

فراوانی ناهنجاری کروموزومی و آپتوز ناشی از اشعه گاما در لکوسیت‌های خون

محیطی مبتلایان به هموگلوبین H

*دکتر علیرضا ترنگ (Ph.D)

*نویسنده مسئول: بخش تحقیقات ژنومیکس، مدیریت منطقه شمال کشور، پژوهشکده بیوتکنولوژی ایران، رشت، ایران

پست الکترونیک: a_tarang@hotmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۹۱/۳/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۱۶

چکیده

مقدمه: تالاسمی آلفا بیماری کم‌خونی ژنتیکی و بیشتر شایع در آسیای جنوب شرقی، منطقه مدیترانه و جنوب ایران است. به‌طور کلی، تالاسمی آلفا به گروه‌های کوچک‌تری تقسیم می‌شود که مهم‌ترین آنها عبارتند از: حامل خاموش، تالاسمی آلفا مینور، بیماری هموگلوبین H و تالاسمی آلفا ماژور (هیدروپس فتالیس).

هدف: بررسی میزان ناهنجاری کروموزومی و آپتوز در لکوسیت افراد دچار بیماری هموگلوبین H در مقایسه با افراد سالم پیش و پس از تیمار با ۳ گری اشعه گاما

مواد و روش‌ها: لکوسیت‌های خون محیطی ۱۰ بیمار هموگلوبین H به همراه لکوسیت‌های خون محیطی ۱۰ فرد سالم به‌طور جداگانه مورد تابش ۳ گری پرتو گاما قرار داده شدند. بروز ناهنجاری کروموزومی پس از ۴۸ ساعت از هر نمونه ۷۰ متافاز بررسی شد. پس از ۴۸ ساعت میزان آپتوز القایی و بی‌درنگ پس از خون‌گیری با آزمون کامت خنثی مورد ارزیابی قرار گرفت. تمام این مرحله برای هر یک از افراد دو گروه بدون تابش لکوسیت‌های خون محیطی، تکرار و با نمونه‌های مورد تابش مقایسه و آنالیز آماری با نرم‌افزار SPSS V15 انجام شد.

نتایج: نقاط شکست ناشی از القای پرتوها در بیماران دچار هموگلوبین H در تمام کروموزوم‌ها و افراد سالم به‌جز کروموزوم شماره ۱، متناسب با طول کروموزوم‌ها و بر مبنای محتوای DNA به‌طور تصادفی در طول کروموزوم بخش شده بود. درصد آپتوز در افراد دچار بیماری هموگلوبین H بلافاصله پس از خون‌گیری و همچنین پس از ۴۸ ساعت نسبت به افراد سالم بیشتر و از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/01$). درصد آپتوز نمونه‌های تیمار ۳ گری اشعه پس از ۴۸ ساعت در هر دو گروه کنترل و بیمار به میزان بسیار قابل توجهی افزایش یافته بود ($P < 0/01$).

نتیجه‌گیری: دور نگهداشتن بیماران هموگلوبین H از مواد فیزیکی و شیمیایی که آسیب اکسیداتیو DNA ایجاد می‌کند، ممکن است به بهبود مدیریت این بیماران کمک کند.

کلید واژه‌ها: آپتوز/آزمون کامت/اشعه/تالاسمی آلفا/متافاز/ناهنجاری کروموزومی/هموگلوبین H

مجله دانشگاه علوم پزشکی گیلان، دوره بیست و دوم شماره ۸۶، صفحات: ۱۱-۱

مقدمه

تالاسمی α + یا β + که طی آن مقادیر کمی زنجیره α یا β سنتز می‌شود تقسیم کرده‌اند (۷-۵). تالاسمی آلفا که شیوع بیشتر و پراکندگی گسترده‌تری نسبت به بقیه تالاسمی‌ها دارد بیشتر در آسیای جنوب شرقی، چین، منطقه مدیترانه و شمال آمریکا دیده می‌شود. در ایران این بیماری بیشتر در جنوب کشور شایع است. به‌طور کلی تالاسمی آلفا به گروه‌های کوچک‌تری تقسیم می‌شود که مهم‌ترین آنها عبارتند از: حامل خاموش، تالاسمی آلفا مینور، بیماری هموگلوبین H و تالاسمی آلفا ماژور (۸-۱۱).

تخمین زده می‌شود که در حدود ۱۰ درصد افراد جامعه به پرتوهای یونساز حساسیت غیرطبیعی نشان می‌دهند. این حساسیت ناشی از وجود ژن‌های حساس به پرتو است که

بیماری‌های هموگلوبین (Hemoglobinopathies) عمومی‌ترین بیماری تک ژنی در جهان بوده (۱) که شامل انواع مختلف ساختمانی هموگلوبین و تالاسمی است (۲). تالاسمی‌ها در مجموع شایع‌ترین اختلال تک ژنی در انسان هستند و یک گروه ناهمگون از بیماری‌های سنتز هموگلوبین را تشکیل می‌دهند که طی آن اختلالی در سنتز زنجیره گلوبین ملکول هموگلوبین روی می‌دهد (۳ و ۴). بر اساس آن که سنتز کدام زنجیره دچار نقص شود، تالاسمی‌ها را به ترتیب به α , β , $\delta\beta$, $\gamma\delta\beta$ و δ تقسیم کرده‌اند. تالاسمی‌های α و β فراوان‌ترین و مهم‌ترین شکل تالاسمی‌ها هستند. هر یک از تالاسمی‌های α و β را به نوبه خود به تالاسمی‌های α^0 و β^0 که در آن هیچ مقدار از زنجیره α یا β تولید نمی‌شود و

مرفولوژی و سایر خصوصیات بیوشیمی است (۲۹). ژل الکتروفورز سلول‌های منفرد یا آزمون کامت روشی نسبتاً ساده و قابل اعتماد برای ارزیابی آپوپتوز است (۳۲-۳۰). به دلیل این که مبتلایان به بیماری هموگلوبین H طول عمر طبیعی دارند و امکان این وجود دارد که در مواجهه با مواد شیمیائی و فیزیکی قرار گیرند که می‌تواند موجب آسیب DNA شود، در این پژوهش به بررسی میزان ناهنجاری‌های کروموزومی به کمک آنالیز متافاز و میزان آپوپتوز به روش آزمون کامت خنثی در لکوسیت افراد دارای بیماری هموگلوبین H در مقایسه با افراد سالم پیش و پس از تیمار با ۳ گری اشعه گاما پرداخته شده است. آنالیز متافاز و بررسی میزان آپوپتوز در لکوسیت بیماری هموگلوبین H برای اولین بار است که انجام می‌شود. در صورتی که در افراد موصوف حساسیت پرتوی وجود داشته باشد باید پیشنهاد کرد آنها تا حد امکان در معرض اشعه یا موادی که موجب آسیب DNA می‌شوند، قرار نگیرند.

مواد و روش‌ها

در این پژوهش، برای بررسی فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی با آنالیز متافاز و برای بررسی میزان آپوپتوز به روش آزمون کامت خنثی از لکوسیت‌های خون محیطی استفاده شد. چون شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و مصرف آنتی‌بیوتیک از جمله عواملی هستند که در پاسخ افراد نسبت به پرتوهای یون‌ساز تأثیر می‌گذارند و از جمله عوامل مداخله‌گر در بررسی حساسیت پرتوی هستند، دقت بسیار شد تا بیماران و افراد سالمی مورد بررسی قرار گیرند که هیچگونه سابقه شیمی‌درمانی، رادیوتراپی و انتقال خون دست‌کم تا سه ماه پیش از آن را نداشته باشند و نیز از آخرین مصرف آنتی‌بیوتیک آنها دست‌کم دو نیمه عمر گذشته باشد.

در این تحقیق ۱۰ بیمار دچار بیماری هموگلوبین H (۵ زن و ۵ مرد) پس از تشخیص با مولتی‌پلکس PCR از بین انواع تالاسمی آلفا گزینش شدند. ۱۰ فرد سالم (۵ زن و ۵ مرد) نیز به‌عنوان کنترل و برای سنجش با افراد بیمار برگزیده شدند. افراد سالم از بین کسانی که از نظر سنی و شرایط اقتصادی هماهنگ با بیماران بودند، گزینش شدند. از بیماران و افراد

موجب آسیب در مولکول DNA می‌شود. عقیده بر این است که حدود ۷۰ درصد تفاوت‌های فردی در حساسیت به پرتوی بافت سالم بیماران، مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی افراد (۱۲) و عامل اصلی تعیین‌کننده آن، حساسیت ذاتی سلول‌ها باشد (۱۲ و ۱۳). پاسخ سلول‌ها به تابش پرتوهای یون‌ساز وابسته به حضور ژن‌های گوناگونی است که مسئول ترمیم DNA، تنظیم چرخه سلولی و سرکوب تومور هستند. در پس آسیب DNA پس از تابش‌گیری در افراد حساس به پرتوهای یون‌ساز، امکان افزایش آپوپتوز و ایجاد ناهنجاری‌های کروموزومی وجود دارد (۱۴). شکست خودبخود در جایگاه‌های ژنی با شیوع کمتری رخ می‌دهد ولی هنگامی که مورد تابش اشعه یونیزان قرار گیرند، به‌طور معنی‌دار افزایش می‌یابد (۱۵). نقطه‌های داغ در باندهای جایگاه‌های شکننده، پروتو انکوژن‌ها و نقاط شکست درگیر در نوترتیبی کروموزومی در سلول‌های تومور مشاهده شده است (۱۶). این یافته‌ها بازگوکننده آن است که ۲۴ نوع کروموزوم انسانی از نظر حساسیت پرتوی تفاوتی ندارند و شکست‌های کروموزومی القاء شده توسط پرتوها می‌تواند متناسب یا غیرمتناسب با طول آنها باشد. بررسی‌های دیگر بر افراد طبیعی یافته‌هایی کاملاً متفاوت و ضد و نقیض نشان داد (۲۰-۱۷)، طبق نتایج پژوهش‌ها برخی کروموزوم‌ها در تولید ناهنجاری‌ها فراوانی بیشتری دارند در صورتی که براساس طول کروموزوم انتظار می‌رود حساسیت پرتوی بین و داخل کروموزوم‌ها متفاوت باشد. از سوی دیگر گزارش شده نقاط شکست القاء شده توسط اشعه در افراد طبیعی، متناسب با طول کروموزوم‌ها و بر مبنای محتوای DNA به‌طور تصادفی پخش شده است (۲۳-۲۱). آنالیز متافاز بر سلول‌های لکوسیت ۴ نفر از بیماران دچار تالاسمی آلفا (بدون در نظر گرفتن نوع تالاسمی)، نشان داد که نقاط شکست پس از تابش‌گیری در کروموزوم‌های ۱۶، ۱۷، ۱۸ و X در مقایسه با افراد سالم به‌طور معنی‌دار، افزایش یافته است (۲۴).

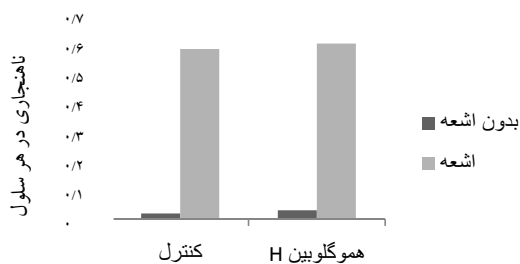
آپوپتوز نقشی اساسی در تنظیم خون‌سازی دارد (۲۵). استرس اکسیدان در القای آپوپتوز در سلول‌های اریتروسیت بیماران بتاتالاسمی مهم است (۲۸-۲۶). چندین روش از جمله آزمون کامت برای ارزیابی آپوپتوز وجود دارد که عمدتاً مبتنی بر

باقی مانده و به شکل کرومی در میدان دید میکروسکوپی کاملاً قابل تشخیص است در حالی که سلول‌های آپوتوتیک منظره خاصی شبیه ستاره دنباله‌دار را به نمایش می‌گذارد.

تمام این مراحل برای هر فرد دچار بیماری هموگلوبین H و نیز افراد سالم که لکوسیت‌های خون محیطی آنها مورد تابش قرار نگرفته بودند برای بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی و میزان آپوتوز عیناً تکرار و با نمونه‌های تابش‌سنجیده شد. برای مقایسه میانگین‌های پیش و پس از تیمار t-test و -man whitney بکار رفت. برای مقایسه درصد ناهنجاری‌های انواع کروموزوم‌ها با محتوای DNA هر کروموزوم از تست χ^2 استفاده و کلیه آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SPSS V 15 انجام شد.

نتایج

نتایج آماری حاصل از آزمون t نشان داد که آسیب‌های کروموزومی در ۵ مرد و ۵ زن سالم اختلاف معنی‌داری نداشت ($P < 0/1$). بنابراین، میانگین آسیب در گروه شاهد برای مقایسه با گروه بیمار در نظر گرفته شد. نتایج انواع آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی افراد سالم و افراد دارای بیماری هموگلوبین H پیش و پس از تیمار با ۳ گری اشعه در جدول ۱ و شکل ۱ نشان داده شده‌است. هم‌چنین، تعداد نقاط شکست تمام کروموزوم‌ها به جزء کروموزوم Y بعد از تیمار ۳ گری اشعه گاما بین افراد سالم و افراد دارای بیماری هموگلوبین H در جدول ۲ و ۳ مقایسه شد.



شکل ۱. نمودار مقایسه میانگین کل آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی در افراد سالم و مبتلایان به بیماری هموگلوبین H قبل و بعد از تیمار با ۳ گری اشعه گاما

سالم پس از گرفتن رضایت و تکمیل پرسشنامه، نمونه‌گیری شد. نمونه‌های خون در ظرف‌های استریل مخصوص که حاوی ماده ضدانعقاد هپارین سدیم بودند، ریخته و بر اساس نوع تیمارها تقسیم شد. لکوسیت‌های خون محیطی ۱۰ بیمار مبتلا به تالاسمی آلفا از نوع بیماری هموگلوبین H به همراه لکوسیت‌های خون محیطی ۱۰ فرد سالم به‌طور جداگانه مورد تابش ۳ گری پرتو گاما قرار گرفت. در این تحقیق، برای پرتودهی نمونه‌های خونی از دستگاه کبالت ۶۰ تراترون 780E در بخش رادیوتراپی بیمارستان امام خمینی تهران استفاده شد. برای بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی، لئوسیت‌ها پس از تحریک توسط PHA در محیط کشت مناسب و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند و پس از ۴۸ ساعت با کلسمید، این سلول‌ها در مرحله متافاز متوقف شدند. پس از تهیه لام و کاریوتایپ و Age کردن آن، تریپسین بکار رفت و پس از رنگ‌آمیزی گیمسا از هر نمونه، ۷۰ متافاز آنالیز میکروسکوپی و ناهنجاری‌های کروموزومی و کروماتیدی ۲۳ نوع کروموزوم (به‌جز کروموزوم Y) مشخص شدند. سلول‌های متافازی با پخش مناسب و با میکروسکوپ نوری با درشت‌نمایی $\times 1000$ مورد بررسی قرار گرفتند. از گستره‌های موجود در هر لام، فقط مواردی شمارش شدند که محدوده مشخص داشته و مربوط به یک سلول بودند. برای شمارش میزان شکست‌ها، تعداد کروموزوم‌های واجد دو سانترومر، کروموزوم‌های بدون سانترومر، کروموزوم‌های گرد، شکست‌های کروماتیدی و شکاف‌ها شمرده شدند. شاخص شکست‌ها با تقسیم کل آسیب‌های شمارش شده به کل سلول‌ها سنجیده شد.

میزان آپوتوز القایی پس از ۴۸ ساعت و بی‌درنگ پس از خون‌گیری با آزمون کامت خشتی ارزیابی شد برای مشاهده آپوتوز از میکروسکوپ اپی فلورسنت (Nikon E1000) با محدوده طول موج ۵۱۶-۵۴۶ نانومتر و هم‌چنین فیلتر Barrier با طول موج ۵۹۰ نانومتر با بزرگنمایی ۲۰۰ برابر بکار رفت. ارزیابی نتایج آپوتوز به‌صورت چشمی انجام شد. شمارش سلول‌های آپوتوتیک و سالم در هر پنجره لام کامت (۵۰۰ سلول در لام) انجام و با محاسبه درصد با نتایج ثبت شد. در سلول‌های سالم، DNA در ناحیه مخصوص بخود

جدول ۱. فراوانی انواع آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی در افراد سالم و مبتلایان به بیماری هموگلوبین H قبل و بعد از تیمار با ۳ گری اشعه گاما

گروه‌ها	کنترل		هموگلوبین H	
	قبل از تیمار	بعد از تیمار	قبل از تیمار	بعد از تیمار
Dic	۳	۲۶۲	۴	۲۶۰
Ace	۲	۵۳	۳	۵۷
R	۰	۳۶	۰	۳۳
Ctb	۲	۳۷	۳	۳۸
Gap	۲	۳۸	۲	۴۳
کل	۹	۴۲۶	۱۲	۴۳۱

Dic: کروموزوم واجد دو سانترومر، Ace: کروموزوم بدون سانترومر، R: کروموزوم حلقوی، Ctb: شکست کروماتیدی، Gap: شکاف

جدول ۲. حساسیت پرتوی انواع کروموزوم‌های افراد سالم و مبتلایان به بیماری هموگلوبین H

شماره کروموزوم	کنترل (درصد تعداد)	هموگلوبین H (درصد تعداد)
۱	۷۹(۱۴/۱۶)	۶۳(۱۰/۹۴)
۲	۵۹(۱۰/۵۷)	۴۲(۷/۲۹)
۳	۵۴(۹/۶۸)	۶۵(۱۱/۲۸)
۴	۴۴(۷/۸۹)	۴۸(۸/۳۳)
۵	۴۳(۷/۷۱)	۵۶(۹/۷۲)
۶	۲۹(۵/۲۰)	۱۹(۳/۳۰)
۷	۲۱(۳/۷۶)	۲۳(۳/۹۹)
۸	۱۹(۳/۴۰)	۱۷(۲/۹۵)
۹	۲۱(۳/۷۶)	۲۷(۴/۶۹)
۱۰	۲۰(۳/۵۸)	۱۸(۳/۱۲)
۱۱	۲۱(۳/۷۶)	۳۳(۵/۷۳)
۱۲	۱۸(۳/۲۲)	۱۹(۳/۳۰)
۱۳	۱۷(۳/۰۵)	۱۴(۲/۴۳)
۱۴	۱۹(۳/۴۰)	۲۳(۳/۹۹)
۱۵	۱۷(۳/۰۵)	۲۲(۳/۸۲)
۱۶	۱۶(۲/۸۷)	۲۴(۴/۱۷)
۱۷	۱۲(۲/۱۵)	۱۷(۲/۹۵)
۱۸	۹(۱/۶۱)	۱۸(۳/۱۲)
۱۹	۷(۱/۲۵)	۴(۰/۶۹)
۲۰	۲(۰/۳۶)	۲(۰/۳۵)
۲۱	۲(۰/۳۶)	۴(۰/۶۹)
۲۲	۲(۰/۳۶)	۱(۰/۱۷)
X	۲۷(۴/۸۴)	۱۷(۲/۹۵)
کل ناهنجاری‌ها	۵۵۸(۹۹/۹۹)	۵۷۶(۹۹/۹۷)
تعداد متافاز	۷۰۰	۷۰۰
ناهنجاری‌ها در هر سلول	۰/۷۹۷	۰/۸۲۳

جدول ۳. فراوانی نقاط شکست القاء شده بعد از تیمار با اشعه گاما در انواع ای افراد سالم و مبتلایان به بیماری هموگلوبین H با استفاده از روش

نواربندی G

هموگلوبین H			کنترل			طول کروموزوم*	شماره کروموزوم
P-Value	χ^2	Obs.Bp%	P-Value	χ^2	Obs.Bp%		
NS	۰/۹۳۱۲	۱۰/۹۴	۰/۰۵	۴/۳۷۱۷	۱۴/۱۶	۸/۲۵	۱
NS	۰/۰۶۱۳	۷/۲۹	NS	۰/۸۳۳۱	۱۰/۵۷	۸/۰۶	۲
NS	۳/۲۹۹۴	۱۱/۲۸	NS	۱/۴۲۵۸	۹/۶۸	۶/۶۷	۳
NS	۰/۶۳۹۲	۸/۳۳	NS	۰/۳۹۰۰	۹/۸۹	۶/۳۸	۴
NS	۲/۲۱۰۵	۹/۷۲	NS	۰/۴۴۹۲	۷/۷۱	۶/۱۱	۵
NS	۱/۰۲۳۸	۳/۳۰	NS	۰/۰۴۷۳	۵/۲۰	۵/۷۷	۶
NS	۰/۲۹۸۲	۳/۹۹	NS	۰/۴۱۵۶۳	۳/۷۶	۵/۲۹	۷
NS	۰/۸۳۱۷	۲/۹۵	NS	۰/۴۲۳۴	۳/۴۰	۴/۸۷	۸
NS	۰/۰۰۸۹	۴/۶۹	NS	۰/۱۱۸۷	۳/۷۶	۴/۵۳	۹
NS	۰/۳۷۷۳	۳/۱۲	NS	۰/۱۵۶۲	۳/۵۸	۴/۴۵	۱۰
NS	۰/۳۳۰۰	۵/۷۳	NS	۰/۱۲۴۷	۳/۷۶	۴/۵۵	۱۱
NS	۰/۲۹۷۱	۳/۳۰	NS	۰/۳۳۹۹	۳/۲۲	۴/۴۹	۱۲
NS	۰/۳۳۷۵	۲/۴۳	NS	۰/۰۶۲۷	۳/۰۵	۳/۵۵	۱۳
NS	۰/۸۲۰۵	۳/۹۹	NS	۰/۰۰۰۰۲	۳/۴۰	۴۴/۳	۱۴
NS	۰/۱۲۰۱	۳/۸۲	NS	۰/۰۰۷۰	۳/۰۵	۳/۲۳	۱۵
NS	۰/۵۲۴۸	۴/۱۷	NS	۰/۰۰۱۲	۲/۸۷	۲/۹۶	۱۶
NS	۰/۰۰۵۹	۲/۹۵	NS	۰/۱۵۹۲	۲/۱۵	۲/۸۵	۱۷
NS	۰/۰۸۳۳	۳/۱۲	NS	۰/۴۰۸۱	۱/۶۱	۲/۶۷	۱۸
NS	۰/۸۹۳۴	۰/۶۹	NS	۰/۳۰۵۹	۱/۲۵	۲/۰۶	۱۹
NS	۱/۶۲۳۹	۰/۳۵	NS	۱/۶۰۷۱	۰/۳۶	۲/۲۹	۲۰
NS	۰/۴۸۵۲	۰/۶۹	NS	۰/۹۲۳۱	۰/۳۶	۱/۵۷	۲۱
NS	۱/۳۲۷۵	۰/۱۷	NS	۱/۰۰۸۵	۰/۳۶	۱/۶۷	۲۲
NS	۰/۹۱۳۰	۲/۹۵	NS	۰/۰۱۴۳	۴/۸۴	۵/۱۶	X

Obs.Bp% درصد نقاط شکست مشاهده شده، P.Value معنی دار در سطح، NS: غیر معنی دار

* میکرومتر

شکست ناشی از القاء ۳ گری اشعه گاما در افراد سالم در تمام کروموزومها به جزء کروموزوم شماره ۱ متناسب با طول کروموزومها و بر مبنای محتوای DNA (۳۴۰۳۳) بطور تصادفی در طول کروموزوم پخش شده است. فراوانی نقاط شکست در طول کروموزوم شماره ۱ بطور معنی داری در سطح ۵ درصد بیشتر بود و فراوانی نقاط شکست ناشی از القاء ۳ گری اشعه گاما در بیماری هموگلوبین H در تمام کروموزومها متناسب با طول آنها و بر مبنای محتوای DNA به طور تصادفی در طول کروموزوم پخش شده بود. در این پژوهش بر اساس آنالیز G بندینگ، فراوانی نقاط شکست و نحوه پخش آنها بر روی کروموزوم شماره ۱۶ بین افراد طبیعی و افراد دچار بیماری هموگلوبین H تفاوت معنی دار نشان نداد.

میانگین کل آسیب های خودبخودی در گروه شاهد با حدود ۰/۰۱۲ در هر سلول، تفاوت معنی داری با گروه بیماری هموگلوبین H نشان نداد. میانگین فراوانی دی سانتریکها در این گروهها از سایر آسیبها بیشتر بود. هیچ کروموزوم حلقوی در این گروهها دیده نشد. همانطور که در شکل ۱ دیده می شود، میانگین کل آسیبها در افراد سالم پس از تابش دهی با حدود ۰/۶ در هر سلول، افزایش چشمگیری نسبت به حالت قبل از تابش دهی داشته است. میزان آسیب القاء شده پس از ۳ گری اشعه حدود ۵۰ برابر آسیب پایه است و این اختلاف از نظر آماری با آزمون t کاملاً معنی دار است (P < ۰/۰۰۰۰۱). میانگین کل آسیبها پس از تابش دهی در گروه شاهد تفاوت معنی داری با افراد بیماری هموگلوبین H نشان نداد. در این گروهها نیز میانگین فراوانی دی سانتریکها از سایر آسیبها بیشتر بود. فراوانی نقاط

تیمار ۳ گری و زمان صفر نتایج، شبیه تیمار بدون اشعه و زمان صفر بود. در این تیمار نیز درصد آپوپتوز در بیماری هموگلوبین H از نظر آماری تفاوت معنی‌دار با افراد سالم داشت ($P < 0/01$). وقتی نمونه‌هایی را که تحت تأثیر اشعه قرار نگرفته بودند به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO₂ دار نگهداری شد، میزان آپوپتوز به‌طور کاملاً معنی‌دار نسبت به زمان صفر افزایش نشان داد و افراد با بیماری هموگلوبین H با ۱۸/۲۸ درصد آپوپتوز و افراد سالم با ۱۱/۲۹ درصد آپوپتوز اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P < 0/01$).

جدول ۴. درصد آپوپتوز در لکوسیت‌های افراد سالم و مبتلایان به هموگلوبین H در تیمارهای مختلف

گروه‌ها	تیمار			
	۳ گری - ۴۸ ساعت	۰ گری - ۴۸ ساعت	۳ گری - ۰ ساعت	۰ گری - ۰ ساعت
کنترل	۱/۳۱ ± ۳۰/۵۴	۰/۲۱ ± ۲۹/۱۱	۱۱/۰ ± ۰/۷۱	۱۳/۰ ± ۰/۶۱
هموگلوبین H	۱/۳۵ ± ۳۳/۵۲	۰/۱۱ ± ۲۸/۱۸	۲۴/۰ ± ۷/۰۲	۲۱/۰ ± ۷/۲۲

کروموزوم مبتنی بر محتوای DNA آن به‌طور تصادفی در طول کروموزوم پخش شده‌است. نتایج تحقیقات دیگر نیز نشان داده که نقاط شکست القایی بوسیله اشعه در تمام کروموزوم‌ها متناسب با طول آن‌ها مبتنی بر محتوای DNA کروموزوم‌ها به‌طور تصادفی پخش شده‌است (۳۷-۳۹). یک‌سوم نتایج تحقیقات دیگر بر افراد طبیعی به روش G بندینگ نشان داد که نقاط شکست القایی بوسیله اشعه متناسب با طول کروموزوم‌ها یا محتوای DNA آنها به‌طور غیرتصادفی پخش شده (۴۰-۴۲) و در بندهای خاصی از کروموزوم نقاط داغ تشکیل می‌دهد. در یک تحقیق برکوئینرو و همکاران (۴۳) با روش FISH و نقاشی تمام کروموزوم‌ها نشان دادند که پخش ناهنجاری‌های کروموزومی القایی با اشعه متناسب با محتوای DNA آنها نیست. هتروژن بودن حساسیت پرتوی کروموزومی در صفت تالاسمی بتا دیده شد که ناشی از آسیب اکسیداتیو به‌دلیل طرح ویژه ژنتیک و بیوشیمی سلولی این‌گونه افراد است (۴۴ و ۴۵). در بیماران تالاسمی آلفا (بدون در نظر گرفتن نوع آن) مخلوطی از حساسیت پرتوی کروموزوم‌ها با پخش الگوی غیرتصادفی نقاط شکست و تشکیل نقاط داغ (بر کروموزوم‌های ۱۸-۱۶ و کروموزوم X) و همچنین پخش

بررسی آماری با آزمون t نشان داد که درصد آپوپتوز در ۵ زن و ۵ مرد سالم، رویهم رفته ۱۰ نفر به عنوان گروه شاهد، اختلاف معنی‌دار نداشت ($P < 0/1$). بنابراین، میانگین درصد آپوپتوز در گروه شاهد برای مقایسه با گروه بیمار در نظر گرفته شد. نتایج درصد آپوپتوز در لکوسیت افراد سالم و بیماران هموگلوبین H در جدول ۴ خلاصه شده‌است. همانطور که دیده می‌شود درصد آپوپتوز افراد سالم در تیمار بدون اشعه و زمان صفر حدود ۱ درصد ولی در گروه هموگلوبین H حدود ۲/۷ درصد است که از نظر آماری نسبت به افراد سالم تفاوت معنی‌دار نشان می‌دهد ($P < 0/01$).

درصد آپوپتوز در نمونه‌های مورد تیمار ۳ گری اشعه که در محیط کشت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO₂ دار نگهداری شده بودند، در هر دو گروه کنترل و بیمار به میزان بسیار چشمگیر بیش از موارد تیمار بدون اشعه و زمان صفر، تیمار اشعه در زمان صفر و تیمار بدون اشعه پس از ۴۸ ساعت بود. با این وجود پس از تیمار ۳ گری اشعه و نگهداری ۴۸ ساعت در محیط کشت، افراد با بیماری هموگلوبین H با ۳۳/۵ درصد آپوپتوز در مقایسه با افراد سالم با ۳۰/۵ درصد آپوپتوز اختلاف معنی‌دار نشان دادند ($P < 0/01$).

بحث و نتیجه‌گیری

برای درک ارتباط الگوی پخش، فراوانی نقاط شکست ناشی از القای اشعه در سلول‌های طبیعی انسان و اندازه کروموزوم، ساختار مولکولی یا محتوای DNA چندین پژوهش انجام شده‌است (۳۵). نتایج، متناقض و غیرقطعی بودند (۳۶). در این تحقیق آنالیز ۷۰۰ متافاز حاصل از ۱۰ فرد نرمال پس از القاء ۳ گری اشعه گاما نشان داد که نقاط شکست در تمام کروموزوم‌ها به جز کروموزوم شماره ۱ متناسب با طول

محسوب می‌شود. ROS شامل رادیکال‌های سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل، به‌اضافه مشتق اکسیژن با الکترون-های نابرابر مانند پراکسید هیدروژن، اکسیژن تنها و اسید هیپوکلروس است. چون رادیکال‌های آزاد یک یا تعداد بیشتری الکترون نابرابر دارند به شدت ناپایدار هستند. این رادیکال‌ها در نتیجه دریافت یا از دست دادن الکترون، به سلول‌ها، پروتئین‌ها و DNA آسیب می‌رسانند. نتیجه تجزیه گلوبول‌های قرمز در این افراد تولید گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی است که می‌توانند موجب ایجاد شکست دو رشته‌ای Double Strand Break (DSB) در DNA شود (۵۳ و ۵۲). نشان داده شده آپوپتوز نقشی اساسی در پاتوفیزیولوژی کم-خونی بیماران تالاسمی دارد (۲۵ و ۳). آپوپتوز ساز و کاری برای مقابله با گسترش خون‌سازی غیرموثر در نظر گرفته می‌شود (۵۱ و ۵۴). همانگونه که در بیماران تالاسمی بتا نشان داده شد تجمع زنجیره آلفاگلوبین مرگ برنامه‌ریزی شده سلول را در رده‌های ارتروئید تشدید می‌کند (۴۹، ۲۷ و ۵۷-۵۵). همبستگی مستقیم بین توسعه خون‌سازی غیرموثر و بسط آپوپتوز ارتروئید در مدل مورین تالاسمی بتا به اثبات رسیده است (۵۶). ممکن است دلیل افزایش آپوپتوز در بیماران هموگلوبین کونستانت اسپرینگ (Hb CS/CS)، تجمع α CS باشد و همانند αA موجب افزایش آپوپتوز در مرحله پیش‌سازهای ارتروئید شود (۵۸ و ۵۵، ۲۹). مطالعه دیگری افزایش آپوپتوز در پیش‌سازهای ارتروئید بیماری هموگلوبین H را در مقایسه با افراد سالم نشان می‌دهد (۵۴). ممکن است به هر حال تجمع بتاگلوبین موجب افزایش ملایم آپوپتوز در پیش‌سازهای ارتروئید در بیماری هموگلوبین H شود (۲۷). باتوجه به رابطه مستقیم آسیب اکسیدان و آپوپتوز، پنداشته می‌شود رادیکال‌های آزاد اکسیژن که محصول در معرض قرار گرفتن استرس‌های اکسیدان هستند یکی از مهم‌ترین عوامل القای آپوپتوز باشند (۵۹). همانطور که در جدول ۴ دیده می‌شود، در لکوسیت‌های خون بیمار نشده در زمان صفر بیماران هموگلوبین H، درصد آپوپتوز به‌طور معنی‌دار از افراد سالم ($P < 0.01$) بیشتر است. احتمال دارد افزایش دو برابری آپوپتوز در بیماری هموگلوبین H در مقایسه با افراد سالم به‌دلیل تجمع بتاگلوبین، آسیب‌های ناشی از ROS و

تصادفی نقاط شکست متناسب با طول کروموزوم‌ها دیده شد (۲۴). جانسون و همکاران در مرور مقاله‌ها (۳۶) بین محتوای ۱۴ کروموزوم اتوزوم و فراوانی نقاط شکست رابطه کم و پیش خطی بدست آوردند ولی ۸ کروموزوم اتوزوم دیگر و کروموزوم X از نظر آماری انحراف معنی‌دار نشان داده بودند. بنابراین، فراوانی و الگوی پخش نقاط شکست کروموزومی ناشی از القاء اشعه در سلول‌های انسانی متفاوت است.

در این تحقیق براساس آنالیز G بندینگ در بیماران هموگلوبین H، فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی القایی ناشی از ۳ گری اشعه گاما به‌صورت تصافی و متناسب با محتوای DNA کروموزوم‌ها پخش شد. فراوانی نقاط شکست و نحوه پخش آنها بر کروموزوم شماره ۱۶ بین افراد نرمال و افراد دچار بیماری هموگلوبین H برخلاف گزارش قبلی که با تعداد نمونه اندک (۴ نفر) و بدون تفکیک انواع تالاسمی آلفا انجام شده بود، تفاوت معنی‌دار نشان نداد. در افراد سالم و افراد دچار بیماری هموگلوبین H در این تحقیق پس از تیمار با ۳ گری اشعه گاما، تمام ناهنجاری‌های کروموزومی خصوصاً کروموزوم‌های دی‌سانتربیک افزایش چشمگیری یافت. ایجاد کروموزوم‌های دی‌سانتربیک، کمابیش ویژه پرتواست (۴۸-۴۶).

هنوز مشخص نشده که چگونه تجمع اضافی آلفاگلوبین در بتا تالاسمی و بتاگلوبین در آلفا تالاسمی موجب همولیز گلوبول‌های قرمز در خون محیطی و انهدام پیش از بلوغ پیش‌سازهای ارتروئید در مغز استخوان (خون‌سازی غیرموثر) می‌شود (۴۹). در بتا تالاسمی، سنتز زنجیره پلی‌پپتید، غیرمتعادل بوده و در پی آن زنجیره آلفا آزاد اضافی موجب تشکیل اجسام انکلوزیون هموکروم اضافی می‌شود که می‌تواند باعث آسیب اکسیداتیو در غشای سلولی و انهدام ارتروسیت نابالغ در مغز استخوان شود (۵۱ و ۵۰). استرس اکسیداتیو هنگامی روی می‌دهد که تولید مولکول‌های زیانبار به نام رادیکال‌های آزاد بیش از گنجایش حفاظت بخشی دفاع آنتی‌اکسیدانی باشد. رادیکال‌های آزاد حاوی اکسیژن که گونه‌های واکنش‌گر اکسیژنی Reactive Oxygen Species (ROS) نامیده می‌شوند، مهم‌ترین رادیکال‌های آزاد بیولوژی

مختلف سلولی در معرض اشعه گاما توسط پژوهشگران گوناگون گزارش شده است (۶۳ و ۶۰-۶۴). رخداد آپوپتوز در پی پارگی‌های دو رشته DNA قویاً پیشنهاد می‌کند که آسیب‌های DNA ناشی از اشعه در القای آپوپتوز نقش داشته باشد. بخش عمده‌ای از پارگی‌های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای DNA ناشی از تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل است (۶۴ و ۶۵). همچنین، ممکن است افزایش میزان آپوپتوز بعد از تیمار ۳ گری اشعه گاما پس از ۴۸ ساعت بدلیل القای آسیب در DNA در پی تابش اشعه گاما باشد. این یافته‌ها به روشنی نشان می‌دهد که لکوسیت نمونه‌های بیماری هموگلوبین H به آسیب اکسیداتیو DNA منجر به القاء آپوپتوز، مستعدترند (۶۶). بنابراین، دور نگهداشتن بیماران هموگلوبین H از مواد فیزیکی و شیمیایی که آسیب‌های اکسیداتیو DNA ایجاد می‌کنند، ممکن است به بهبود مدیریت این بیماران کمک کند.

استرس‌های اکسیدانت باشد. نمونه‌هایی که تحت تأثیر اشعه قرار نگرفته بودند را به مدت ۴۸ ساعت در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در انکوباتور CO₂ دار نگهداری کردیم. در این حال میزان آپوپتوز به‌طور بسیار چشمگیر نسبت به زمان صفر افزایش نشان داد و این افزایش در افراد بیماری هموگلوبین H به‌طور معنی‌دار ($P < 0.01$) بیش از افراد سالم بود. ممکن است این یافته‌ها ناشی از حساسیت بیشتر ایتروسیت‌های افراد تالاسمی به شوک اسمزی، آسیب ناشی از ROS و استرس‌های اکسیداتیو باشد که منجر به افزایش آپوپتوز می‌شود. پس از تیمار با ۳ گری اشعه گاما در زمان صفر میزان آپوپتوز هیچگونه تفاوت معنی‌دار با حالت بدون تیمار با اشعه در زمان صفر نداشت ولی بعد از تیمار با اشعه و پس از ۴۸ ساعت نگهداری در محیط کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، میزان آپوپتوز به‌طور چشمگیر افزایش یافت. افزایش میزان آپوپتوز پس از قرار گرفتن گونه‌های

منابع

1. Annpoulous Stamatoy G. Molecular Basis of Blood Disease. Philadelphia; Wb. Sanders, 1994: 174-205.
2. Old JM. Investigation and Diagnosis of Haematological defects. In: Rapley R, Walker M R Molecular Diagnostics., Opxford; Blackwell Sci, 1994: 180-194.
3. Beshlawy A EL, Seoud H, Ibrahim A, Youssry I, Gabre H, Isma'eel H, Aoun E, Taher A. Apoptosis in Thalassemia Major Reduced by Butyrate Derivative. Acta Haematol 2005; 114: 155-159.
4. Agarwal S. Characterization of Beta-thalassemia Mutation in 57 Beta-thalassemia Families Seen at Luknow. Indian J Med Res 1994; 100: 106-110.
5. Asha S. Thalassemia Syndromes. Indian J Med Sci 2004; 58: 445-449.
6. Bunn H, Franklin B, Bernard G. Hemoglobin Molecular, Genetic and Clinical Aspect. Philadelphia; W.B. Saunders Company, 1989: 322-350.
7. Honig George R, Junius G, Adams I. Human Hemoglobin Genetics. New York; springer-Verlag, 1986: 1-66.
8. Jingzhong L, Mei Y, Zhangyong W, Lirong W, Yan Z, Bai X. Molecular Diagnosis of α - Thalassemia by Combining Real-time PCR with SYBR Green 1 and Dissociation Curve Analysis. Translational Research 2006; 148: 6-12.
9. Tarang A, Study of Thalassemia in Guilan Province. M S Thses of Thehran University, 1996. [Text in Persian]
10. Alan R C, Renzo G, Dudley J P, Melody JC, Elliott V. Thalassemia. Hematology 2004; 1:14.
11. Beris P, Rgis D, Philippe E. Prevention of Beta-thalassemia Major and Hb Bart's Hydrops Fetalis Syndrome. seminars in Hemat 1995; 32(4): 244-261.
12. Malaise EP. Inherent Cellular Radiosensitivity as a Basic Concept for Human Tumor Radiotherapy. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1981; 7: 621-29.
13. Fertil B, Deschavann PJ, Fertil B. A Review of Human Cell Radiosensitivity Invitro. Int J Radiat Oncol Biol Phys 1996; 34(1): 251-66.
14. McKay M, Peters L. Genetic Determination of Radiation Response. Int J Radiat Biol 1997; 72(2): 225-229.
15. Hecht F, McCaw BK. Evidence for a Consistent Chromosomal Abnormality in Ataxia Telangiectasia. Am J Hum Genet 1975; 25: 32-33.
16. Yunis JJ, Soreng AL. Constitutive Fragile Sites and Cancer. Science 1984; 226: 1199-1204.
17. Caspersson T, Haglund V, Lindell B, Zech L. Radiation-induced Non-random Chromosome Breakage. Exp Cell Res 1972; 75: 541-543.

18. Holmberg M, Jonasson J. Preferential Location of X-ray-induced Chromosome Breakage in the R-Bands of Human Chromosomes. *Hereditas* 1973; 74: 57-68.
19. Dubos C, Viegas-Pequignot E, Dutrillaux B. Localization of Gamma Ray-induced Chromatid Breaks Using three Consecutive Staining Techniques. *Mutat Res* 1978; 49: 127-131.
20. Kano Y, Little J.B. Site-specific Chromosomal Anomalies in 639 Spontaneous Abortuses. *Hum Genet* 1986; 55: 89-98.
21. Brown JM, Evans J, Kovacs MS. The Prediction of Human Tumour Radiosensitivity in Situ: an Approach Using Chromosome Aberrations Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24: 279-286.
22. Kovacs MS, Evans JW, Johnstone IM, Brown JM. Radiation-induced Damage, Repair and Exchange Formation in Different Chromosomes of Human Fibroblasts Determined by Fluorescence in Situ Hybridization. *Radiat Res* 1994; 137: 3443.
23. Pandita TK, Gregoire TK, Dhingra K, Hittelman WN. Effect of Chromosome Size on Aberration Levels Caused by Gamma as Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 67: 94-101.
24. Radha S, Marimuthu KM. Syndrome-related Chromosome-specific Radiation-Induced Break Point of Various Inherited Human Metabolic Disorders. *Mutat Res/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2003; 538(1-2): 133-143.
25. Howie SEM, Harrison DJ, Wyllie AH. Lymphocyte Apoptosis. Mechanisms and Implications in Disease. *Immunol Rev* 1994; 141: 142-156.
26. Palmieri L, Ronca F, Malengo S, Bertelli A. Protection of β -Thalassemia Erythrocytes from Oxidative Stress by Propionyl Carnitine. *Int J Tiss React* 1994; 16: 121-129.
27. Cantis F, Tabelline L, Lucarelli G, Buffi O, Tonucci P, Persine B. The Importance of Erythroid Expansion in Detecting the Extent of Apoptosis in Erythroid Precursors in Patients with β -Thalassemia Major. *Blood* 2000; 96: 3624-3629.
28. Thompson C. Apoptosis in the Pathogenesis and Treatment of Disease. *Science* 1995; 267: 1426-1462.
29. Loo DT, Rillema JR. Measurement of Cell Death. *Methods Cell Biol* 1998; 57: 251-264.
30. Czene S, Testa E, Nygren J, Belyaev I, Harms-Ringdahl M. DNA Fragmentation and Morphological Changes in Apoptotic Human Lymphocytes. *Biochem and Biophys Res Commun* 2002; 294: 872-878.
31. Wojewodzka M, Gradzka I, Buraczewska I. Modified Neutral Comet Assay for Human Lymphocytes. *Nukleonika* 2002; 47: 1-5.
32. Wilkins RC, Wilkinson D, Maharaj HP, Bellier PV, Cybulski MB, Mclean JRN. Differential Apoptotic Response to Ionizing Radiation in Subpopulations of Human White Blood Cells. *Mutation Research* 2002; 513: 27-36.
33. Boreham DR, Gale KL, Maves SR, Walker JA, Morrison DP. Radiation-Induced Apoptosis in Human Lymphocytes: Potential as a Biological Dosimeter. *Health Phys* 1996; 71: 685-691.
34. Cregan SP, Smith BP, Brown DL, Mitchel RE. Two Pathways for the Induction of Apoptosis in Human Lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 1069-1080.
35. Mendelsohn M L, Mayall B H, Bogart E, Moore D H, Perry II and B.H. DNA Content and DNA Based Centromeric Index of the 24 Human Chromosomes. *Science* 1973; 179: 1126-1129.
36. Johnson K L, Breener D J, Nath J, Tucker J D, Geard C R. Radiation-induced Break point Misjoining in Human Chromosomes: Random of non-Random. *Int J Radiat Biol* 1999; 75: 131-141.
37. Brown JM, Evans J, Kovacs MS. The Prediction of Human tumour Radiosensitivity in Situ: an Approach Using Chromosome Aberrations Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992; 24: 279-286.
38. Kovacs MS, Evans JW, Johnstone IM, Brown JM. Radiation-induced Damage, Repair and Exchange Formation in Different Chromosomes of Human Fibroblasts Determined by Fluorescence in Situ Hybridization. *Radiat Res* 1994; 137: 3443.
39. Pandita TK, Gregoire TK, Dhingra K, Hittelman WN. Effect of Chromosome Size on Aberration Levels Caused by Gamma as Detected by Fluorescence in Situ Hybridization. *Cytogenet Cell Genet* 1994; 67: 94-101.
40. Sabatier L, Muleris M, Prieur M, Alachakar W, Hoffschir F, Prod'home-Ricoul M, Gerbault-Seureau M, Viegas-Pequignot E, Dutrillaux B. Specific Sites of Chromosomal Radiation-induced Rearrangements, In: Jolles G, Cordier A (ed). *New Trends in Genetic Risk Assessment*, Academic Press, New York. 1989; 213-224.
41. Toker J D, Senft J.R. Analysis of Naturally Occurring and Radiation-induced Break Point Location in Human Chromosomes 1, 2 and 4. *Radiat Res* 1994; 140: 31-36.
42. Lee C L, Kamra O P. The pattern of Radiation-induced Transmissible Aberrations in a Human Cell Culture. *Hum Genet* 1981; 57: 380-384.
43. Barquinero J F, Knehr S, Braselmann H, Figel M, Bauchinger M. DNA proportional Distribution of Radiation-induced Chromosome Aberrations Analysed by Fluorescence in Situ Hybridization Painting of all Chromosomes of a Human Female Karyotype. *Int J Radiat Biol* 1998; 74: 315-323.

44. Krishnaja AP, Sharma NK. Heterogeneity of Chromosome Damage in Beta-thalassaemia Traits. An Evaluation of Spontaneous and Gamma-ray-Induced Micronuclei and Chromosome Aberrations in Lymphocytes *In Vitro* after G0 and G2 Phase Irradiation. *Int J Radiat Biol* 1994; 66(1): 29-39.
45. Krishnaja AP, Sharma NK. Heterogeneity in Chemical Mutagen-Induced Chromosome Damage after G2 Phase Exposure to Bleomycin, Ara-c and Gentian Violet in Cultured Lymphocytes of Beta-Thalassaemia Traits. *Mutat Res* 1995; 331(1): 143-148.
46. Mozdarani H. Cytogenetic Bio-indicators and Their implications in Biomonitoring Individuals Exposed to Chronic and Low Doses of Ionizing Radiation. *Int J Low Radiation* 2008; 5,(2):123-132.
47. Romm H, Stephan G. Chromosome Analysis-a Routine Method for Quantitative Radiation Dose Assessment. *Kernetechnik* 1990; 55: 219-225.
48. Venkatachalam P, Paul SFD, Mohankumar MN. Higher Frequency of Dicentric and Micronuclei in Peripheral Blood Lymphocytes of Cancer Patients. *Mutation Res* 1999; 425:1-8.
49. Schrier SL. Pathophysiology of Thalassemia. *Curr Opin Hematol* 2002; 2(9): 123-126.
50. Shiner E, Rachmilewitz. Oxidative Denaturation of Red Blood Cells in Thalassemia. *Semin Hematol* 1990; 27: 70-76.
51. Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, Katein AM, YU X, Gell DA, Mackay JP, Adachi K, Foster-Brown L, Loudon CS, Gow AJ, Weiss MJ. Loss of α -Hemoglobin-Stabilizing Protein Impairs Erythropoiesis and Exacerbates β -Thalassemia. *Clin Invest* 2004; 114: 1457-1466.
52. Cregan SP, Smith BP, Brown DL, Mitchel RE. Two Pathways for the Induction of Apoptosis in Lymphocytes. *Int J Radiat Biol* 1999; 75(9): 1069-1086.
53. Mozdarani H, Ghoraiean P. Modulation of Gamma Ray Induced Apoptosis in Human Peripheral Blood Leukocytes by Famotidine and Vitamin C. *Mutat Res* 2008; 649(1-2): 71-78.
54. Pootrakul P, Sirankapracha P, Hemsorach S, Mounsub W, Kumbunlue R, Piangitjagum A, Wasi P, Ma L, Schrier S L. A Correlation of Erythrokinetics, Ineffective Erythropoiesis, and Erythroid Precursor Apoptosis in Thai patients with Thalassemia. *Blood* 2000; 96: 2606-2612.
55. Yuan J, Anglucci E, Lucarelli G. Accelerated Programmed Cell Death in Erythroid Precursors of Patients with Severe β -thalassemia. *Blood* 1993; 82: 374-377.
56. Paszty C, Naria M, Rubin EM, et al. A Viable Murine Model of Severe β -thalassemia: Exploration of the Role of Programmed Cell Death (PCD) in Ineffective Erythropoiesis (IE). *Blood* 1996; 88(1): 596.
57. Mathias LA, Fisher TC, Zeng L, Meiselman HJ, Weinberg KI, Hiti AL, Malik P. Ineffective Erythropoiesis in β -Thalassemia Major is Due to Apoptosis at the Polychromatophilic Normoblast Stage. *Experimental Hematology* 2000; 28(12): 1343-1353.
58. Schrier SL, Bunyaratvej A, Khuhapinant A, et al. The Unusual Pathobiology of Hemoglobin Constant Spring Red blood Cells. *Blood* 1997; 89:1702-1769.
59. Hockenbory DM, Zoltan N, Xiao Ming Y. Bcl-2 Functions in an Antioxidant Pathway to Prevent Apoptosis. *Cell* 1993; 75 241-251.
60. Allan DJ. Radiation Induced Apoptosis; Its Role in a MADCat (Mitosis-Apoptosis-Differentiation-Calcium Toxicity) Scheme of Toxicity Mechanisms. *Int J Radiat Biol* 1992; 62 145-152.
61. Lang KS, Roll B, Myssina S, Schittenhelm M, Scheel-walter HG, Kanz L, Fritz J, Lang F, Huber SM, Wieder T. Enhanced Erythrocyte Apoptosis in Sickle Cell Anemia, Thalassemia and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Cell Physiol Biochem* 2002; 12(5-6): 365-372.
62. Kojima Y, Hondo T, Zhao QL, Shoji M, Futatsuya R. Protective Effects of Cimetidine on Radiation-Induced Micronuclei and Apoptosis in Human peripheral Blood Lymphocytes. *Free Radic Res* 2002; 36: 255-63.
63. Lee YJ, Lee DH, Cho Ck, Chung HY, Bae S, Jhon GJ, Soh JW, Jeoung DI, Lee SJ, Lee Ys. HSP25 Inhibits Radiation-Induced Apoptosis Through Reduction of PKC Delta-mediated ROS Production. *Oncogene* 2005; 24: 3715-25.
64. Siddiqi MA, Bothe E. Single and Double Strand Break Formation in DNA Irradiated in Aqueous Solutions: Dependence on Dose and OH Radical Scavenger Concentration. *Radiat Res* 1987; 112: 449-63.
65. Uma Devi P, Sharma AS. Mouse Bone Marrow Response to Low Doses of Whole Body Gamma Irradiation: Induction of Micronuclei. *Int J Radiat Biol* 1990; 57: 97-101.
66. Tarang A, Mozdarani H, Akbari MT. Frequency of Background and Radiation-induced Apoptosis in Leukocytes of Individuals with α -Thalassemia Variants, Assessed by the Neutral Comet Assay. *Hemoglobin* 2009; 33(3):247-57.

Aberrations and Apoptosis Induced in the Leukocytes of Hemoglobin H Disease Individuals after Irradiation

*Tarang A. (Ph D)¹

*Corresponding Address: Department of Genomics, Branch of North Region of Iran, Biotechnology Research Institute of Iran, Rasht, IRAN

Email: a_tarang@hotmail.com

Received: 19/Jun/2012 Accepted: 5/Jan/2013

Abstract

Introduction: Alpha thalassemia is a set of hereditary anemia, which occurs frequently not only in the countries of the Mediterranean seacoast but also in the tropics and subtropics of the world including South East Asia and southern Iran. The α -thalassemia can be generally categorized as: silent α -thalassemia carrier, α -thalassemia carrier, hemoglobin H disease, and α -thalassemia major (hydrops fetalis).

Objective: To study the effects of ionizing radiation on apoptosis and aberration induction in the leukocytes of hemoglobin H disease sufferers, compared to normal controls.

Materials and Methods: Peripheral blood samples were obtained by venopuncture from ten healthy volunteers and ten Hb H patients. Blood samples were divided into two parts with one exposed to 3 Gy gamma rays generated from a ⁶⁰Co source and the other without any irradiation. The blood samples were either immediately used for the comet assay or left in 37 °C CO₂ incubator for 48 hours in RPMI-1640 medium. Chromosome analyses were carried out exclusively on first division metaphases. For all samples, 70 metaphases were observed. Obtained data were statistically analyzed using SPSS (version 15) software.

Results: Results showed that the frequency of spontaneous aberration was similar in all the study groups. In normal individuals, in all the chromosomes except chromosome 1, a random distribution of break points proportional to their lengths based on their DNA content was observed. In hemoglobin H disease individuals, in all the chromosomes, a random distribution of break points proportional to their lengths based on their DNA content was observed. Results showed that the frequency of apoptosis in the leukocytes of freshly drawn blood of Hb H patients was significantly higher than that in the controls. Incubation of non irradiated samples in culture medium and CO₂ incubator at 37 °C for 48 hours greatly increased the frequency of apoptosis in all the samples. However, the frequency of apoptosis in Hb H patients was significantly higher than that in the controls. Irradiated samples kept for 48 hours in incubator prior to processing for comet assay, showed higher frequency of apoptosis, compared to non irradiated counterparts.

Conclusion: We can conclude that among the α -thalassemia patients those with HbH disease might be considered as radiosensitive in terms of apoptosis formation.

Key words: Alpha- Thalassemia/ Apoptosis/ Chromosome Aberrations/ Comet Assay/ Hemoglobin H/ Metaphase/ Radiation

Journal of Guilan University of Medical Sciences, No: 86, Pages: 1-11