

تأثیر دُزهای مختلف پرتوگاما و زمان انکوباسیون بعد از تابش بر القای آپوتوز در سلولهای کارسینوم پستان انسان

نوروز دلیرز *M.Sc.، سید محمد مؤذنی Ph.D.، فاضل شکری Ph.D.*

محمد علی شکرگزار Ph.D.، مرتضی عطری M.D.*

✧ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

✧ دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی

✧ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه ایمنی شناسی

✧ انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران

✧ دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان امام خمینی، انستیتو کانسر

✧ آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

چکیده

✧ **هدف:** مطالعه تأثیر دُزهای مختلف تابش گاما و زمان انکوباسیون بعد از تابش بر القای آپوتوز در رده سلولی کارسینوم پستان (T-47D) (Invasive ductal carcinoma)

✧ **مواد و روشها:** رده سلولی T-47D در فلاسک T25 کشت داده شده بعد از رسیدن به مرحله رشد لگاریتمی و شمارش سلولهای موجود در هر فلاسک تحت تابش پرتوگاما با دُزهای ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶ گری قرار گرفت. از داروی اتوپوزاید بعنوان شاهد مثبت القای آپوتوز و سلولهایی که تحت هیچگونه تیماری قرار نگرفته بودند بعنوان شاهد منفی استفاده شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از پرتودهی، سلولها برداشت و بعد از شمارش تعداد آنها، با رنگ H042/PI برای بررسی میکروسکوپی و یا رنگ AO/PI برای انجام فلوسیتومتری رنگ آمیزی شدند. درصد سلولهای زنده، آپوتوتیک و مرده با استفاده از دو روش مذکور تعیین و با توجه به تعداد کل سلولهای موجود در هر فلاسک تعداد این نوع سلولها نیز مشخص شد. این آزمایش چندین بار تکرار شده، نتایج آن بصورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش گردید.

✧ **یافتهها:** تابش گاما بصورت وابسته به دُز و زمان باعث کاهش رشد سلولهای T-47D می‌گردد. که این کاهش با کندی تکثیر آنها تا ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی مشخص گشته و بعد از این زمان علائم مرگ مشاهده می‌شد. درصد القای آپوتوز تا دُز ۸ Gy افزایش یافته، پس از آن با افزایش دُز کاهش نشان می‌دهد. این روند تا ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی ادامه یافته سپس رو به کاهش می‌گذارد. بنابراین بالاترین میزان آپوتوز با دُز ۸ Gy و بعد از ۴۸ ساعت حاصل می‌شود. درصد سلولهای زنده و مرده نیز بصورت وابسته به دُز و زمان به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد.

✧ **نتیجه‌گیری:** تابش اشعه گاما باعث القای آپوتوز در سلولهای T-47D می‌گردد و میزان آن با دُز پرتو رابطه دارد. این رابطه خطی نبوده در دُزهای بالاتر معکوس می‌گردد. بر عکس، رابطه درصد سلول زنده و مرده (مراحل انتهایی آپوتوز و نکروز شده) با دُز پرتو خطی بوده با افزایش دُز بترتیب کاهش و افزایش پیدا می‌کند.

کل واژگان: کارسینوم پستان، آپوتوز، تابش گاما

مقدمه

مرگ سلول به دو شکل متمایز ریخت شناختی و بیوشیمیایی یعنی نکروز و آپوپتوز صورت می‌گیرد (۱، ۲). نکروز را که زمانی تصور می‌شد شکل عمومی مرگ سلولی است، امروزه نتیجه آشفنگی در محیط ظریف اطراف سلول می‌دانند، در صورتی که آپوپتوز معمولاً تحت شرایط فیزیولوژیک اتفاق می‌افتد که در آن مرگ سلول یا برنامه ریزی شده بوده و یا در پاسخ به تحریکات ملایم آسیب شناختی و پایین‌تر از حد مرگ آور به وقوع می‌پیوندد.

آپوپتوز در اغلب موارد بعنوان ساز و کار خودکشی سلول در نظر گرفته می‌شود زیرا بسیاری از سیستمهای سلول در حال مرگ از طریق ستر RNA، پروتئین و پروتئین کینازها در این امر مشارکت می‌کنند (۳). علاقه به مطالعه این نوع از مرگ سلول از آنجا ناشی می‌شود که نقش مهمی در ایجاد بافتها و اندامهای جنینی (۴)، تنظیم سیستم ایمنی (۵) و یا مرگ طبیعی سلولهای تمایز یافته دارد (۶). در سرطان‌شناسی علاقه به آپوپتوز از آنجا ناشی می‌شود که در اغلب موارد پرتوهای یون ساز و داروهای ضد سرطان در واکنش با اهداف داخل سلولی خود این نوع از مرگ سلولی را باعث می‌شوند و کارایی بسیاری از این داروها با توانایی آنها در القاء آپوپتوز ارتباط دارد (۷)، از طرفی از آنجایی که به هم خوردن فرآیند آپوپتوز می‌تواند باعث بروز بدخیمی در برخی تومورها گردد، این پدیده کانون توجه سرطان شناسان قرار گرفته است (۸، ۹).

مطالعات سیستمیک آپوپتوز بعد از پرتو دهی در سلولهای بدخیم عمدتاً به تومورهای موش (۱۰) و سلولهای لوسمی انسانی (۱۱) محدود شده است. از میان ۶ رده سارکومای انسانی که تاکنون مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، آپوپتوز ناشی از پرتوهای یون ساز در دو رده از آنها اتفاق افتاده است. در یک مطالعه دیگر نیز پرتو دهی ۱۴ رده از سلولهای گلیومای انسانی تغییرات آپوپتوتیک قابل ملاحظه‌ای در پی نداشته است (۱۲)، از طرفی آسیب ناشی از پرتوها بعنوان عامل قدرتمندی برای القای آپوپتوز در تعدادی از انواع سلولها بویژه تیموسیتها شناخته شده است (۱۳). سلولهای کارسینوم به تأثیرات پرتوهای یون ساز مقاوم ترند و مطالعه‌ای که اخیراً با استفاده از دُز بالای پرتوگاما (> ۱۲Gy) انجام گرفته نشان می‌دهد این مقدار پرتو مرگ قابل ملاحظه‌ای را در برخی (ولی نه همه) رده‌های سلولی کارسینوم ایجاد می‌نماید (۱۴).

بر اساس وقایعی که طی فرآیند آپوپتوز اتفاق می‌افتد روشهای متعددی جهت شناسایی آپوپتوز مبتنی بر بررسی ریخت شناختی سلول (۱۵)، فعالیت اندامکهای سلولی (۱۶) و تغذیه‌پذیری غشاء (۱۵، ۱۷) بکار رفته است (۱۸). از بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ نوری، آنالیز قطعات DNA با استفاده از الکتروفورز در ژل و سنجش کمی DNA (۱۷)، روشهای شاندار کردن DNA در محل (۱۹)، آنالیز کروماتین هسته بوسیله رنگهای فلورسانسی که DNA را رنگ می‌کنند و فلوسیتومتری (۱۸) بعنوان برخی از این روشها نام برد. در این میان مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بعنوان روش استاندارد طلایی مطرح می‌باشد. یکی از روشهای متداول تشخیص آپوپتوز رنگ آمیزی سلولها بویژه هسته آنها با رنگهای فلورسانس و مشاهده

میکروسکوپی آنهاست، از جمله دی‌استات فلورسین، آکریدین نارنجی، اریتروزین B، اتیدیوم برومید، هوست ۳۳۳۴۲ و پروپیدیوم. بداید از جمله مهمترین این رنگها هستند (۱۸، ۲۰، ۲۱).

روش دیگری که اخیراً بطور گسترده‌ای برای تشخیص آپوپتوز و نیز تمایز سلولهای زنده، آپوپتوتیک و مرده مورد استفاده قرار گرفته، روش فلوسیتومتری می‌باشد. در این روش با استفاده از رنگ آمیزی DNA سلول و یا آنتی ژنهای سطحی آن بوسیله مواد فلورسانس میزان القاء آپوپتوز و مراحل مختلف این فرآیند مورد بررسی قرار می‌گیرد (۲۲، ۲۳).

روشن شدن سازوکارهای دقیق القاء و مهار آپوپتوز و شناسایی کانیزمهای مداخله‌گر می‌تواند در طراحی و به کارگیری روشهای جلوگیری از ناهنجاریهای مادرزادی، نقصهای ایمنی و درمان سرطان راه گشا باشد. همانگونه که پیشتر گفته شد، مطالعات مختلف نشان داده است که پرتوهای یون ساز نه تنها باعث القاء آپوپتوز می‌شوند بلکه نحوه اثرگذاری پرتو در ارتباط با القاء آپوپتوز، به نوع پرتو (گاما، UV، Xو غیره) دُز آن، نوع سلول، مدت زمان پرتو دهی و زمان انکوباسیون بعد از آن بستگی دارد (۲۶-۲۳). لذا به نظر می‌رسد بایستی تأثیر پرتوهای یون ساز بر القاء آپوپتوز در مورد سلولهای مختلف به صورت مجزا آزمایش شود. در این مطالعه تأثیر تابش اشعه گاما در القاء آپوپتوز در رده سلولی کارسینوم پستان (T-47D) بررسی شده است. بدین ترتیب که با تابش دُزهای مختلف و دوره انکوباسیون متفاوت بعد از پرتو دهی میزان تأثیر تابش گاما در القاء آپوپتوز و نیز اثرات دُز و زمان انکوباسیون بعد از پرتو دهی مشخص گشت. به منظور تعیین درصد و تعداد سلولهای زنده، آپوپتوتیک و مرده نیز از دو روش رنگ آمیزی با PI/HO42 و مشاهده میکروسکوپی و نیز رنگ آمیزی با PI/AO و استفاده از دستگاه فلوسیتومتری بهره گرفته شده است.

مواد و روشها

* الف) کشت سلول

رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه (T-47D) از کارسینوم مجرای پستان انسان (Invasive ductal carcinoma) حاصل شد. این رده از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران (NCBI) تهیه گردید. سلول در فلاسک T25 (شرکت NUNC - دانمارک)، و در محیط کشت DMEM (شرکت Gibco - آلمان)، که حاوی ۱۰ درصد FCS (شرکت Seromed - اسکاتلند)، ۱۰۰ U/ml پنی سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین (شرکت Sigma - آمریکا)، در انکوباتور ۳۷°C، حاوی ۵ درصد CO2 و ۹۰ درصد رطوبت کشت شد. در شروع کشت در هر فلاسک ۵x۱۰^۵ سلول ریخته شده و زمانیکه رشد سلولها به مرحله لگاریتمی رسید جهت پرتو دهی و انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سلولهای موجود در هر فلاسک و میزان زنده بودن آنها (Viability)، در زمان پرتو دهی و هنگام مطالعه میکروسکوپی و انجام فلوسیتومتری شمارش و تعیین گردید.

* ب) پرتو دهی گاما

پرتو دهی زمانی انجام گرفت که رشد سلولها در مرحله لگاریتمی

Sigma - آمریکا) ($0.1 \mu\text{M}$) به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C انکوبه و رنگ آمیزی گردیدند. سپس با رنگ PI (شرکت Sigma - آمریکا) ($1/5 \mu\text{M}$) به مدت ۵ دقیقه در 37°C انکوبه (۲۷) و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتر آنالیز شدند. دستگاه مورد استفاده، FACS Calibur (شرکت Becton-Dickinson - آمریکا) با یک لیزر آرگون بود و هر دو رنگ با طول موج (488nm) تحریک می‌شدند، ولی نور منتشر شده از PI و AO به ترتیب با فیلترهای $525/20 \text{ nm}$ (FL1) و $575/26 \text{ nm}$ (FL2) جمع‌آوری گردید. روی هم افتادگی طول موج رنگها با استفاده از نمونه‌های شاهد رنگ آمیزی نشده و آنهایی که فقط با یک رنگ، رنگ آمیزی شده بودند، تعیین گردید. برای استخراج و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Cell Quest استفاده شده تعداد 10000 سلول شمارش و جمع‌بندی حاصل به شرحی که در جدول ۲ آمده است طبقه بندی گردید. لازم به ذکر است که با تعیین آستانه مناسب برای Forward Scatter (FSC) زوائد سلولی حذف و در محاسبه منظور نگردید (۲۸).

یافته‌ها

در این مطالعه به منظور بررسی اثرات تابش اشعه گاما و انکوباسیون بعد از آن در القاء آپوپتوز، سلولهای رده T-47D که از کارسینوم سرطان پستان مشتق شده‌اند، در فلاسک‌های T25 کشت داده شده (5×10^5) سلول در هر فلاسک) و در مرحله لگاریتمی رشد که $80-90\%$ درصد از سطح فلاسک با سلول پر شده بود تحت تابش پرتو گاما (^60Co) قرار گرفتند. دُز پرتو تابیده شده 12 Gy ، 8 Gy ، 4 Gy و 16 Gy بود. از سلولهایی که تحت تأثیر داروی آپوپتوز قرار گرفته بودند و آنهایی که تحت هیچ نوع تیماری قرار نداشتند به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید. به هنگام شروع کشت، پرتو دهی و نیز موقع بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری تعداد سلولهای موجود در هر فلاسک شمارش گردید (جدول ۳). بعد از پرتو دهی، سلولها به مدت 24 ، 48 و 72 ساعت در 37°C انکوبه شده و به دو روش مطالعه میکروسکوپی و فلوسیتومتری درصد و تعداد سلولهای زنده (L)، آپوپتوتیک (Ap) و مرده (D) تعیین گردید. به منظور مطالعه تغییرات ریخت شناختی مرتبط با آپوپتوز به وسیله میکروسکوپ فلورسانس از رنگ آمیزی با رنگهای HO42 و PI استفاده گردید. HO42 یک رنگ حیاتی و فلورسانس است که نور آبی (461 nm) از خود ساطع می‌کند و با این رنگ هسته سلولهای طبیعی آبی کم‌رنگ و مات، هسته سلولهایی که در مراحل اولیه آپوپتوز قرار دارند به رنگ آبی روشن و درخشان و به صورت تکه تکه و متراکم مشاهده می‌گردد. رنگ فلورسانس PI نیز، نور قرمز (617 nm) از خود ساطع می‌کند. با این رنگ هسته سلولهایی که در مراحل نهایی آپوپتوز قرار دارند به رنگ قرمز، تکه‌تکه و متراکم دیده می‌شود. در حالی که، هسته سلولهای نکروتیک متورم و به رنگ قرمز مشاهده می‌گردد (شکل ۱).

قرار داشت. برای پرتو دهی از منبع ^{60}Co (AECL - کانادا) و گاماسل 220 (شرکت Nordin - کانادا)، موجود در مرکز تابش گامای سازمان انرژی اتمی ایران استفاده شد. نرخ دُز^۱ مورد استفاده 2137 Gy/S و میزان دُز انتقال^۲ 848 Gy بود. پرتو دهی به صورت یکنواخت و در دمای اتاق انجام گرفت. سلولها در ۴ گروه و به ترتیب 8 Gy ، 4 Gy ، 12 Gy ، 16 Gy پرتو دریافت کردند، زمان پرتو دهی به ترتیب 15 ، 33 ، 52 و 70 ثانیه بود و هر گروه نیز در سه نوبت به ترتیب 24 ، 48 و 72 ساعت بعد از پرتو دهی مورد بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری قرار گرفتند. به این ترتیب در مجموع ۱۲ گروه آزمایشی وجود داشت. برای هر گروه نیز سلولهایی که پرتو دهی نشده بودند و سلولهایی که $40 \mu\text{g/ml}$ داروی آپوپتوز (Vp16) (شرکت Sigma - آمریکا) دریافت کرده بودند، به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایشات حداقل در ۵ نوبت تکرار شده نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه گردید.

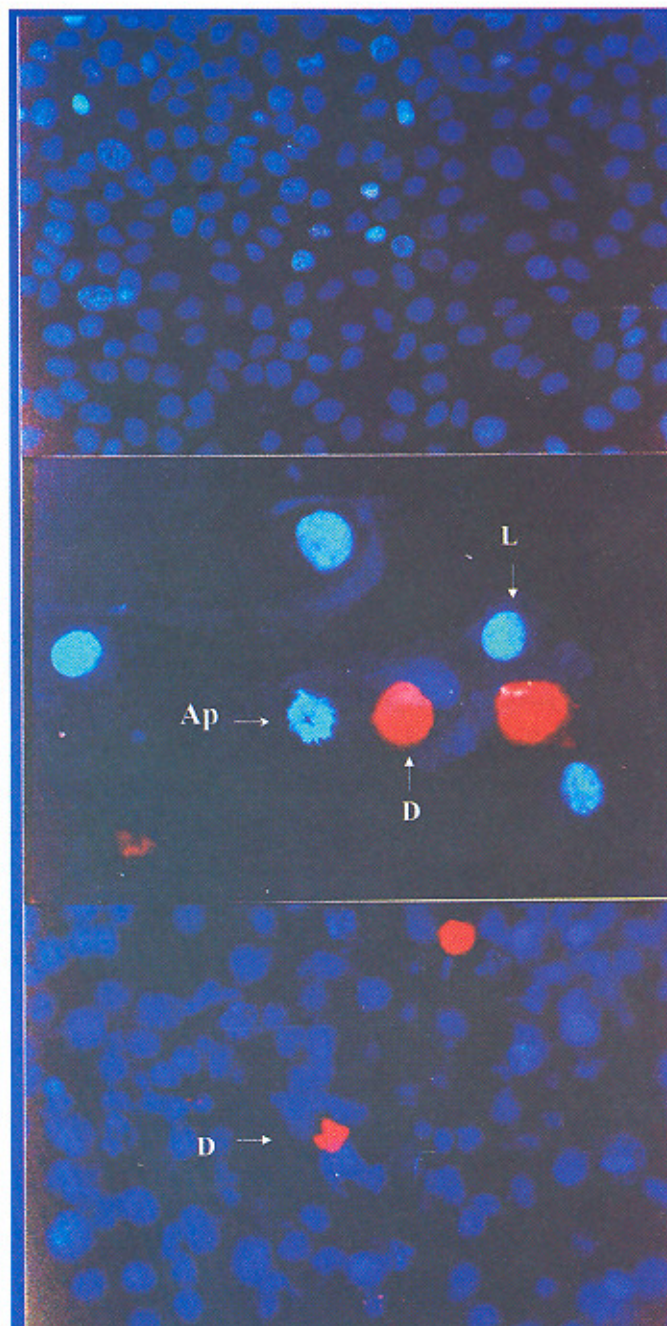
ج) مطالعه میکروسکوپی

فلاسکهای حاوی سلولهای شاهد منفی و مثبت و فلاسکهایی که در دُزهای مختلف پرتو دهی شده بودند بعد از 24 ، 48 و 72 ساعت انکوباسیون در انکوباتور 37°C ، 90% درصد رطوبت و 5% درصد CO_2 با استفاده از روش Meijer (۲۷) با کمی تغییرات به وسیله رنگهای HO42 و PI (هر دو از شرکت Sigma - آمریکا) رنگ آمیزی گردید. به طور خلاصه سلولهای تک لایه‌ای داخل فلاسک با استفاده از تریسین ($25/0$ درصد) (شرکت Seromed - آمریکا)، به صورت سوسپانسیون در آمده بعد از دو بار شستشو با PBS سوسپانسیونی حاوی 10^6 cells/ml نهیبه گردید (در بعضی موارد نیز رنگ آمیزی بدون جدا کردن سلولها از ته فلاسک و در محل انجام گرفته بعد از اتمام رنگ آمیزی لام موجود در ته فلاسک جدا و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت) (در این موارد از فلاسکهای مخصوص شرکت NUNC - دانمارک استفاده شد) به سوسپانسیون سلولی حاصل $5 \mu\text{g/ml}$ رنگ HO42 اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در 37°C انکوبه شد. سپس دو بار با PBS شستشو شد. رنگ PI با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ اضافه و به مدت ۵ دقیقه در 37°C انکوبه شد. بعد از اتمام انکوباسیون، سلولها بلافاصله با میکروسکوپ فلورسانس (زایس Axioskop45-1487 - آلمان) با لامپ جیوه و فیلترهای UV، آبی و سبز مورد مشاهده قرار گرفتند. از هر نمونه حداقل 200 سلول شمارش شده بر اساس معیارهایی که در جدول ۱ آمده است طبقه بندی گردید

د) آنالیز فلوسیتومتری

با استفاده از تریسین ($25/0$ درصد) (شرکت Sigma - آمریکا) سلولهای چسبیده به فلاسک به صورت سوسپانسیون در آمده دو بار با بافر FACS (PBS) BSA ($1/0$ درصد) EDTA (5 mM)، سدیم آزاید ($1/0$ درصد) شسته شدند. این سلولها با استفاده از روش Liegler (۲۸) با بعضی تغییرات رنگ آمیزی شده و به وسیله دستگاه فلوسیتومتر مورد بررسی قرار گرفتند. به طور خلاصه سلولها ابتدا با رنگ AO (شرکت

1. Dose Rate
2. Gy: Gray, 1Gray= 100 RAD
3. Transit dose



۷۴

شکل ۱: رده سلولی کارسینوم پستان (T-47D) که تحت تأثیر تابش پرتو گاما دچار آپوتوز شده و بوسیله رنگهای HO42 و PI رنگ آمیزی شده است. با این نوع رنگ آمیزی سه نوع سلول قابل تشخیص می‌باشند: سلولهای زنده که هسته آنها به رنگ آبی مات دیده می‌شود (L)، سلولهای آپوتوتیک که در مراحل اولیه آپوتوز قرار دارند و هسته آنها آبی روشن و هسته آنها دیده می‌شود (Ap) و سلولهای مرده (در نتیجه آپوتوز) که هسته آنها به رنگ قرمز تکه تکه و سرامک دیده می‌شود (D). بزرگنمایی ۱۰۰ برابر (a)، ۶۳۰ برابر (b) و ۲۰۰ برابر (c)

تابش گاما قرار گرفته و با رنگهای مذکور رنگ شده بودند، سه جمعیت مجزا تشکیل می‌دادند که شامل سلولهای زنده ($AO^{hi}PI^{lo}$) آپوتوتیک ($AO^{lo}PI^{hi}$) و مرده ($AO^{lo}PI^{hi}$) بودند (شکل ۲).
این زیر جمعیتها بسته به دُز پرتو و مدت زمان انکوباسیون بعد از پرتو دهی، درصدهای متفاوتی از کل جمعیت سلولی را تشکیل می‌دادند (شکل ۴).

به منظور بررسی آپوتوز با دستگاه فلوسیتومتری از دو رنگ PI و AO استفاده شد. هر دوی این رنگها با یک لیزر با طول موج ۴۸۸nm تحریک و به ترتیب رنگهای سبز (۵۲۵/۲۰nm) و قرمز (۶۱۷nm) ساطع می‌کنند که در محورهای (AO)FL-1 و (PI)FL-2 دریافت شدند. بعد از تنظیم ولتاژ، اصلاح روی هم افتادگی طول موجها و حذف نور حاصل از فلورسانس سلولهای شاهد، سلولهایی که تحت

از آن پستگی داشت به طوری که با افزایش دُز تا ۸Gy درصد سلولهای آپتیک افزایش و در دُزهای بالاتر رو به کاهش می‌گذاشت.

جدول ۲: جمعیت‌های سلولی حاصل از بررسی فلوسیتومتری T-47D بعد از تابش پرتو گاما و رنگ‌آمیزی با AO و PI

نوع سلول	AO	PI
زنده	بالا	پائین
آپتوتیک اولیه	پائین	پائین
آپتوتیک نهایی و نکروتیک	پائین	بالا

PI: پرویديوم بداد، AO: آكریدين نارنجی

این فرآیند تا ۴۸ ساعت بعد از تابش پرتو ادامه یافته و بعد از آن به جز در نمونه هایی که تحت تأثیر ۴Gy پرتو گاما بودند، در سایر دُزها کاهش نشان دادند. در مورد اخیر روند افزایش درصد سلولهای آپتوتیک تا ۷۲ ساعت بعد نیز ادامه یافت. در مجموع بالاترین درصد سلولهای آپتوتیک در دُز ۸Gy و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون حاصل شد. این یافته با مشاهده میکروسکوپی تعداد زیادی اجسام آپتوتیک با اندازه حدودی ۶-۴ μm نیز تأیید شد (شکل ۴b). درصد سلولهای زنده با افزایش دُز پرتو کاهش و شدت این کاهش بعد از ۲۴ ساعت بیشتر شد (شکل ۴c).

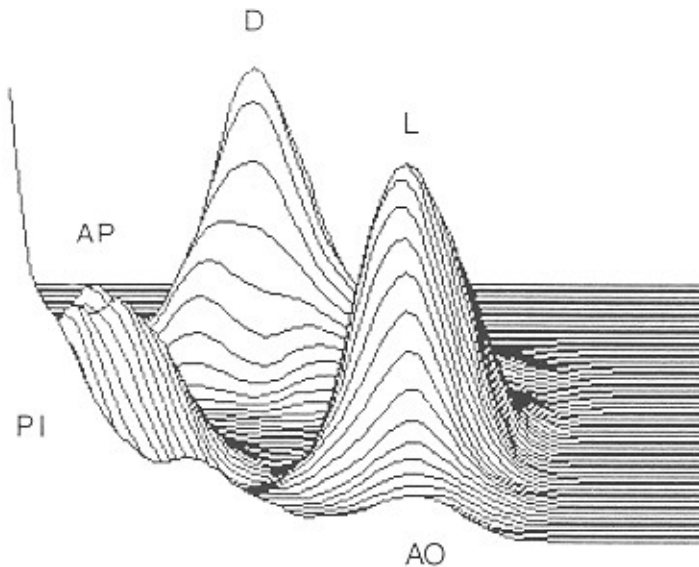
جدول ۱: ویژگیهای ریخت شناختی سلولهای آپتوتیک، زنده و مرده

بعد از رنگ‌آمیزی با HO42 و PI

نوع سلول	ویژگیهای ریخت شناختی HO42-PI
طبیعی	هسته سلول به رنگ آبی کم رنگ و مات غشاء سلول نفوذناپذیر نسبت به رنگ PI
آپتوتیک نهایی	هسته سلول به رنگ آبی روشن و درخشان، تکه تکه و متراکم غشاء سلول نفوذناپذیر نسبت به رنگ PI
نکروتیک	هسته سلول به رنگ قرمز و متورم غشاء سلول نفوذناپذیر نسبت به رنگ PI

PI: پرویديوم بداد، HO42: موخست ۳۳۳۲۲

نتایج حاصل، نشان داد که با افزایش دُز پرتو تعداد سلولهای موجود در فلاسک در مقایسه با نمونه شاهد کاهش یافته و شیب این کاهش با گذشت زمان بیشتر می‌شود. پرتو دهی باعث محدود شدن رشد سلولها شده، این تأثیر با افزایش دُز پرتو نمایان تر می‌شود. بطوری که در دُزهای ۴-۸Gy تعداد سلولها بسته به شدت دُز تا ۴۸ ساعت افزایش نسبی داشته بعد از آن کاهش می‌یابد در صورتی که در دُزهای ۱۲Gy و ۱۶Gy با گذشت زمان صرفاً کاهش تعداد سلولها مشاهده می‌شود (شکل ۴a). درصد سلولهای آپتوتیک نیز به دُز پرتو و زمان انکوباسیون بعد

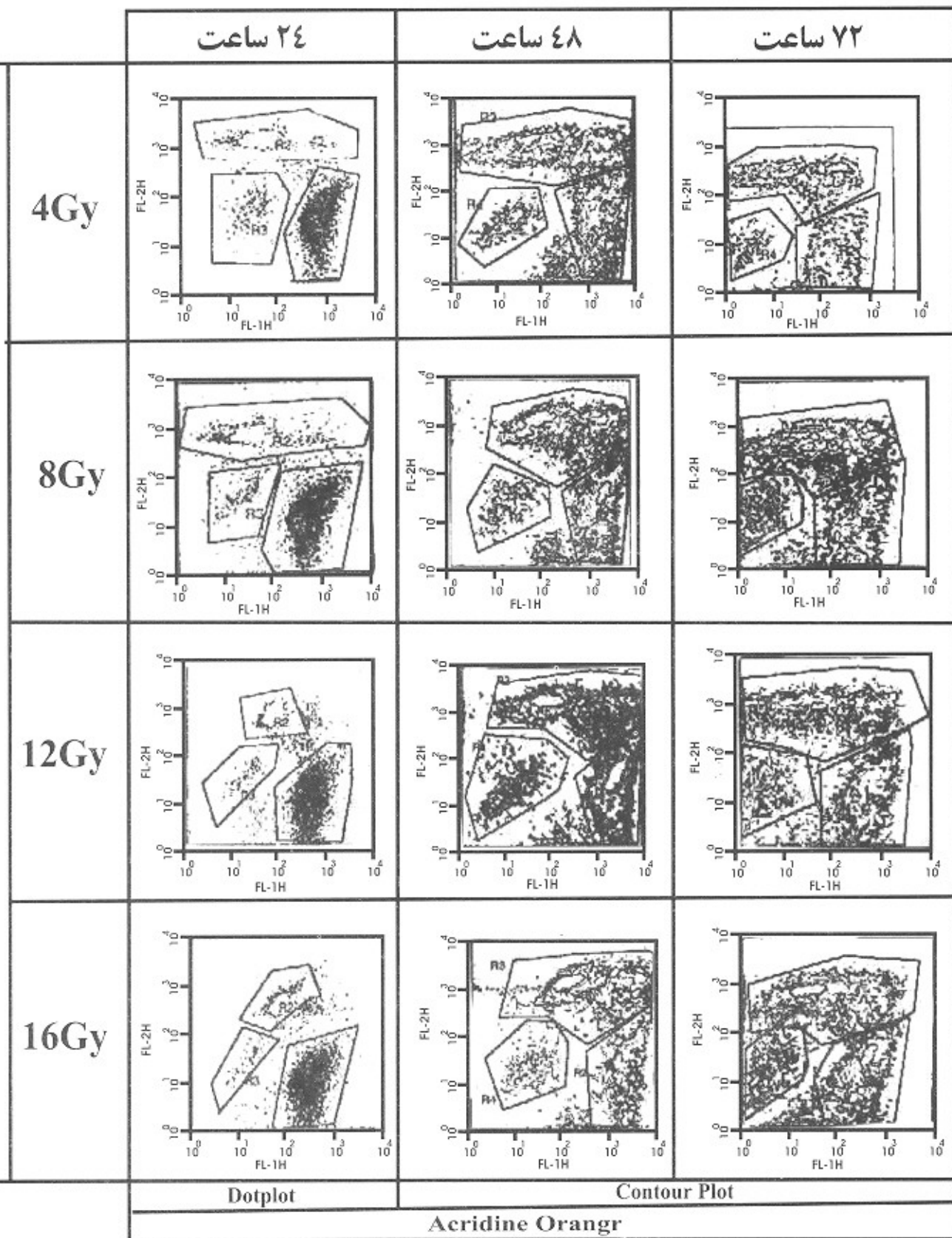


شکل ۲: بعد از تابش پرتو گاما به سلولهای کارسینوم پستان (رده T-47D) و رنگ‌آمیزی آنها با دو رنگ AO و PI و بررسی فلوسیتومتری سه جمعیت مجزای سلولی مشاهده می‌گردد: زنده، ($AO^{hi}PI^{lo}$)، آپتوتیک ($AO^{lo}PI^{hi}$) و مرده، ($AO^{lo}PI^{hi}$)

جدول ۳: تعداد سلولهای موجود در هنگام کشت، زمان تابش پرتو گاما و ۲۸، ۷۲ ساعت بعد از پرتو دهی

	۷۲ ساعت ($\times 10^6$)	۴۸ ساعت ($\times 10^6$)	۲۴ ساعت	زمان پرتو دهی ($\times 10^6$)	زمان کشت ($\times 10^6$)	
زغال	$2/27 \pm 1$	$3/27 \pm 1/7$	$2/2 \pm 0/9$	$2 \pm 0/6$	۰/۵	
انوپوزاند	$1/27 \pm 0/25$	$1/8 \pm 0/53$	$2/2 \pm 0/9$	$2 \pm 0/6$	۰/۵	
۲Gy	$1/92 \pm 1/3$	$2 \pm 1/8$	$2/29 \pm 0/9$	$2 \pm 0/6$	۰/۵	
۸Gy	$2/31 \pm 1/3$	$2/27 \pm 1/7$	$2/27 \pm 0/9$	$2 \pm 0/6$	۰/۵	
۱۲Gy	$1/92 \pm 1/3$	$1/65 \pm 1/7$	$2/22 \pm 0/9$	$2 \pm 0/6$	۰/۵	
۱۶Gy	$1/69 \pm 1/2$	$2 \pm 1/2$	$2/28 \pm 0/9$	$2 \pm 0/6$	۰/۵	

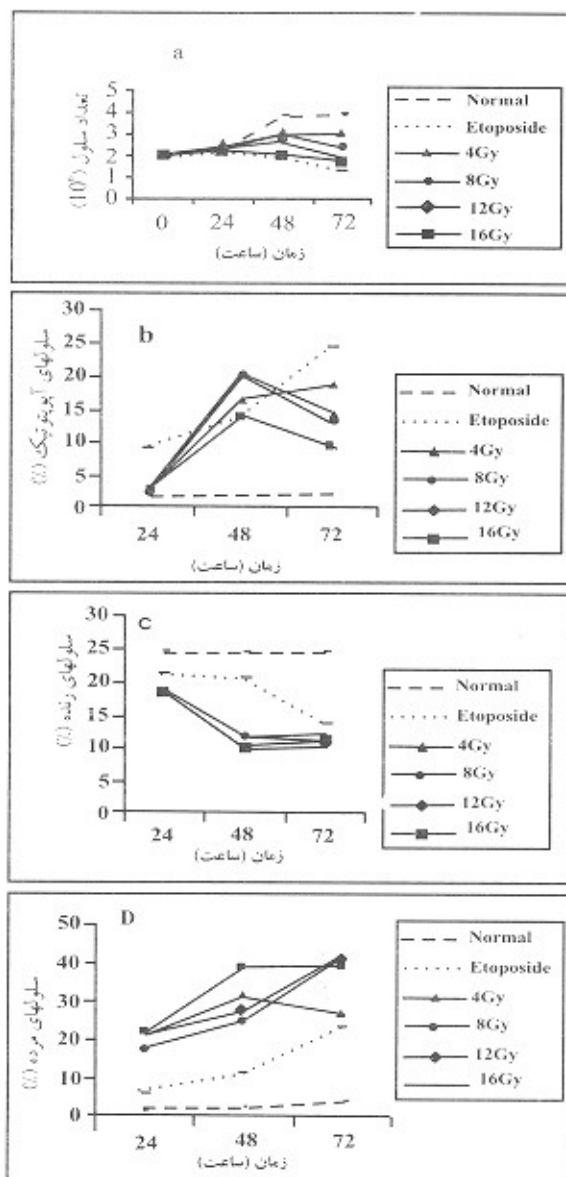
Gy: گری، ۱ گری = ۱۰۰ راد



۷۸

شکل ۳. نمونه‌ای از نمودارهای فلوسیتومتری سلولهای T-47D بعد از تابش گاما با دزهای ۰.۷Gy، ۱Gy، ۱.۷Gy و ۱۶Gy و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بعد از پروتوهی. بسته به میزان دز و زمان انکوباسیون درصدهای متفاوتی از سلولهای زنده (L)، سلولهای آپوپتوتیک (Ap) و مرده (D) بدست می‌آید. (برای توضیح بیشتر به متن مقاله مراجعه نمایید).





شکل ۴. سلولهای T-47D موجود در فلاسک کشت قبل از پرتو دهی و ۲۲، ۴۸، ۷۲ ساعت بعد از پرتو دهی (۲Gy، ۴Gy، ۸Gy، ۱۲Gy و ۱۶Gy) از طریق حضم با تریپسین برداشت شده، قبل از بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری شمارش و تعداد سلولهای زنده آنها تعیین گردید (a). سپس با AO/PI به ترتیب برای بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری رنگ آمیزی شده نتایج به صورت درصد سلولهای آپوتوتیک (b) (Ap)، زنده (L) (c) و مرده، (d) (D) بر حسب زمان انکوباسیون بعد از پرتو دهی نشان داده شده‌اند.

فلوسیتومتری برای تعیین میزان آپتوتوز ایجاد شده توسط تابش گاما در سلولهای کارسینوم پستان انسان استفاده شده است. در جریان آپتوتوز کروماتین سلول متراکم شده، غشاء هسته تمامیت خود را از دست داده، هسته قطعه قطعه می‌گردد، قطعات هسته به همراه بخشی از سیتوپلاسم اندامکهای سالمی که در غشاء سیتوپلاسمی محصور شده‌اند، اجسام آپتوتوتیک را تشکیل می‌دهند. این اجسام را می‌توان ۴۸ ساعت بعد از پرتو دهی در زیر میکروسکوپ به وفور مشاهده نمود. بر اساس این تغییرات، فرآیند آپتوتوز را به سه مرحله اولیه، میانی و نهایی تقسیم نموده، روشهای متعددی را برای تشخیص مراحل مختلف آپتوتوز به کار می‌گیرند (۱۶). با اینکه مطالعات متعدد نشان داده‌اند که انواع پرتوها از جمله پرتوهای گاما، ایکس، ماوراء بنفش و غیره باعث القاء آپتوتوز

درصد سلولهای مرده نیز با افزایش دُز افزایش یافته و شیب این افزایش با گذشت زمان بیشتر گردید، به طوری که تا ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی، شیب افزایش درصد سلولهای مرده ملایم بوده و بعد از آن (۷۲-۴۸ ساعت) این شیب تندتر گردید (شکل ۴د).

به طور خلاصه می‌توان گفت با افزایش دُز و زمان انکوباسیون بعد از پرتو دهی درصد سلولهای زنده کاهش و درصد سلولهای مرده افزایش می‌یابد ولی در مورد سلولهای آپتوتوتیک بیشترین درصد را بعد از ۴۸ ساعت می‌توان مشاهده نمود و پس از آن رو به کاهش می‌گذارد.

بحث

در این مطالعه از دو روش بررسی با میکروسکوپ فلورسانس و

کاهش می‌گذارد. به نظر می‌رسد در مورد دُز ۴Gy روند القاء آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت نیز ادامه می‌یابد در صورتی که در مورد سایر دُزها رو به کاهش رفته و این امر می‌تواند به دلیل کمی دُز ۴Gy و تأثیر تدریجی آن باشد. نتایج مطالعات Meijer و Strobi نیز حاکی از آن است که بیشترین میزان آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت با دُز ۸Gy بدست می‌آید (۲۵)، گزارش اخیر از این نظر که رده سلولی مورد مطالعه آن (MCF-7) همانند رده سلولی به کار رفته در تحقیق حاضر از کارسینوم پستان انسان حاصل شده است از اهمیت خاصی برخوردار است (۲۶).

از بررسی نتایج مطالعاتی که در این زمینه به عمل آمده چنین برمی‌آید که انواع گوناگون پرتوها در دُزهای ثابت و تقسیم شده می‌توانند باعث القاء آپوپتوز در سلولهای مختلف گردند (۱۰، ۱۱) و این امر به نوع سلول، نوع پرتو و دُز به کار رفته بستگی دارد (۱۴-۱۲). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که پرتو گاما در دُز ثابت می‌تواند باعث القاء آپوپتوز در سلولهای کارسینوم پستان انسان گردد ولی رابطه بین دُز و پرتو همیشه خطی نبوده و میزان القاء آپوپتوز می‌تواند در دُز و زمان انکوباسیون معینی به حداکثر برسد. نتایج مذکور با گزارش برخی از محققین دیگر نیز همخوانی دارد (۲۳، ۲۴). امروزه از نتایج این گونه مطالعات در علوم پایه و در علوم بالینی بهره گرفته می‌شود، که از آن جمله می‌توان به مطالعات مربوط به بررسی سازوکارهای سلولی و مولکولی آپوپتوز، جنین‌شناسی (۴) و تنظیم ایمنی (۵)، تعیین دُز مناسب برای رادیوتراپی (۷) و ایجاد آنتی ژنهای آپوپتوتیک برای ایمونوتراپی اشاره نمود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نگارندگان این مقاله بر خود وظیفه می‌دانند که از همکاری صمیمانه و زحمات بی‌شائبه جناب آقای دکتر امان‌زاده و همکاران ایشان در بخش بانک سلولی انسیتوپاستور ایران سرکار خانم شریف‌زاده و همکاران ایشان در مرکز تابش گامای سازمان انرژی اتمی ایران و سرکار خانم حیات و همکاران ایشان در مرکز تحقیقات علوم پزشکی ایران تشکر و سپاسگزاری نمایند.



References

1. Kerr JFR, Wylie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit J Cancer*, 1972; 26 :239-257
2. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ: Necrosis and apoptosis distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Ann*, 1982; 17(2): 229-259
3. Cohen JJ, Duke RC: Glucocorticoid induced apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *J Immunol* 1984; 132: 38-42
4. Goldman AS, Baker MK, Piddington R, Herold R: Inhibition of programmed cell death in mouse

در سلولهای مختلف می‌شوند، ولی در غالب موارد این پرتوها در سلولهای مختلف به یک اندازه آپوپتوز القاء نمی‌کنند (۲۳). از این رو در این مطالعه ابتدا وقوع آپوپتوز از طریق رنگ آمیزی با HO42/PI و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس و نیز استفاده از داروی اتوپوزاید به عنوان شاهد مثبت مورد تأیید قرار گرفت و همانگونه که محققین توصیف کرده بودند هسته سلولهای آپوپتوتیک اولیه به صورت متراکم، تکه تکه و به رنگ آبی روشن، هسته‌های سلولهای آپوپتوتیک نهایی به صورت متراکم تکه تکه و به رنگ قرمز و بالاخره هسته سلولهای طبیعی به رنگ آبی مات مشاهده گردید. به دنبال پرتودهی با دُزهای مختلف و انکوباسیون بعد از آن برای تعیین میزان تأثیر پرتو در القاء آپوپتوز لازم بود تا درصد سلولهای زنده آپوپتوتیک و مرده مشخص گردد که این امر با شمارش حداقل ۲۰۰ سلول در هر نمونه و نیز انجام آنالیز فلوسیتومتری میسر گردید.

مطالعات Gaugler و همکاران او (۲۴) نشان داد که آسیب ناشی از پرتو گاما بر روی DNA سلول و در نتیجه القاء آپوپتوز و مرگ آن وابسته به دُز پرتو و زمان است. نتایج این مطالعه نیز به وضوح نشان داد که دُز و زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی، تأثیر مستقیمی بر تعداد سلولها دارد. به طوری که در مقایسه با نمونه شاهد با افزایش میزان دُز و زمان انکوباسیون تعداد سلولها کاهش می‌یابد و این کاهش در دُزهای بالاتر و زمان انکوباسیون بیشتر، بارزتر می‌شود. بدین معنی که در دُز ۴Gy کمترین میزان کاهش رشد و در ۱۶Gy بیشترین میزان کاهش اتفاق می‌افتد (شکل ۴a). با اینکه نتایج این مطالعه و سایر مطالعات نشان داده که با افزایش دُز و طولانی‌تر شدن زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی تعداد کلی سلولها کاهش یافته، از تعداد سلولهای زنده کاسته و بر تعداد سلولهای مرده (مراحل نهایی آپوپتوز و نکروز شده) افزوده می‌گردد. در این مورد سرعت مرگ سلولها و کاهش سلولهای زنده بین ۴۸-۲۴ ساعت زیاد بوده بعد از این مدت کندتر می‌گردد (شکل ۴b، ۴c). ولی این یافته در مورد سلولهایی که در مراحل اولیه، آپوپتوز فرار دارند صادق نیست. بدین معنی که تعداد سلولهای آپوپتوتیک با میزان دُز و انکوباسیون بعد از آن رابطه مستقیمی ندارد و تا دُز معین (۸Gy) و زمان مشخص (۴۸ ساعت) تعداد این سلولهای افزایش یافته و سپس رو به

- Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1991; 247-261
7. Krishan A, Frei E: III: Morphological basis for cytolytic effect of vinblastine and vincristine on cultured human leukemic lymphocytes. *Cancer Res.* 1975; 35: 497-501
 8. Carson DA, Ribeiro JM: Apoptosis and disease. *Lancet*, 1993; 341: 1251-1254
 9. Oren M: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. *Cancer Metastasis Rev* 1992; 11:141-148.
 10. Meyn RE, Stephans LC, Ang KK, Hunter NR, Brock WA, Milas L, Peters L: Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumors of different histologies. *Int J Rad Biol* 1993; 64: 583-591
 11. Olive PL, Frazer G, Bunath JP: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Rad Res* 1993; 136: 130-136
 12. Stapper NJ, Stuschke M, sak A, stuben G: Radiation- induced apoptosis in human sarcoma and glioma cell lines. *Int J Cancer* 1995; 62: 58-62
 13. Seamus JM, Cotter TG: Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. *Int J Rad Biol* 1991; 59(4): 1001-1016
 14. Zhan Q, Fan S, Bue I, Guillouf C, Liebermann DA, O Connor PM, Fornace AJ: Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. *Oncogene* 1994; 9: 3743-3751
 15. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wylie AH: Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis programmed cell death by multiparameter flow cytometry, *Biochim Biophys Acta*, 1992; 1133: 275-285
 16. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Andriganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, *Cytometry* 1992; 13: 795-808
 17. Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, Davies R, Fearnhead H, Cohen G: Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes and flow cytometric study, *Cytometry* 1993; 14: 595-602
 18. Telford WG, king LE, Fraker PJ: Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis associated chromatin degradation by flow cytometry, *cytometry*, 1992; 13: 131-143
 19. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Kapuscinski J, Stuiano-Coico L, Melamed MR: Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: Relationship to chromatin damages during erythroid differentiation of Friend leukemia cells, *Cytometry* 1984; 5: 355-363
 20. Matthews JB, Harrison A, Palcio B, Skov K: Automated fluorescence microscopic measurement of apoptosis frequency following ionizing radiation exposure in cultured mammalian cells. *Int J Rad Biol* 1998; 73: 629-639
 21. Tanke HJ, Van der Linden PWG, Lungerak J: Alternative fluorochromes to ethidium bromide for automated read out of cytotoxicity tests. *J Immunol Methods* 1982; 52: 91
 22. Afanas evVN, Korol BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechtnikov VA, Umansky SR: Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. *FEBS* 1986; 194: 347-350
 23. Burger H, Nooters K, Boersma AWM, Kortland CJ, Van der Berg AP, Stoter G: Expression of p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2, Bax, Bcl-X, and Bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 1998; 41(2): 415-424
 24. Gaugler MH, Squiban C, Claraz M, Schweitzer K, Weksler B, Gourmelon P, Van der Meer A, Characrerization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. *Brit J Haematol* 1998; 103: 980-989
 25. Meijer AE, Kronquist U-SE, Levensohn R, Harms-ring dahl M: RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high- LET radiation generated by accelerated nitrogen ions *Int J Rad Biol* 1998; 73(2): 169-177
 26. Strobi JS, Melkoumiun Z, Peterson AP, Hylton H: The cell death response to-radiation in MCF-7 cells is enhanced by a neuroleptic drug, pimozide. *Breast Cancer Res. Treat* 1998; 51: 83-95
 27. Meijer AE, Backbro Saeidi AB, Zelenskaya A, Czene S, Granuth F, Hurms-Ringdahl M: Influence of dose-rate, post-irradiation incubation time and growth factors on interphase cell death by apoptosis and clonogenic survival of human peripheral lymphocytes *Int J Rad Biol* 1999; 75(10): 1265-123
 28. Liegler TJ, Hyan W, Benedicty TS, Stites DP: Detection and quantification of live, apoptotic, and necrotic human peripheval lymphocytes by single-laser flow cytometry. *Clin Diag Lab Immunol* 1995; 369-376

