطح معنی‌داری	مشخصات آماری
سن	$31/33 \pm 7/35$	$53/25 \pm 13/28$	$0/0001^*$	T استیوودنت ($df=48/9$; $t=8/107$)
تعداد حاملگی‌ها	$0/67 \pm 1/15$	$2/81 \pm 1/78$	$0/0001^*$	مجذور کای ($df=6$; $\chi^2=29/05$)
سن در اولین بارداری	$19/63 \pm 3/33$	$22/27 \pm 4/88$	$0/164$	T استیوودنت ($df=60$; $t=1/426$)
سن در شروع قاعدگی	$13/72 \pm 1/67$	$13/85 \pm 1/59$	$0/772$	T استیوودنت ($df=60$; $t=0/292$)
سن در شروع یائسگی	$40/50 \pm 9/19$	$46/53 \pm 6/33$	$0/234$	T استیوودنت ($df=60$; $t=1/336$)

* تفاوت معنی‌دار بین دو گروه

بررسی توزیع افراد مبتلا به سرطان پستان بر حسب مرحله تومور (براساس سیستم سه حرفی TNM) مشاهده شد که ۷ بیمار (۲۳/۳٪) دارای مرحله I، ۴ مورد (۱۳/۳٪) مرحله IIa، ۱۶ مورد (۵۳/۳٪) مرحله IIb، ۱ مورد (۳/۳٪) مرحله IIIa و ۲ مورد (۶/۷٪) نیز دارای مرحله IIIb بودند. در ۶۲/۵٪، تومور دارای تمایز متوسط یا نمره ۲ بود. در ۳۳/۳٪، تومور دارای تمایز بالا یا نمره ۱ و تنها در ۳/۱٪ بیماران تومور با نمره ۳ داشت. وجود یا عدم وجود گیرنده‌های استروژن، پروژسترون، p53 و HER-2 بخش بسیار مهمی از این پژوهش بود (جدول ۲).

جدول ۲) توزیع فراوانی مطلق و نسبی (اعداد داخل پرانتز درصد هستند) وضعیت گیرنده‌های استروژن، پروژسترون، p53 و HER-2 در تومورهای بیماران مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر

گیرنده‌ها	مثبت	منفی
استروژن	۲۱ (۷۵/۰)	۷ (۲۵/۰)
پروژسترون	۱۷ (۶۳/۰)	۱۰ (۳۷/۰)
p53	۵ (۱۹/۲)	۲۱ (۸۰/۸)
HER-2	۵ (۱۹/۲)	۲۱ (۸۰/۸)

شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی در هر دو گروه بیمار و کنترل در مقایسه قبل و بعد از پرتو درمانی در هر نمونه اختلاف معنی‌داری نشان داد (نمودار ۱؛ $p=0/0001$).

در مقایسه همین شاخص بین گروه‌های بیمار و کنترل وجود سلول‌های غیرطبیعی قبل از پرتو درمانی اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($p > 0.05$)، اما پس از پرتو درمانی و نیز تفاضل تغییرات قبل و بعد از پرتو درمانی در مورد شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$).

بررسی آماری و محاسبه شاخص C برای درصد سلول‌های غیرطبیعی در مرحله G2 به پرتو ۷ نشان داد که این شاخص

پستان نسبت به افراد سالم تفاوت معنی‌داری داشت و این طور به نظر می‌رسد که پرتودهی روی سلول‌های این افراد با شدت بیشتری تاثیر می‌گذارد. بنابراین در سلول‌های افراد مبتلا پس از پرتودهی درصد بیشتری از سلول‌ها در مقایسه با کشت‌های پرتودهی‌شده افراد سالم تغییر کردند. این مساله بیانگر افزایش حساسیت افراد بیمار نسبت به پرتو در مقایسه با افراد سالم است. ارتباط بین استعداد ابتلا به سرطان و حساسیت پرتویی ثابت شده و حاصل پژوهش بر سندروم‌های ناپایداری کروموزومی همچون آتاکسی‌تلائنکتازی است [16, 17]. افراد مبتلا به این نوع سندروم همان طور که استعداد ابتلا به سرطان بیشتری دارند، ناپایداری ژنوم را نیز به شکل افزایش میزان ناهنجاری‌های کروموزومی القا شده با روش G_2 و خودبه‌خودی در نمونه‌های خون محیطی نشان می‌دهند [18, 19]. در پژوهش‌های مختلف حساسیت پرتویی در بیماران مبتلا به سرطان پستان بررسی شده است [14, 15, 20-22]. در برخی پژوهش‌ها تخمین زده شده است که در حدود ۴۰٪ مبتلایان به سرطان پستان، حساسیت بالایی به پرتو دارند [8, 12, 13, 23-26]. ژن‌های زیادی در فرآیند حساسیت به پرتو نقش دارند که تعداد کمی از آنها شناخته شده‌اند. همراه تمامی این ژن‌ها با استعداد ابتلا به سرطان تایید شده است [7].

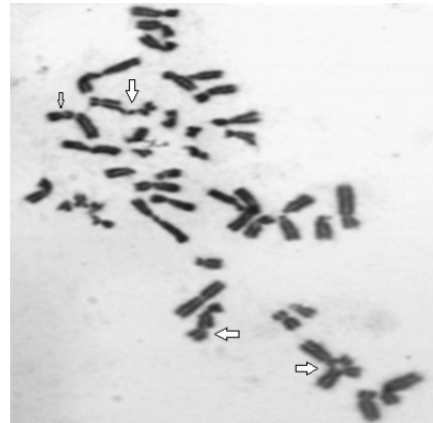
از دیگر نتایج مطالعه حاضر این بود که پرتودهی روی افراد بیمار تفاوت قابل توجهی در شاخص درصد سلول‌های غیرعادی قبل و بعد از پرتودهی ایجاد کرد. حساسیت مبتلایان نسبت به پرتو در این بررسی مطابق انتظار و همسو با سایر پژوهش‌های ذکر شده بالا بود. مقایسه درصد سلول‌های غیرعادی در کشت‌های پرتودیده مبتلایان به سرطان پستان با کشت‌های پرتودیده افراد سالم، تفاوت معنی‌داری را نشان داد. در واقع حساسیت بالای کروموزومی به پرتو در افراد مبتلا به سرطان پستان با وجود این اختلاف، قابل توجه بوده است و ارزش کاربردی دارد. اخیراً در پژوهش‌های مختلف سعی شده است تا از موضوع حساسیت کروموزومی در سطح سیتوژنتیک مولکولی و با ارزیابی همبستگی پیامد (بیماری سرطان پستان) با ویژگی‌های مختلفی همچون تغییرات متنوع ژنتیک و حتی پلی‌مورفیسم‌ها بهره گرفته شود [27]. پس از چندین سال از شناخت حساسیت پرتوی، امروزه دوباره (با تکیه بر تکنولوژی‌های جدید) این شاخص در مسیر استفاده به‌عنوان بیومارکر پیشگویی‌کننده پیامدها قرار گرفته است [30, 31]. نتایج پژوهش حاضر بیانگر قابلیت مناسب آزمون در ارتباط با شاخص میزان افزایش درصد سلول‌های غیرطبیعی بعد از پرتودهی بود، زیرا این آزمون نسبت شانس قابل توجهی را ارائه داده و حساسیت و اختصاصیت نسبتاً مناسبی دارد. بنابراین می‌تواند شاخص خوبی برای بررسی سرطان پستان و امکان پیش‌بینی استعداد ابتلا باشد. نتایج پژوهشی بر پایه تکنولوژی جدید در اوکراین با نتایج پژوهش حاضر در رابطه با امکان استفاده و مفید بودن به‌کارگیری آزمون حساسیت پرتوی در فاز G_2 چرخه سلولی (البته با پرتودهی با اشعه X) هم راستا بود [32].

آزمون حساسیت کروموزومی به پرتو، ابزاری برای بررسی استعداد ابتلا به انواع سرطان‌ها به‌ویژه برای اعضای خانواده بیماران سرطانی با استفاده از ابزارهای نوین ژنتیک مولکولی و سیتوژنتیک مولکولی در دست بررسی و پژوهش است [33-35].

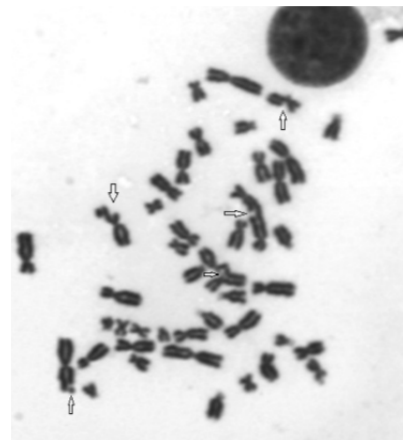
نتیجه‌گیری

زنان ایرانی مبتلا به سرطان پستان تک‌گیر نسبت به زنان سالم

میزان نسبت شانس در نقطه حدمرزی ۶۱٪، برابر با ۳/۸۱۸ بود (۱۰/۹۴۲-۱/۳۳۲=۱۹۵٪ CI)، به‌طوری که در افرادی که افزایش درصد سلول‌های غیرطبیعی آنها بعد از پرتودهی نسبت به قبل از پرتودهی مساوی یا بیش از ۶۱٪ بود، احتمال ابتلای بیشتر، تقریباً ۴ برابر (۳/۸۱۸)، نسبت به افراد دیگر داشتند. در نقطه مرزی ۶۱٪، حساسیت این شاخص ۶۵/۶٪ و اختصاصیت آن ۶۶/۶٪ بود که برای یک آزمون می‌تواند قابل قبول تلقی شود. این آزمون می‌تواند تقریباً ۶۵/۶٪ افراد بیمار را به‌درستی معرفی کند و تا حد ۶۶/۶٪ افراد نرمال را سالم تشخیص دهد. پرتودهی موجب ایجاد شکست‌ها و ناهنجاری‌های مختلف در کروموزوم‌ها شد (شکل‌های ۱ و ۲).



شکل ۱) نمونه‌ای از شکست‌ها و شکاف‌ها و یک چهارشعاعی مشاهده شده در فرد مبتلا به سرطان پستان پس از پرتودهی



شکل ۲) نمونه‌ای از شکست‌ها و شکاف‌های مشاهده شده در فرد سالم پس از پرتودهی

بحث

در پژوهش حاضر اختلاف میان شاخص درصد سلول‌های غیرطبیعی در افراد نرمال همانند افراد مبتلا به سرطان پستان قبل و بعد از پرتودهی معنی‌دار بود. به این مفهوم که در کشت‌های افراد نرمال نیز پس از پرتودهی تفاوت معنی‌داری در بروز سلول‌های دارای شکست ایجاد شد. درصد سلول‌های واجد شکست‌های کروموزومی در افراد مبتلا به سرطان پستان در حالتی که تحت تاثیر هیچ عاملی قرار نگرفته باشد، مشابه افراد سالم بود و اختلاف معنی‌داری بین آنها وجود نداشت. اختلاف بین درصد سلول‌های غیرعادی در کشت‌های پرتودیده افراد مبتلا به سرطان

- 9- Bryant PE, Gray L, Riches AC, Steel CM, Finnon P, Howe O, et al. The G2 chromosomal radiosensitivity assay. *Int J Radiat Biol.* 2002;78(9):863-6.
- 10- Docherty Z, Georgiou A, Langman C, Kesterton I, Rose S, Camplejohn R, et al. Is chromosomal radiosensitivity and apoptotic response to irradiation correlated with cancer susceptibility?. *Int J Radiat Biol.* 2007;83(1):1-12.
- 11- Barwell J, Pangon L, Georgiou A, Kesterton I, Langman C, Arden-Jones A, et al. Lymphocyte radiosensitivity in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers and implications for breast cancer susceptibility. *Int J Cancer.* 2007;121(7):1631-6.
- 12- Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, Messiaen L, De Ridder L, et al. Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. *Br J Cancer.* 2002;87(12):1379-85.
- 13- Scott D, Barber JB, Spreadborough AR, Burrill W, Roberts SA. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: A comparison of two assays. *Int J Radiat Biol.* 1999;75(1):1-10.
- 14- Barber JB, Burrill W, Spreadborough AR, Levine E, Warrenb C, Kiltie AE, et al. Relationship between in vitro chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes and the expression of normal tissue damage following radiotherapy for breast cancer. *Radiother Oncol.* 2000;55(2):179-86.
- 15- Roberts SA, Spreadborough AR, Bulman B, Barber JB, Evans DG, Scott D. Heritability of cellular radiosensitivity: A marker of low penetrance predisposition genes in breast cancer?. *Am J Hum Genet.* 1999;65(3):784-94.
- 16- Boostma D, Kraemer KH, Cleaver JE, Hoeijmakers JHJ. Nucleotide Excision Repair Syndromes: Xeroderma Pigmentosum, Cockayne Syndrome, and Trichothiodystrophy. In: *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* 6th ed. New York: McGraw-Hill; 1989.
- 17- Cleaver JE. Xeroderma pigmentosum: A human disease in which an initial stage of DNA repair is defective. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969;63(2):428-35.
- 18- Rary JM, Bender MA, Kelly TE. Cytogenetic status of ataxia telangiectasia. *Am J Hum Genet.* 1974;26:70
- 19-Sanford KK, Parshad R, Price FM, Jones GM, Tarone RE, Eierman L, et al. Enhanced chromatid damage in blood lymphocytes after G2 phase x irradiation, a marker of the ataxia-telangiectasia gene. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(12):1050-4.
- 20- Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: A test for predisposition?. *Br J Cancer.* 1998;77(4):614-20.
- 21- Rigaud O, Guedeny G, Duranton I, Leroy A, Doloy MT, Magdelenat H. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. II. Alteration of DNA repair and chromosome radiosensitivity. *Mutat Res.* 1990;242(1):25-35.
- 22- Samouhos E. Chromosomes, cancer and radiosensitivity. *Am J Clin Oncol.* 1983;6(4):503-6.
- 23- Riches AC, Bryant PE, Steel CM, Gleig A, Robertson AJ, Preece PE, et al. Chromosomal radiosensitivity in G2-phase lymphocytes identifies breast cancer patients with distinctive tumour characteristics. *Br J Cancer.* 2001;85(8):1157-61.
- 24- Terzoudi GI, Jung T, Hain J, Vrouvas J, Margaritis K,

حساسیت بیشتری به پرتو گاما داشته و این حساسیت را به شکل شکافها و شکستهای کروموزومی نشان می‌دهند. بنابراین آزمون حساسیت کروموزومی در برابر پرتو، قابلیت استفاده به‌عنوان بیومارکر تشخیصی زودهنگام سرطان پستان یا شاخص احتمالی تعیین استعداد ابتلا به این بیماری را دارد. این موضوع می‌تواند در پژوهش‌های کوهورت در آینده مورد ارزیابی دقیق‌تری قرار گیرد.

تشکر و قدردانی: از بیماران و کلیه افرادی که در این طرح با ما همکاری کردند کمال تشکر را داریم (مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توان‌بخشی برای پشتیبانی و حمایت‌های مالی‌شان، کارکنان محترم بیمارستان مهراد برای گرفتن نمونه‌های بیماران در شرایط بهینه و کارکنان مرکز پرتودرمانی نوید که برای پرتودهی نمونه‌ها ما را یاری نمودند).

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

تعارض منافع: موردی وجود نداشته است.

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

سهم نویسندگان: فروغ مجتهدی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ آرش پولادی (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیل‌گر آماری/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ فریدون سیرتی (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ الهه کیهانی (نویسنده چهارم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ شهرام اخلاق‌پور (نویسنده پنجم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ مسعود کریم‌لو (نویسنده ششم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ ایمان باقری‌زاده (نویسنده هفتم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ معصومه فلاح (نویسنده هشتم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ ساغر قاسمی فیروزآبادی (نویسنده نهم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر کمکی (۵٪)؛ فرخنده بهجتی (نویسنده دهم)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۲۵٪)

منابع

- Dumitrescu RG, Cotarla I. Understanding breast cancer risk -Where do we stand in 2005?. *J Cell Mol Med.* 2005;9(1):208-21.
- Miller A. Causes of breast cancer and high-risk groups. In: Harris JR. *Breast Diseases.* 2th ed. Philadelphia: JB Lippincott; 1991. p.119.
- Santora LM, Mahoney MC, Lawvere S, Englert JJ, Symons AB, Mirand AL. Breast cancer screening beliefs by practice location. *BMC Public Health.* 2003; 3: 9.
- Taylor AMR. Chromosome instability syndromes. *Clin haematol.* 2001;14(3):631-44.
- Haskell CM. *Cancer Treatment.* 5th ed. Saunders WB, editor. Philadelphia: W.B. Saunders; 2001.
- Kahan E, Ibrahim AS, Najjar KE, Ron E, Al-Agha H, Polliack A, et al. Cancer Patterns in the Middle East Special Report from the Middle East Cancer Society. *Acta Oncol.* 1997;36(6):631-6.
- Pichierrri P, Franchitto A, Palitti F. Predisposition to cancer and radiosensitivity. *Genet Mol Biol.* 2000;23(4):1101-5.
- Smart V, Curwen GB, Whitehouse CA, Edwards A, Tawn EJ. Chromosomal radiosensitivity: A study of the chromosomal G(2) assay in human blood lymphocytes indicating significant inter-individual variability. *Mutat Res.* 2003;528(1-2):105-10.

predisposition to common cancers?. *Br J Cancer*. 2001;84(7):892-6.

31- Hill JW, Tansavatdi K, Lockett KL, Allen GO, Takita C, Pollack A, et al. Validation of the cell cycle G(2) delay assay in assessing ionizing radiation sensitivity and breast cancer risk. *Cancer Manag Res*. 2009;1:39-48.

32- Ryabchenko NM, Glavin OA, Shtefura V, Anikushko MF. Chromosomal radiosensitivity in Ukrainian breast cancer patients and healthy individuals. *Exp Oncol*. 2012;34(2):121-4.

33- Wilson PF, Nagasawa H, Fitzek MM, Little JB, Bedford JS. G2-phase chromosomal radiosensitivity of primary fibroblasts from hereditary retinoblastoma family members and some apparently normal controls. *Radiat Res*. 2010;173(1):62-70.

34- Hille A, Hofman-Huther H, Kuhnle E, Wilken B, Rave-Frank M, Schmidberger H, et al. Spontaneous and radiation-induced chromosomal instability and persistence of chromosome aberrations after radiotherapy in lymphocytes from prostate cancer patients. *Radiat Environ Biophys*. 2010;49(1):27-37.

35- De Ruyck K, de Gelder V, Van Eijkeren M, Boterberg T, De Neve W, Vral A, et al. Chromosomal radiosensitivity in head and neck cancer patients: Evidence for genetic predisposition?. *Br J Cancer*. 2008;98(10):1723-38.

Donta-Bakoyianni C, et al. Increased G2 chromosomal radiosensitivity in cancer patients: The role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved. *Int J Radiat Biol*. 2000;76(5):607-15.

25- Parshad R, Price FM, Bohr VA, Cowans KH, Zujewski JA, Sanford KK. Deficient DNA repair capacity, a predisposing factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 1996;74(1):1-5.

26- Scott D, Spreadborough A, Levine E, Roberts SA. Genetic predisposition in breast cancer. *Lancet*. 1994;344(8934):1444.

27- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA. Evaluating the effects of genetic variants of DNA repair genes using cytogenetic mutagen sensitivity approaches. *Biomarkers*. 2011;16(5):393-404.

28- Cadwell KK, Curwen GB, Tawn EJ, Winther JF, Boice JD Jr. G2 checkpoint control and G2 chromosomal radiosensitivity in cancer survivors and their families. *Mutagenesis*. 2011;26(2):291-4.

29- Kotsopoulos J, Chen Z, Vallis KA, Poll A, Ainsworth P, Narod SA. DNA repair capacity as a possible biomarker of breast cancer risk in female BRCA1 mutation carriers. *Br J Cancer*. 2007;96(1):118-25.

30- Baria K, Warren C, Roberts SA, West CM, Scott D. Chromosomal radiosensitivity as a marker of