بررسی میزان صدمات سیتوژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان طی زمان‌های مختلف انکوباسیون سلول‌ها با Iudr در مدل کشت اسفرویید از سلول‌های گلیوما به روش کامت

*دکتر علی نشاسته‌ریز I

نورالدین بیشه‌سری II

دکتر سمیده خویی III

چکیده

زمینه و هدف: ۵-ایدو۲-دئوکسی‌یوریدین(Iudr)، آنالوگ تیمیدین و به عنوان حساس کننده پرتوی سلول‌های سرطان انسانی در in vitro و in vivo شناخته شده است. مطالعات بر روی اسفرویید‌ها نشان داده است که افزایش زمان انکوباسیون Iudr سبب افزایش برداشت سلول‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان صدمات سیتوژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان طی زمان‌های مختلف انکوباسیون سلول‌ها با Iudr در مدل کشت اسفرویید و تعیین زمان لازم انکوباسیون جهت ایجاد بیشترین حساسیت سلولی است.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی ـ کاربردی، از خط سلولی U87MG با منشاء گلیوما استفاده شد که به صورت اسفرویید با دو قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر کشت داده شد. اسفرویید‌ها طی زمان‌های یک، دو و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید با غلظت ۱μM از Iudr انکوبه شدند. پس از تیمار دارویی و 2Gy پرتودهی با گامای کبالت ۶۰(60 Co)، میزان آسیب‌های وارده به DNA سلول به روش کامت قلیایی اندازه‌گیری شده، سپس براساس آزمون آماری t-test بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که با افزایش زمان انکوباسیون اسفرویید‌ها با Iudr، میزان آسیب‌های پرتوی به DNA در هر دو قطر افزایش یافت و میزان آن در اسفرویید‌های به قطر ۳۰۰ میکرومتر بیشتر از ۱۰۰ میکرومتر بوده است. مطالعات نشان داده است که با افزایش زمان انکوباسیون از یک زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید به دو زمان، افزایش معنی‌داری در میزان آسیب‌های وارده به DNA مشاهده می‌شود. در حالی که از دو زمان به سه زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید، آسیب قابل ملاحظه‌ای به DNA وارد نمی‌گردد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، عملاً انکوباسیون سلول‌ها طی دو زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید نسبت به یک و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید، زمان مناسب‌تری جهت ایجاد حساسیت پرتوی است.

کلیدواژه‌ها: ۱ – گلیوبلاستوما ۲ – اسفرویید ۳ – Iudr ۴- کامت

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۳، تاریخ پذیرش: ۸۶/۶/۲۱

مقدمه

پیریمیدین‌های هالوژندار، حدود ۴۰ سال است که به عنوان حساس کننده پرتوی مورد توجه قرار گرفته‌اند و در سرطان‌های مختلف نتایج قابل قبولی در آزمایشهای کلینیکی از آنها به دست آمده است.[۱]

پیریمیدین‌های هالوژن دار، جهت درمان سلول‌های سرطانی که سرعت تکثیر بالایی دارند به کار می‌روند.[۲]

این مولکول‌ها، به دلیل شباهت ساختاری به باز تیمین در زمان سنتز DNA(فاز S) به جای تیمین در مولکول DNA قرار می‌گیرند و حساسیت پرتوی را افزایش می‌دهند.[۳] مکانیسم بیوشیمیایی حساس کننده‌های پرتوی مانند Iudr کاملاً شناخته شده نیست. مطالعات نشان داده است که این عوامل در واکنش با الکترون‌های هیدراته القاء شده توسط

I) دانشیار و PhD فیزیک پزشکی، گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).

II) کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی.

III) استادیار و PhD بیوفیزیک، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران.

Archive of SID

www.SID.ir

پرتوهای یونیزان، ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنش‌گر اوراسیل و یون‌های هالید می‌کنند.[٤] نتیجه آن، ایجاد شکست‌های تک رشته‌ای DNA و متعاقب آن شکست‌های دو رشته‌ای است. در صورت عدم ترمیم و یا ترمیم ناقص، سبب مرگ سلولی می‌شود.[٥] میزان جایگزینی این دارو در DNA سلول‌های سرطانی و طبیعی، به اختلاف سنتز DNA سلول‌ها بستگی دارد. تمام سلول‌هایی که قدرت تکثیر دارند قادر به دریافت این دارو می‌باشند. لذا، یکی از کاربردهای این مولکول‌ها در تومورهایی است که سلول‌های طبیعی اطراف تومور، قدرت تقسیم کمی داشته باشند.

اسفروییدهای توموری چند سلولی، شباهت بسیار زیادی به تومور in vivo دارند و مدل بسیار مناسبی برای مطالعه نفوذ و جذب داروهای مختلف و بررسی اثرات عوامل مختلف درمانی در سلول‌های تومور واقعی می‌باشند.[٦]

مطالعات نشان داده است که با انکوباسیون اسفروییدهای با قطر ۲۰۰–۱۰۰ میکرومتر طی یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروییدها با Iudr نشاندار، حدود ۷۲ درصد از سلول‌ها نشاندار شده‌اند. در حالی که در اسفروئیدهای بزرگ با قطر ۱۰۰۰–۷۰۰ میکرومتر، حدود ۲۸ درصد سلول‌ها پس از این مدت زمان انکوباسیون نشان‌دار شده‌اند.[٧] این مطلب نشان دهنده آن است که با افزایش قطر اسفروییدها، تنوع سیکل سلولی افزایش می‌یابد. از سوی دیگر مطالعات نشان داده است با افزایش زمان انکوباسیون، میزان برداشت Iudr در اسفروییدهای با اندازه‌های مختلف افزایش می‌یابد.

بررسی نسبی میزان مهاجرت DNA، راه ساده‌ای برای اندازه‌گیری میزان شکست‌های DNA در یک سلول می‌باشد. اگر چه روش‌های متفاوتی برای بررسی میزان شکست‌های تک‌رشته‌ای DNA ارائه شده است، ولی چند عامل روش کامت را نسبت به روش‌های دیگر جالب می‌کند.

از جمله مزایای این روش این است که امکان بررسی صدمات در سلول‌ها به صورت تکی وجود دارد و نیاز به باند شدن سلول با عوامل رادیوایزوتوپ نیست. لذا، در هر هسته‌ای اندازه‌گیری امکان‌پذیر است، قادر به آشکار کردن حداقل آسیب DNA می‌باشد، کم‌هزینه است و کاربرد آن آسان است.[٨] هدف از انجام این تحقیقات، بررسی تأثیر افزایش مدت زمان انکوباسیون اسفروییدهای سلولهای گلیوبلاستوما با Iudr بر میزان صدمات سیتوژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان می‌باشد. نتیجه این تحقیق می‌تواند گام موثری در تعیین استراتژی درمان در کاربرد مواد حساس کننده در تومورهای بدخیمی چون گلیوما باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع بنیادی ـ کاربردی است. خط سلولی: خط سلولی مورد استفاده در این مطالعه، U87MG با منشاء گلیوما بوده است؛ که در محیط کشت MEM(Gibco BRL) حاوی پنی‌سیلین(۱۰۰u/ml)، استرپتومایسین(۰/۲۵µg/ml)، Fungizone (Gibco)(۱ml/L)، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco BRL) و ۰/۲۲ گرم $NaHCO_3$(Merck) کشت داده شده است.

کشت تک لایه: جهت کشت تک لایه، سلول‌ها با دانسیته 10^2cells/cm^2 در فلاسک‌های T-25(Nune) کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪Co_2 و اشباع از رطوبت نگداری شدند. جهت تریپسینه کردن سلول‌ها، از محلول ۰/۲۵٪ تریپسین و ۰/۰۳٪ EDTA در بافر نمکی فسفات استفاده شد.

کشت اسفروییدو و اندازه گیری زمان دو برابر شدن حجم آن: جهت کشت اسفروییدها، تعداد 5×10^5 سلول در ده میلی‌لیتر محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FCS بر روی پتری‌های ۱۰۰mm پوشیده شده با لایه نازکی از آگار ۱٪ کشت داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪Co_2 و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. هر سه روز یک بار نیمی از محیط کشت با محیط تازه جایگزین می‌شد. پس از سه روز، اسفروییدهای با قطر تقریبی ۵۰µm به میکروپلیت‌هایی منتقل شدند که کف هر چاهک از میکروپلیت با آگار ۱٪ پوشیده شده است. انتقال به گونه‌ای صورت گرفت که در هر خانه، یک اسفروییدقرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪Co_2 و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. به مدت ۳۸ روز، به طور متناوب دو قطر عمود بر هم هر اسفروییدبا لنز مدرج اندازه‌گیری می‌شد. حجم هر اسفروییدطبق رابطه زیر

Archive of SID
www.SID.ir

محاسبه شد: حجم اسفرویید $V=a\times b^2\times\pi/6$ (۱)

که در آن a قطر کوچک و b قطر بزرگ اسفرویید می‌باشد. سپس منحنی حجم بر حسب زمان در مقیاس نیمه لگاریتمی ترسیم گردید.

در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، اسفرویدها از رابطه زیر پیروی می‌کنند: حجم اسفرویید $V=V_0\times c^{kt}$ (۲)

که در آن V_0 حجم اولیه اسفرویدها، V حجم اسفرویید پس از مدت زمان t و k نمایانگر شیب بخش خطی نمودار است. از روی شیب بخش خطی منحنی، زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید با استفاده از معادله VDT=Ln2/k به دست می‌آید.

تیمار دارویی با Iudr: به منظور بررسی اثر حساس کنندگی Iudr در سلول‌های گلیوما در حضور پرتو، به پتری حاوی اسفرویدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر به ازای هر ده سی‌سی محیط کشت، ۱۰۰µl دارو با غلظت ۱۰۰µM اضافه شد(تا غلظت موجود در هر پتری به یک میکرومولار برسد) و به مدت یک، دو و سه بار زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید، تیمار شدند.

پرتودهی: در این مطالعه، از دوز ۲ گری پرتو گاما کبالت ۶۰(Teriton 760) با Dose rate=۱/۵cGy/min جهت پرتودهی استفاده شد. به هیمن منظور پس از گذشت یک، دو و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید از انکوباسیون اسفرویدها با داروی Iudr، اسفروئیدها تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند.

بررسی آسیب‌های DNA به روش سنجش کامت در محیط بازی: به منظور بررسی آسیب‌های وارد به DNA سلول‌ها، ابتدا اسفرویدها را به وسیله محلول تریپسین/ EDTA به صورت سلول‌های تکی در آورده و سپس از این سلول‌های تکی جهت بررسی آسیب‌ها استفاده شد.

بعد از کد گذاری لام میکروسکوپی، آگارز معمولی (Normal Melting Agarose=NMA) را به شکل ۱٪ تهیه کرده و به طور یکنواخت بر روی لام قرار داده، سپس آگارز با دمای ذوب پایین(Low Melting Agarose=Low) به صورت ۰/۵٪ تهیه شده؛ ۷۵ میکرولیتر از آن را با ۱۰ میکرولیتر محیط کشت حاوی 10^4 سلول مخلوط کرده و بر روی ژل آماده شده قبلی ریخته و در سطح لام پخش کرده. اسلایدهای آماده شده به یخچال منتقل شدند و بر روی آن‌ها بافر لیز کننده (۲/۵M Nacl، ۱۰۰mM EDTA، ۱۰mM Tris، HCl، ۱Triton X-100٪ و pH=۷/۵) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در یخچال نگهداری شدند.

پس از یک ساعت به اسلاید فوق، محلول دینیچره کننده (۳۰۰mM NaOH، ۱mM EDTA، pH=۱۳) اضافه شد و به مدت نیم ساعت در یخچال نگهداری شدند.

اسلایدها، نهایتاً به آرامی از محلول دینچره کننده خارج شده و به داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر دینیچر کننده قرار منتقل شدند و به مدت ۳۰ دقیقه تحت ولتاژ ۲۳ ولت قرار داده شدند. سپس، جهت خنثی‌سازی محیط بازی، به اسلایدها بافر خنثی‌کننده(۰/۴M Tris-HCl، pH=۷/۵) اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در این محیط نگهداری شدند. در نهایت، اسلایدها در سینی مخصوص حاوی ۱۰µg/mL اتیدیم برماید قرار داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. برای مشاهده آسیب‌ها از میکروسکوپ فلورسانس دوربین‌دار با فیلتر WG استفاده شد. سپس از نرم‌افزار comet score جهت آنالیز استفاده شد که میزان آسیب DNA سلول را با اندازه‌گیری طول مهاجرت DNA و درصد آنها تعیین می‌کند.

سرانجام، نرم‌افزار فوق‌الذکر tail moment(حاصل ضرب طول دنباله در شدت انتهایی) را محاسبه می‌کند. هر چه میزان و شدت این دنباله یا tail بیشتر باشد، نمایانگر آسیب بیشتر DNA سلول می‌باشد.

در این پژوهش به ازاء هر نمونه به طور متوسط ۴۰۰ سلول مورد بررسی قرار گرفت. در کلیه مراحل آزمایش، پس از تبدیل اسفرویدها به سلول‌های تکی و پیش از انجام آزمون کامت Viability سلول‌ها اندازه گیری شد که در تمام مراحل این مقدار بیش از ۹۰٪ بود.

تجزیه و تحلیل آماری: از آزمون t-test، مقادیر P-value نمونه‌ها محاسبه و مقایسه شدند. نمودارها و محاسبات آماری در این پژوهش به کمک نرم‌افزار کامپیوتری ۲۰۰۳ Excel انجام شده است.

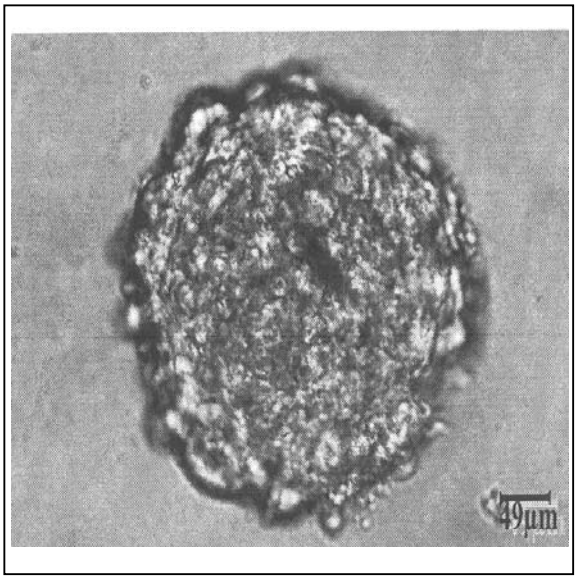
Archive of SID
www.SID.ir

یافته‌ها

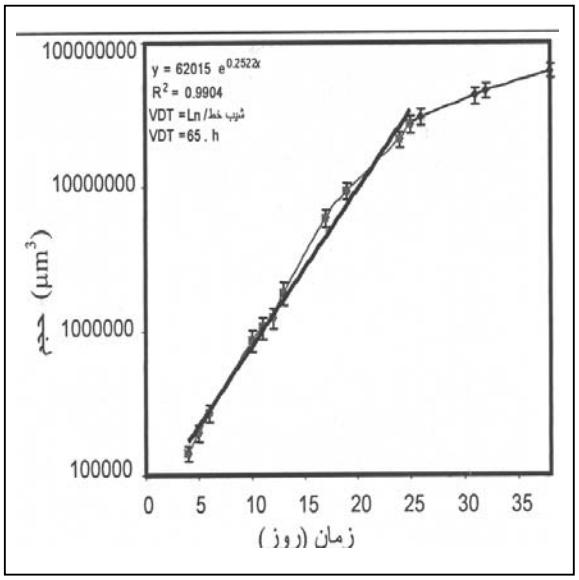
کشت سلول‌های U87MG به صورت تک لایه و رسم منحنی رشد سلولی(Growth Curve): جهت بررسی اثر حساس‌کنندگی Iudr در پرتودرمانی گلیوما، منحنی رشد سلول‌های U87MG در مقیاس نیمه لگاریتمی به صورت تعداد سلول برحسب زمان در طی ۱۰ روز ترسیم شد. در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، شیب منحنی محاسبه شد. سپس از روی شیب، زمان دو برابر شدن سلول محاسبه شد که معادل ۰/۷۶±۲۸ ساعت می‌باشد.

کشت اسفروییید و محاسب زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید: برای بدست آوردن مدت زمان تیمار دارویی Iudr، زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید مطابق روش توضیح داده شده در بخش فوق محاسبه شد. شکل شماره ۱ تصویر اسفروییدی سلولهای U87MG به قطر ۳۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد.

به منظور رسم منحنی رشد اسفروییید، میانگین حجم به دست آمده به صورت نیمه لگاریتمی برحسب زمان ترسیم شد. شکل ۲ نمودار رشد اسفروییید را در طی ۳۸ روز نشان می‌دهد. از روی شیب خط قالب شده به فاز لگاریتمی زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید محاسبه شد که معادل ۰/۹۶±۶۵ ساعت به دست آمد.



شکل شماره ۱– نمائی از اسفروییید سلول‌های U87MG به قطر ۳۰۰ میکرون با بزرگ‌نمایی ۴۰x



شکل شماره ۲– نمودار رشد حجمی اسفروییدهای سلول‌های U87MG در محیط کشت MEM حاوی ۱۰ درصد FCS، زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید با استفاده از شیب خط قالب شده به فاز لگاریتمی منحنی(روزهای ٤ تا ۲۵) محاسبه شد. این منحنی میانگین سه بار تکرار آزمایش همچنین مقادیر انحراف معیار(SEM) حاصل سه بار تکرار می‌باشد.

بررسی میزان آسیب وارد شده به DNA اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر به واسطه تیمار دارویی طی یک، دو و سه بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید:

به منظور بررسی آسیب‌های وارد شده به DNA طی یک، دو و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروییدها، اسفروییدهای با قطر متوسط ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را ٦۵، ۱۳۰ و ۱۹۵ ساعت تحت تیمار با Iudr قرار داده و پس از پرتودهی با ۲Gy پرتو گاما ^{60}Co، میزان آسیب‌های DNA سلول‌ها توسط روش کامت قلیایی بررسی شد.

اشکال ۳ و ٤ به ترتیب تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلئورسانس حاصل از تست کامت را در اسفروییدهای قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد که طی سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید تحت تیمار داروی Iudr قرار گرفته‌اند.

همانطوری که در اشکال شماره ۳ و ٤ مشاهده می‌شود در شکل(الف) که نمونه کنترل می‌باشد آسیبی مشاهده

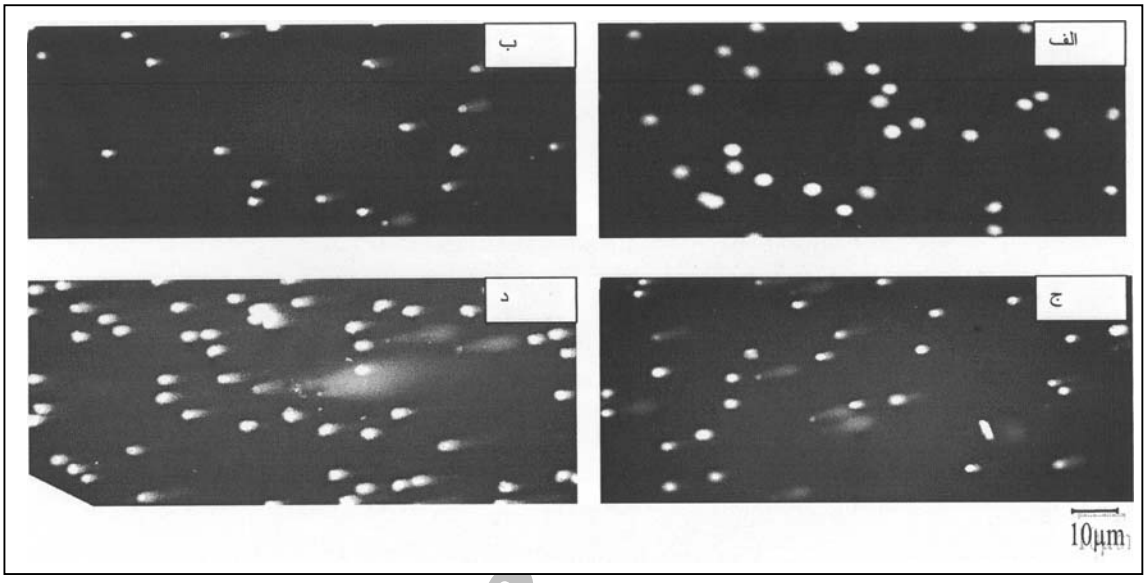
Archive of SID

www.SID.ir

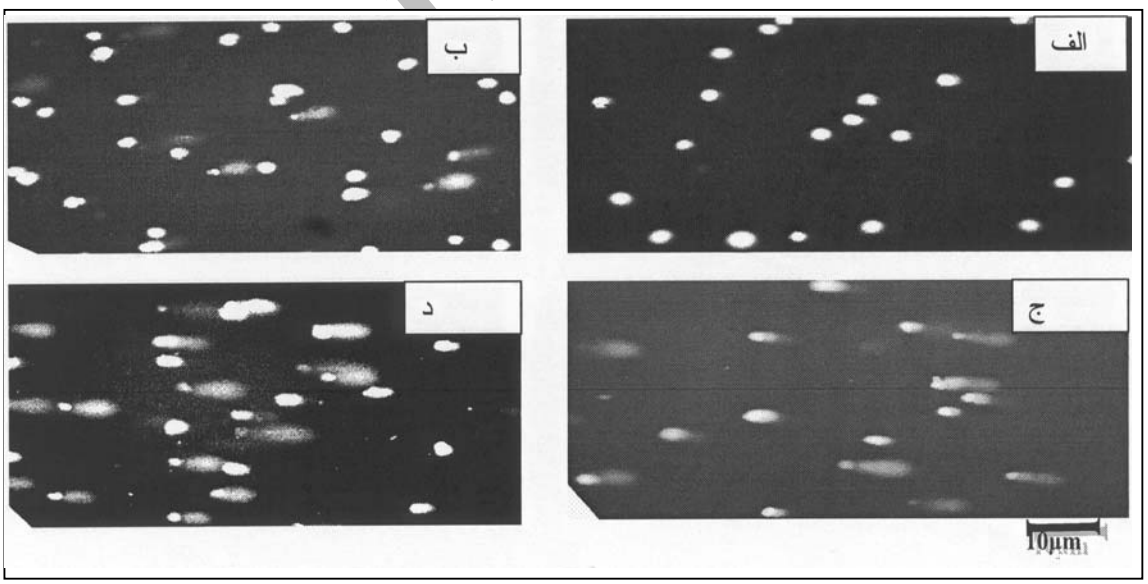
نمی‌شود. در صورتی که در شکل(ب) که نمونه تیمار با Iudr می‌باشد، آسیب مشاهده می‌شود.

شکل(ج) که نمونه پرتو داده با گاما می‌باشد، آسیب بیشتری را نشان می‌دهد. در شکل(د) که نمونه پرتو داده به همراه Iudr می‌باشد، آسیب بیشتری نسبت به گروه‌های قبلی مشاهده می‌شود.

در مقایسه شکل شماره ۳ با شکل شماره ٤ مشاهده می‌شود که با افزایش قطر اسفروییید در نمونه کنترل(شکل الف)، تغییری در میزان آسیب مشاهده نمی‌شود. در حالی که در نمونه‌های انکوبه شده با دارو، پرتو دیده و پرتو دیده به همراه دارو(شکل ب، ج، د) با افزایش قطر اسفروییید از میزان آسیب وارد به DNA کاسته شده است.



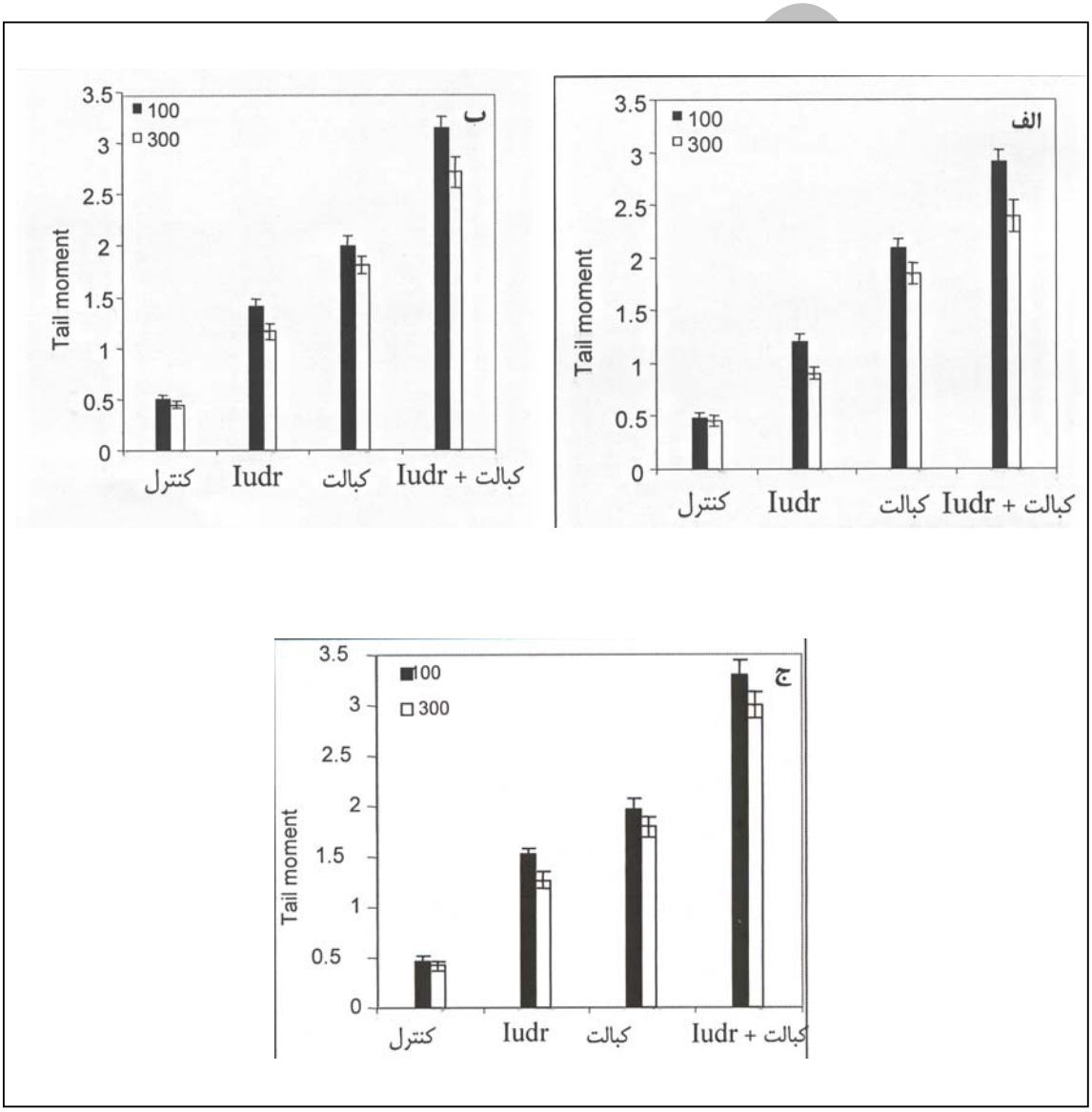
شکل شماره ۳- نمونه تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسانت حاصل از تست کامت از سلول‌های U87MG در مدل کشت اسفروییید با قطر ۱۰۰ میکرومتر که طی یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید تحت تیمار با Iudr قرار گرفتند. شکل(الف) نمونه کنترل، شکل(ب) نمونه تیمار با Iudr، شکل(ج) نمونه پرتو دیده و شکل(د) نمونه پرتو دیده به همراه Iudr.



شکل شماره ۴- نمونه تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسانت حاصل از تست کامت از سلول‌های U87MG در مدل کشت اسفروییید با قطر ۳۰۰ میکرومتر که طی سه بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید تحت تیمار با Iudr قرار گرفتند. شکل(الف) نمونه کنترل، شکل(ب) نمونه تیمار با Iudr، شکل(ج) نمونه پرتو دیده و شکل(د) نمونه پرتو دیده به همراه Iudr.

www.SID.ir

مقایسه نتایج تیمار دارویی و پرتودهی دو گروه اسفرویید با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر: شکل ۵ مقایسه نتایج حاصل از دو گروه اسفرویید به قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را طی ٦٥ ساعت(الف)، ۱۳۰ ساعت(ب) و ۱۹۵ ساعت(ج) انکوباسیون با Iudr نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، در دو گروه از نمونه‌ها یعنی نمونه‌های تیمار شده با Iudr و نمونه‌های پرتو دیده با گاما، میزان آسیب‌های وارده به DNA در اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر طی هر سه زمان انکوباسیون دارویی با اختلاف معنی‌داری($p<0/05$) بیشتر از اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر است. در گروه پرتو دیده به همراه Iudr در طی یک زمان انکوباسیون اسفروییدها، میزان آسیب در DNA سلول‌های با قطر ۱۰۰ میکرومتر با اختلاف معنی‌داری($p<0/05$) بیشتر از آسیب‌های وارده در اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر است.



شکل شماره ۵– نمودار مقایسه Tail Moment در اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر مربوط به نمونه های کنترل، تیمار شده با Iudr. پرتو دیده و پرتو دیده به همراه Iudr در این نمونه‌ها اسفروییدها طی ٦٥(الف) و ۱۳۰(ب) ۱۹۵(ج) ساعت تحت تاثیر Iudr قرار گرفتند(آزمایشها سه بار تکرار شده‌اند، از انحراف معیار میانگین(SEM) سه بار تکرار استفاده شده است).

www.SID.ir

همچنین در این گروه، میزان آسیب‌های وارد شده به DNA در طی دو و سه زمان دو برابر شدن، در اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر با اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) بیشتر از اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر است.

نمایش تعداد سلول‌های آسیب دیده با استفاده از روش کامت: پس از انجام روش کامت قلیایی و رنگ‌آمیزی سلول‌ها، از سلول‌ها عکسبرداری شده(از هر لام حداقل در سه میدان) و tail moment سلول‌ها توسط نرم‌افزار comet score اندازه‌گیری شدند.

به منظور مقایسه میزان آسیب‌های وارده به DNA در اثر افزایش زمان انکوباسیون، در گروه پرتو دیده با گاما به همراه Iudr درصد سلول‌هایی که میانگین tail moment آنها از میانگین tail moment گروه پرتو دیده با گاما به تنهایی بیشتر است محاسبه شد.

جدول ۱ نمایشگر نتیجه حاصل از این محاسبات است. همانطوریکه مشاهده می‌شود افزایش زمان تیمار افزایش بیشتر tail moment را در سلول‌های هر دو گروه اسفروئیدی‌های با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد. از سوی دیگر میزان افزایش tail moment ناشی از افزایش زمان تیمار Iudr، در اسفروییدهای ۳۰۰ نسبت به اسفروییدهای ۱۰۰ بیشتر است. این نشان می‌دهد که افزایش زمان تیمار با Iudr در اسفروییدهای با قطر بیشتر موثرتر است.

جدول شماره ۱- میزان آسیب‌های ناش از پرتو گاما در حضور Iudr در زمان‌های مختلف انکوباسیون اسفروییدها با داروی Iudr

قطر اسفرویید	زمان انکوباسیون اسفروییدها با Iudr و درصد افزایش آسیب		
	۶۵ ساعت	۱۳۰ ساعت	۱۹۵ ساعت
۱۰۰ میکرومتر	٪۶۰	٪۶۶	٪۷۰
۳۰۰ میکرومتر	٪۵۱	٪۶۱	٪۶۸

بحث

پرتو درمانی با تشعشع خارجی، در درمان اکثر سرطان‌ها از اهمیت و جایگاه خاصی برخوردار است. در جهت استفاده بهینه از پرتودرمانی، امروزه شیوه‌های ترکیبی جهت کاهش دوز پرتوی بافت‌های سالم و در عین حال افزایش آسیب‌های تومور، مد نظر اکثر محققین قرار گرفته است. یکی از این عوامل، حساس کننده‌های پرتوی Iudr می‌باشد. این دارو، اختصاصاً توسط سلول‌های در حال تقسیم که در فاز سنتز باشند برداشت می‌شود. لذا، سلول‌های سرطانی و طبیعی هر دو قادر به دریافت این دارو می‌باشند. استفاده از این عوامل دارویی مختص بافت‌های سرطانی می‌باشد که سلول‌های اطراف از قدرت تقسیم کمی برخوردار باشند.

گلیوما، از نظر تئوری بهترین گزینه برای این روش درمانی می‌باشد. یکی از شکست‌های عمده در پرتو درمانی، وجود سلول‌های هایپوکسیک و سلول‌های با زمان چرخه طولانی است، که از دسته سلول‌های مقاوم به پرتو می‌باشند. اسفرویید به عنوان مدل چند سلولی سیستم بافت سرطانی، با دسته سلول‌های غیر همگن، مدل مناسبی برای بررسی این دسته از سلول‌های می‌باشد.[۹] با توجه به اینکه اکثر عوامل سیتوژنتیک شکست‌های تک رشته‌ای ایجاد می‌کنند لذا تکنیک سنجش کامت قلیایی، که براساس شکست‌های تک رشته‌ای DNA عمل می‌کند، یک روش استاندارد و قابل اطمینان در جهت بررسی مقاومت پرتوی سلول‌های سرطانی می‌باشد.[۱۰و ۱۱]

مطالعات در مدل کشت تک لایه نشان داده است که غلظت یک میکرومولار Iudr به همراه تابش پرتو گاما در مدل کشت تک لایه سلول‌های گلیوما، سبب افزایش حساسیت پرتوی سلول‌ها می‌شود. همچنین میزان صدمات سلولی در فاز نمائی بیشتر از فاز ثابت است.[۱۲] همچنین مطالعات نشان داده است که غلظت یک میکرومولار در اسفروییدها هم غلظت مناسبی برای ایجاد حساسیت پرتوی است.[۷]

آزمایشهای انجام شده بر روی اسفروییدهایی با قطرهای مختلف نشان داده است که میزان برداشت در اسفروییدهای با قطر بزرگتر نسبت به اسفروییدهای با قطر کوچکتر کمتر است.[۷]

از عوامل کاهش برداشت Iudr در اسفروییدهای با قطر بزرگتر، وجود ناهمگونی در سلول‌های مناطق مختلف

Archive of SID
www.SID.ir

اسفرویید است. ناهمگونی در چرخه سلولی به دلیل افزایش قطر اسفرویید و کاهش میزان دسترسی سلول‌ها به مواد غذایی و اکسیژن ایجاد می‌شود، که سبب ایجاد دسته سلول‌های با زمان‌های چرخه سلولی طولانی و سلول‌های هایپوکسیک می‌شود.

افزایش زمان چرخه سلولی سبب می‌شود که این دسته از سلول‌ها نتوانند در یک زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید، Iudr را برداشت نمایند. در صورتی که در اسفروییدهای با قطر کمتر ناهمگونی سلولی مشاهده نمی‌شود، لذا در زمان‌های اولیه انکوباسیون بیشترین برداشت را دارند.

مطالعات اتورادیوگرافی نشان داده است که در اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرون، ۵۲ درصد از سلول‌ها طی یک زمان دو برابر شدن Iudr را برداشت کرده‌اند.[۷] در این آزمایش نشان داده شد که پرتودهی در حضور Iudr طی یک زمان دو برابر شدن، میزان آسیب به DNA را ۵۱ درصد نسبت به زمانی که فقط از پرتو به تنهایی استفاده شده افزایش می‌دهد. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است، که به واسطه افزایش زمان انکوباسیون Iudr از یک زمان دو برابر شدن به چهار زمان دو برابر شدن، میزان برداشت Iudr در اسفروییدهای با قطر بزرگ به میزان ۲۱ درصد افزایش می‌یابد.[۷] نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده است که با افزایش زمان انکوباسیون از یک زمان دو برابر شدن به سه زمان دو برابر شدن در اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر، میزان آسیب سلولی از ۵۱ درصد به ۶۸ درصد افزایش یافته است. با مقایسه این دو نتیجه می‌توان گفت که Iudr به همان اندازه‌ای که توسط سلول برداشت شود، باعث افزایش حساسیت پرتوی و آسیب رسانی به DNA سلول می شود. از سوی دیگر، نتایج بدست آمده(جدول شماره ۱) نشان داده است که میزان صدمات پرتوی DNA سلول در اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر در حضور Iudr در مقایسه با تابش پرتو گاما، به تنهایی از ۵۱ درصد در طی ۶۵ ساعت انکوباسیون به ۶۸ درصد در طی ۱۹۵ ساعت انکوباسیون افزایش یافته است. در صورتی که میزان صدمات پرتوی در حضور Iudr در اسفروییدهای به قطر ۱۰۰ میکرومتر از ۶۰ درصد در طی ۶۵ ساعت به ۷۱ درصد در طی ۱۹۵ ساعت افزایش یافته است.

در اسفرویید با قطر ۳۰۰ میکرومتر، به دلیل وجود سلول‌های با چرخه طولانی‌تر نسبت به اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر، با افزایش زمان انکوباسیون این سلول‌ها نیز قادر به برداشت Iudr خواهند شد. به همین دلیل با افزایش زمان انکوباسیون، میزان افزایش آسیب در اسفروییدهای به قطر ۳۰۰ میکرومتر بیشتر از اسفروییدهای به قطر ۱۰۰ میکرومتر است. زیرا، اکثر سلول‌ها در اسفرویید به قطر ۱۰۰ میکرومتر در طی یک زمان دو برابر شدن، قادر به برداشت Iudr بوده و در نتیجه بیشترین آسیب طی اولین زمان انکوباسیون ایجاد می‌شود.

با توجه به اینکه هدف از به کاربردن حساس کننده‌های پرتوی، افزایش صدمات پرتوی سلول‌های سرطانی و کاهش صدمات به سلول‌های سالم اطراف تومور می‌باشد. همچنین از آنجایی که Iudr به تنهایی سبب ایجاد آسیب به سلول‌ها می‌شود، لذا باید زمان انکوباسیون را تا اندازه‌ای افزایش داد که با حداقل دوز پرتوی ضمن افزایش آسیب به سلول‌های سرطانی، به سلول‌های سالم آسیب نرسد.

نتایج حاصله نشان داده است که افزایش زمان انکوباسیون در هر دو قطر اسفرویید مورد مطالعه از یک زمان دو برابر شدن به دو زمان دو برابر شدن، میزان صدمات سلولی را با افزایش معنی‌داری افزایش می‌دهد. در حالی که افزایش زمان انکوباسیون از دو به سه زمان دو برابر شدن، افزایش معنی‌داری را نشان نداده است.

با توجه به اینکه در کلینیک با مجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی و طبیعی سروکار داشته و با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان به این نتیجه رسید که بهترین زمانی که می‌توان با تیمار Iudr و حداقل دوز تابشی، حداکثر حساسیت سلولی را ایجاد کرد، زمان ۱۳۰ ساعت(یعنی به اندازه دو بار زمان دو برابر شدن حجم اسفرویید) می‌باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان داده است که انکوباسیون سلول‌ها طی دو زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، نسبت به یک و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، زمان مناسب‌تری جهت ایجاد حساسیت پرتوی است.

فهرست منابع

1- Schultz CA Metha, MCGinn MP, Robins CJ, Badie HA, Volkman B. Continuous 28-day iododeoxyuridine infusion and hyper fractionated accelerated radiotherapy for malignant glioma: a phase 1 clinical study. Int J Radiat oncol. Biol. Phys 2004 Jul; 15; 59(4): 1107-15.

2- Taverna P, Hwang HS, Schupp JE, Radivoyevitch T, Session NN, Reddy G, et al. Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. Cancer Res 2003; 63: 838-46.

3- Kalia VK. Optimizing radiation therapy of brain tumours by combination of 5-bromo-2-deoxy-uridine & 2-deoxy-D-glucose. Indian J Med Res 1999; 109: 182-7.

4- Yan T, Seo Y, Schupp JE, Zeng X, Desai AB, Kinsella TJ. Methoxyamine potentiates iododeoxyuridine-induced radiosensitization by altering cell cycle kinetics and enhancing seneseence. Mol Cancer Ther 2006; 5: 893-902.

5- Fornace AJ Jr, Dobson PP, Kinsella TJ. Enhancement of radiation damage in cellular DNA following unifilar substitution with iododeoxyuridine. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1990; 18(4): 873-8.

6- Gene M, Castro Kreder N, Barten-van Rijbroek A, Stalpers LJ, Haveman J. Enhancement of effects of irradiation by gemcitabine in a glioblastome cell line and cell line spheroids. J Cancer Res Clin Oncol 2004; 130: 45-51.

7- Neshasteh riz A, Angerson WJ, Reeves JR, Smith G, Rampling R, Mairs RJ. Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: electron emitters. Br J Cancer 1997; 75(4): 493-9.

8- Olive PL, Banath JP.The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. Nat Protoc 2006; 1: 23-9.

9- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. J Cell Biol 1988; 106(4): 1331-48.

10- Olive PL, Durand RE. Hetrogeneity in DNA damage using the comet assay. Cytometry A 2005 Jul; 66(1): 1-8.

11- Oloumi A, Lam W, Banath JP, Olive PL. Identification of genes differentially espressed in V79 cells grown as multicell spheroids. Int J Radiat Biol 2002; 78(6): 483-92.

12- Neshasteh-Riz A, Mairs RJ, Angerson WJ, Stanton PD, Reeves JR, Rampling R, et al. Differential cytotoxicity of 123 Iudr, 125Iudr, 131Iudr to human glioma cells in monolayer or spheroid culture: effect of proliferative heterogeneity and radiation cross-fire. Br J Cancer 1998, 77(3): 385-93.

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of the Extent of Cytogenetic Damage Induced by Ionizing Radiation at Different Intervals of Cell Incubation with Iudr in Spheroid Model of Glioblastoma Cell Line Using Comet Assay

***A. Neshasteh-Riz, PhD** [I] **N. Bishesari, MSc** [II] **S. Khoei, PhD** [III]

Archive of SID

Abstract

Background & Aim: 5-iodo-2-deoxyuridine(Iudr) is a thymidine analog that is known as a radiosensitizer for human cancer cells in in vitro and in vivo studies. The investigations on the spheroid have shown that Iudr uptake of cells increases with the increasing Iudr incubation time. The aim of this study was to evaluate the extent of cytogenetic damage induced by ionizing radiation at different intervals of cell incubation with Iudr using comet assay.

Material and Method: In this basic experimental study, U87MG, a Glioblastoma cell line was cultured as spheroid in two different sizes, 100 and 300μm. The spheroids were incubated with Iudr in three different volume doubling times. Then they were irradiated by 2Gy of gamma radiation of cobalt 60. The extent of DNA damage was measured using alkaline comet assay and the data were analyzed by Students' t-test.

Results: The results showed the extent of DNA damage induced by gamma radiation in combination with Iudr was greater in spheroids with 300μm of diameter than spheroids with 100μm of diameter. Investigations revealed that the DNA damage after two volume doubling times of incubation with Iudr is significantly more than one volume doubling time of incubation in two different sizes of spheroids, but the extent of damage in spheroids with 300μm of diameter was larger. However, there is no significant difference between the DNA damage after incubation for two and three volume doubling times.

Conclusion: As it can be seen, two-volume-doubling-time incubation of cells is more suitable than one or three volume doubling times to develop radiation sensitivities.

Key Words: **1) Glioblastoma** **2) Spheroid** **3) Iudr** **4) Comet**

***I*)** *Associate Professor of Medical Physics. Radiology Department. Faculty of Paramedical Sciences. Shahid Hemmat Expressway. Shahid Chamran Crossroad. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.(*Corresponding Author)*
***II*)** *MS in Medical Physics.*
***III*)** *Assistant Professor of Biophysics. Department of Medical Physics. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.*

www.SID.ir