

بررسی آسیب‌های کروموزومی ناشی از پروتکل‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در بیماران مبتلا به لوسمی حاد به روش آنالیز متافاز

سعید شهرابی^{۱*} (M.Sc)، محسن طاهری^۲ (M.Sc)، حسین مزدرانی^۳ (Ph.D)، مینا ایزدیاری^۴ (M.D)

- ۱ - دانشگاه علوم پزشکی سمنان، دانشکده پزشکی، گروه هماتولوژی
- ۲ - دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه ایمونوهما‌تولوژی
- ۳ - دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه رادیولوژی
- ۴ - دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان مرکز طبی اطفال، بخش هماتولوژی

خلاصه

سابقه و هدف: لوسمی‌های حاد که از تغییر شکل بدخیم سلول‌های خونساز ناشی می‌شوند، در غالب موارد با ناهنجاری‌های کروموزومی همراهند. درمان این بیماری نیز سبب ایجاد انواع ناهنجاری‌های کروموزومی می‌گردد. در تحقیق حاضر آسیب‌های کروموزومی ناشی از پروتکل‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد به روش آنالیز متافاز مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها: ۳۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستی حاد با توجه به مراحل درمانی به سه گروه، بیمارانی که هیچ‌گونه درمانی دریافت نکرده‌اند، بیمارانی که شیمی‌درمانی شده‌اند و بیمارانی که پروتکل توأم شیمی‌درمانی و پرتودرمانی را دریافت کرده‌اند تقسیم و ۱۰ نفر نیز به عنوان گروه کنترل در نظر گرفته شدند و در آنها آسیب‌های کروموزومی به روش آنالیز متافاز مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان می‌دهد که در مقایسه با گروه شاهد در گروه بیمارانی که هیچ درمانی را دریافت نکرده بودند میزان آسیب‌های کروماتیدی بیشتر می‌شود. همچنین میزان آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی در بیمارانی که درمان دریافت کرده‌اند با هر مرحله از درمان بیشتر می‌شود و نسبت به مرحله قبل اختلاف معنی‌داری را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد که شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در مبتلایان به لوسمی حاد سبب افزایش آسیب‌های کروموزومی در این افراد می‌شود و انجام پروتکل‌های درمانی فراوانی این آسیب‌ها را در هر مرحله درمان بیشتر از مرحله قبلی خواهد کرد.

واژه‌های کلیدی: لوسمی، شیمی‌درمانی، رادیوتراپی، آسیب ژنتیکی، ناهنجاری‌های کروموزومی.

مقدمه

غالب لوسمی در اطفال هستند و تقریباً ۸۰ درصد لوسمی‌های حاد اطفال را تشکیل می‌دهند [۵]. لوسمی لنفوبلاستی حاد با تقسیم و تجمع غیرقابل کنترل پیش‌سازهای لنفوبلاستی که به طور محدودی متمایز می‌شوند مشخص می‌گردد.

لوسمی‌ها دسته‌ای از اختلالات نئوپلاستیک هستند که با پرولیفراسیون کلونال غیرطبیعی سلول‌های خونساز که از یک سلول مادر بدخیم منشأ می‌گیرند مشخص می‌شوند. لوسمی‌های لنفوبلاستی حاد (ALL) شکل

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۲۳۱-۳۳۲۲۰۸۰، فاکس: ۰۲۳۱-۳۳۳۱۵۵۱، شماره پستی: ۳۳۱۱۳۱

تقسیمات سلولی گم می‌شوند و شامل قطعات کروموزومی بدون سانترومر و قطعات شکسته شده کروموزوم‌ها می‌باشند. بیشترین ناهنجاری‌هایی که معمولاً دیده می‌شوند شکاف و شکست می‌باشد که آسیب‌ها می‌تواند در یک کروماتید یا هر دو کروماتید یک کروموزوم دیده شود. معمولاً اگر ناحیه آسیب دیده کمتر از عرض یک کروماتید باشد آن را شکاف (Gap) و اگر بیشتر از عرض کروماتید باشد آن را شکست (Deletion) می‌نامند. یکی از تست‌هایی که برای اندازه‌گیری آسیب‌های ژنتیکی و ناهنجاری‌های کروموزومی استفاده می‌شود، آنالیز کروموزوم‌های متافازی است. از این روش برای بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی ایجاد شده بر اثر استفاده از مواد شیمیایی و پروتکل‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در مبتلایان به لوسمی حاد انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه. در این تحقیق ۳۰ بیمار مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) مراجعه کننده به بخش هماتولوژی مرکز طبی اطفال تهران مورد مطالعه قرار گرفتند. بیماران با توجه به مرحله درمانی و نوع درمانی که دریافت کرده‌اند به ۳ گروه تقسیم شدند: ۱- بیمارانی که هیچ‌گونه درمانی دریافت نکرده‌اند، ۲- بیمارانی که شیمی‌درمانی شده‌اند و ۳- بیمارانی که هم شیمی‌درمانی و هم پرتودرمانی شده‌اند. در هر گروه از ۱۰ نفر نمونه‌گیری به عمل آمد و ۱۰ نفر نیز به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شدند. گروه شاهد را افرادی تشکیل می‌دادند که از نظر سنی در همان رده سنی بیماران قرار داشته و تا به حال نیز هیچ‌گونه سابقه بدخیمی یا شیمی‌درمانی نداشته‌اند (جدول ۱).

مواد. جهت کشت لنفوسیتی از خون هپارینه، فیتوهاگلوآبتین PHA، فتال کالف سرم، محیط کشت

در غالب موارد لوسمی‌های حاد لنفوبلاستی با ناهنجاری‌های کروموزومی همراه می‌باشند که این ناهنجاری‌ها معمولاً به صورت تغییر در تعداد و یا تغییر در ساختمان کروموزوم‌ها می‌باشد. بیشترین نوع ناهنجاری‌های دیده شده، جابجایی بین کروموزوم‌های مختلف است [۸، ۱۰]. برای درمان این بیماران معمولاً از شیمی‌درمانی و در بعضی موارد از پرتودرمانی هم استفاده می‌شود. به دلیل عدم وجود فاصله و اختلاف مشخص میان سلول‌های سرطانی و سلول‌های سالم هیچ‌یک از داروهایی که در شیمی‌درمانی استفاده می‌شوند اثر انتخابی مطلوبی ندارند و طبیعی است که هر ترکیبی که بر روی سلول‌های سرطانی اثر داشته باشد بر روی سلول‌های سالم هم بدون تأثیر نخواهد بود. بسیاری از داروهای مؤثر ضدسرطان اثر خود را روی سلول‌هایی بر جای می‌گذارند که در یکی از فازهای سیکل سلولی باشند؛ به همین دلیل آنها را داروهای ویژه سیکل سلولی می‌نامند و گروه دیگری از این داروها که ویژه سیکل سلولی نیستند، سلول‌های سرطانی را بدون توجه به اینکه در چه فازی باشند از بین می‌برند [۴]. تمامی این داروها از طریق تأثیر بر ملکول DNA و ایجاد آسیب‌های کروموزومی باعث مرگ میتوزی سلول می‌شوند. تشعشع نیز با ایجاد آسیب در ساختمان DNA باعث متوقف ساختن میتوز می‌گردد [۴].

عوامل فیزیکی و شیمیایی قادر به ایجاد انواع آسیب‌های کروموزومی می‌باشند. این آسیب‌ها به صورت تغییر در تعداد یا تغییرات ساختمانی و شکلی می‌باشند [۸].

تغییرات ساختمانی ایجاد شده در کروموزوم‌ها را به دو دسته تقسیم می‌کنند: ۱- ناهنجاری‌های کروموزومی پایدار که می‌تواند در نسل‌های سلولی منتقل شود و شامل حذف یا کمبودهای کروموزومی (Deletion)، مضاعف شدن کروموزومی (Duplication)، واژگونی (Inversion) و جابجایی (Translocation) می‌باشد.

۲- ناهنجاری‌های کروموزومی ناپایدار که در

جدول ۱. مقایسه آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی در گروه‌های مختلف

بیماران	گروه شاهد	گروه بیماران قبل از درمان	گروه بیماران شیمی درمانی شده	گروه بیماران شیمی درمانی و رادیوتراپی شده
نتایج				
میانگین سن (سال)	۸	۸/۵	۷	۹
انحراف معیار	۱/۵	۲/۲	۲/۵	۱/۹
جنس	دختر	۴	۶	۵
	پسر	۵	۴	۵
Chromosomal isogap	۰	۰	۴	۱۴
Chromosomal deletion	۰	۰	۳	۳
Chromosomal exchange	۰	۰	۰	۲
Chromatid gap	۴	۱۴	۴۵	۷۰
Chromatid deletion	۱	۹	۱۵	۳۲

به رسوب انتهای لوله، ۵ میلی‌لیتر از محلول هیپوتونیک 0.075 mol/L KcL، اضافه نموده و محتویات داخل لوله را کاملاً مخلوط نمودیم. بعد از ۱۰ دقیقه که این مخلوط در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داشت با عمل سانتریفیوژ مایع رویی خارج و عمل اضافه کردن فیکساتیو انجام شد. این مرحله ۳ تا ۴ بار تکرار شد و بعد از آخرین مرحله، رسوب انتهای لوله را همراه با ۲ تا ۳ قطره از محلول رویی از فاصله ۲۰ تا ۳۰ سانتی‌متری بر روی لام سرد پرتاب نمودیم.

روش رنگ‌آمیزی. بعد از خشک شدن لام‌های تهیه شده، آنها را به مدت ۲۰ دقیقه در رنگ گیمسای ۵٪ قرار دادیم و سپس لام‌های رنگ شده را با آب مقطر شستشو دادیم. معمولاً در هر نمونه ۱۰۰ متافاز قابل شمارش با استفاده از عدسی ۱۰۰ میکروسکوپ نوری بررسی شد. طبقه‌بندی آسیب‌ها. آسیب‌ها به دو دسته کلی

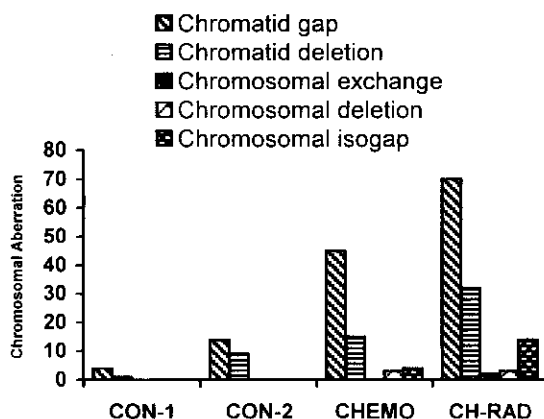
RPMI ۱۶۴۰ و آنتی‌بیوتیک استفاده شد.

روش کشت لنفوسیتی. در زیرهود استریل ۴/۵ میلی‌لیتر RPMI ۱۶۴۰، ۰/۱ میلی‌لیتر PHA و ۰/۴ میلی‌لیتر خون‌هپارینه را به داخل شیشه‌های درپوش‌دار استریل ریخته و کاملاً مخلوط نمودیم و سپس شیشه‌های کشت را در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد شیکردار قرار دادیم.

روش برداشت. ۷۰ ساعت بعد از شروع کشت به هر یک از شیشه‌های کشت، ۰/۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۰۲٪ کلشیسین که مانع از تشکیل دوک‌های میتوزی می‌شود اضافه و با عمل تکان دادن آن را کاملاً در محیط کشت مخلوط نمودیم. بعد از ۲ ساعت، ابتدا محتویات هر شیشه کشت را در یک لوله آزمایش مدرج ریخته و آن را به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ rpm سانتریفیوژ کرده و مایع روی رسوب را کاملاً از لوله آزمایش خارج کردیم و

دارد ($P < 0/05$). مقایسه Isogap کروموزومی در گروه‌ها نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($P < 0/05$) (شکل ۱). در مورد Deletion کروموزومی نتایج نشان دهنده این است که بین گروه سه و چهار در مقایسه با گروه‌های یک و دو اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود ($P < 0/05$) ولی بین گروه‌های سه و چهار اختلاف، معنی‌دار نیست (شکل ۱). در رابطه با Exchange کروموزومی نتایج، اختلاف معنی‌داری را در مقایسه گروه چهار با سه گروه دیگر مورد مطالعه نشان می‌دهد ($P < 0/05$) ولی بین سه گروه دیگر اختلاف معنی‌دار نیست (شکل ۱).

مقایسه آسیب‌های کروماتیدی هم به تنهایی، وجود اختلاف معنی‌دار را بین گروه‌های مورد مطالعه نشان می‌دهد ($P < 0/05$). نتایج نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار از نظر وجود Gap کروماتیدی در چهار گروه مورد مطالعه می‌باشد ($P < 0/05$) (شکل ۱). در مورد Deletion کروماتیدی نیز نتایج، اختلاف معنی‌داری را در بین چهار گروه مورد مطالعه نشان می‌دهد ($P < 0/05$) (شکل ۱).



شکل ۱. مقایسه آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی در چهار گروه مورد مطالعه. گروه شاهد CON-1، گروه بیماران قبل از درمان CON-2، گروه شیمی‌درمانی CHEMO، گروه شیمی‌درمانی و رادیوتراپی CH-RAD

کروموزومی و کروماتیدی تقسیم شدند و در دسته آسیب‌های کروموزومی ۳ مورد Isogap، Deletion و Exchange و آسیب‌های کروماتیدی در ۲ دسته Deletion و Gap مورد مطالعه قرار گرفتند.

آنالیز آماری. نتایج حاصله با آزمون‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و t-test تجزیه و تحلیل شدند.

نتایج

آنالیز یافته‌ها نشان می‌دهد که مجموع آسیب‌ها در گروه شاهد (گروه یک) ۵ مورد بود که ۴ مورد آن Gap و ۱ مورد Deletion کروماتیدی بود و میانگین آسیب در هر فرد ۰/۵ می‌باشد (جدول ۱). در گروه بیماران که هیچ‌گونه درمانی دریافت نکرده بودند (گروه دو) مجموع آسیب‌ها در این بیماران ۲۳ مورد بود، که شامل ۱۴ مورد Gap و ۹ مورد Deletion کروماتیدی بود و میانگین آسیب در هر فرد ۲/۳ به دست آمد (جدول ۱). مجموع آسیب‌های مشاهده شده در بیماران که شیمی‌درمانی شده بودند (گروه ۳)، ۶۷ مورد بود که از این میزان ۴ مورد Isogap و ۳ مورد Deletion کروموزومی و ۴۵ مورد Gap کروماتیدی و ۱۵ مورد Deletion کروماتیدی بودند و میانگین آسیب در هر فرد ۶/۷ به دست آمد (جدول ۱). مجموع آسیب‌های مشاهده شده در بیماران که پروتکل توأم شیمی‌درمانی و پرتودرمانی را دریافت کرده بودند (گروه چهار) ۱۲۱ مورد بود که شامل ۱۴ مورد Isogap کروموزومی، ۳ مورد Deletion کروموزومی، ۲ مورد Exchange کروموزومی، ۷۰ مورد Gap کروماتیدی و ۳۲ مورد Deletion کروماتیدی بود. میانگین آسیب در هر فرد ۱۲/۱ به دست آمد (جدول ۱). مقایسه آسیب‌ها به صورت کلی (کروموزومی و کروماتیدی) در ۴ گروه مورد مطالعه نشان‌دهنده این است که بین ۴ گروه مورد مطالعه اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0/005$).

مقایسه آسیب‌های کروموزومی به تنهایی نیز در ۴ گروه مورد مطالعه نشان دهنده این است که در این مورد هم بین گروه‌های مورد مطالعه اختلاف معنی‌دار وجود

بحث

یافته‌های پژوهش نشان دهنده این است که فراوانی آسیب‌های کروماتیدی خودبه‌خود در مبتلایان به لوسمی لنفوییدی حاد ۴/۶ برابر بیشتر از افراد سالم است. همچنین استفاده از پروتکل‌های شیمی درمانی و پرتودرمانی نیز سبب افزایش این آسیب‌ها در بیماران می‌شود؛ به طوری که با انجام هر کدام از این مراحل میزان آسیب‌ها نسبت به مرحله قبل بیشتر می‌شود. بنابراین پروتکل‌های درمانی، موجب بروز آسیب‌های کروماتیدی از طریق تأثیر بر مولکول DNA می‌شود و می‌توان چنین عنوان کرد که افزایش پروتکل‌های درمانی، رابطه خطی با ایجاد آسیب از نوع کروماتیدی دارد. در تحقیقات مرسدس تلز و همکاران که در آن اثرات نیمودپین بر روی لنفوسیت‌های انسانی مورد بررسی قرار گرفت نیز همین نتایج به دست آمد [۹]. همچنین نتایج مشابهی در مطالعاتی که توسط چود هاری و همکاران بر روی اثرات سایتوژنتیکی وینکریستین انجام شد گزارش شده است [۵].

از نظر آسیب‌های کروموزومی نیز نتایج پژوهش نشان‌دهنده این است که انجام پروتکل‌های درمانی فراوانی این آسیب‌ها را در هر مرحله درمان بیشتر از مراحل قبلی خواهد کرد. در مقایسه‌ای که بین نتایج این تحقیق و تحقیق دیگری که در دانشگاه تربیت مدرس تحت عنوان بررسی میزان آسیب پروتکل‌های درمانی به طریق تکنیک سنجش میکرونوکلئتی انجام گرفت [۱] مشاهده شد که پروتکل‌های درمانی همان‌گونه که سبب افزایش آسیب‌های کروموزومی و کروماتیدی در آنالیز متافاز بیماران لوسمی حاد درمان شده می‌شوند، سبب افزایش میکرونوکلئتی نیز می‌گردند زیرا میکرونوکلئتی در واقع همان قطعات جداشده کروموزومی می‌باشند. در تحقیقاتی که توسط بالتاس و همکاران در بلژیک روی بیماران مبتلا به لوسمی حاد انجام شد مشخص گردید که رادیسوتراپی نیز سبب افزایش ناهنجاری‌های کروموزومی در این بیماران می‌شود [۲].

نتایج انجام شده در این پژوهش نشان‌دهنده این است

که اکثر آسیب‌های مشاهده شده در این بیماران از نوع آسیب‌های آکروماتیک (شکاف) بوده است به طوری که میانگین این آسیب در افراد درمان شده با روش شیمی درمانی ۴/۴ بوده در صورتی که میانگین این آسیب در بیماران درمان شده با پروتکل توأم شیمی درمانی و پرتودرمانی ۷ می‌باشد. در رتبه بعد آسیب از نوع حذف کروماتیدی (Deletion) قرار داشت که در گروه درمان شده با شیمی درمانی میانگین برای هر فرد ۱/۵۶ و در گروه درمان شده با شیمی درمانی و پرتودرمانی ۳/۲ می‌باشد. در مورد آسیب‌های کروموزومی باید اشاره کرد که در بیماران مورد مطالعه به‌ندرت آسیب‌هایی از این نوع مشاهده گردید.

بر اساس تئوری بندر و همکاران که یک کروماتید متشکل از یک مولکول DNA دو زنجیره‌ای است و هر گونه آسیب به مولکول DNA منجر به شکست کروماتیدی می‌شود. یک شکست یا Deletion، ناشی از شکست دو رشته DNA و Gap، ناشی از شکست یک رشته DNA می‌باشد [۳].

فراوانی شکاف‌های مشاهده شده، نشان دهنده این است که اکثر رژیم‌های درمانی، منجر به مرگ سلول‌های تحت درمان می‌شود و اثراتی که در لنفوسیت‌ها مشاهده می‌شود مربوط به اثرات جانبی رژیم درمانی می‌باشد و آسیب‌های بازی با فعالیت آنزیمی سلول به شکست یک رشته DNA تبدیل شده و نهایتاً بر روی کروموزوم‌ها به صورت Gap مشاهده می‌گردد.

منابع

[۱] طاهری، م.، شهبابی، س.، مزدارانی، ح. و ایزدیاری، م. بررسی آسیب‌های ژنتیکی ناشی از پروتکل‌های شیمی درمانی و پرتودرمانی در بیماران مبتلا به لوسمی حاد به روش میکرونوکلئتی اسی. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی سمنان، جلد ۳، شماره ۱، ۲۰۱۳، ۱۳۸۰.

[2] Baltas, I., Hung, T.H., Leonard, E.D., Gerber, G.B. and Leonard, A., Study of the

- pp: 706-711.
- [7] Leonard, I., Baltas, I., Leonard, E.D., Gerber, G.B., Richard, F. and Wambersic, I., Dose-effect relationship for invivo & invitro induction of dicentric aberration in blood lymphocytes of children. *Radiation Res.*, 141 (1995) 95-98.
- [8] Rojas, A., Pined, L., Gonzalz, S., Soto, M., Avila, E., Urdneta, B., Prieto-Cirrasquero, M. and Gonzalz, R., Chromosomal abnormalities in malignant hematologic disease, *Acta. Venez.*, 51 (2000),109-114.
- [9] Telez, M., Martienez, B., Criado, D., Ortega, B., Penaqarikano, O., Flores, T, Ortiz-Lastra, E. and Arrietu, I., Evaluation of the cytogenetic damage induced by the antihypertensive drug nimodipine in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 61 (2001) 345-351.
- relation between dose of ionizing radiation and level of chromosome abnormalities in an adult patient following total body irradiation. *CR Seances Soc. Biol. Fil.*, 189 (1995) 289-293.
- [3] Bender, M.A. and Preston, R.G., Mechanism of chromosomal aberration production, chemical and ionizing radiation. *Mutation Res.*, 23 (1974) 197-212.
- [4] Bortran, G. and Katzung; Basic and clinical pharmacology, 8th Edition, Long Medical Books, Mac Grow-Hill, 2001, pp: 923-958.
- [5] Chodhury, R.C., Das, B., Misra, J. and Jagdal, M.B., Cytogenetic toxicity of vincristine. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 19 (2001) 347-355.
- [6] Fauci, A.C., Braunwald, E. and Isselbacher, K.J., Harrison's principal of internal medicine, 15th Editin, Mc Grow-Hill, 2001,