مطالعه آثار تابش پرتوهای فرابنفش C بر میزان تعویض کروماتید خواهری در لنفوسیت های T انسانی

دکتر محمد علی حسینپور فیضی: استاد رادیوبیولوژی دانشکده علوم دانشگاه تبریز
سیامک اکبری کامران ور: مربی دانشکده علوم دانشگاه تبریز : نویسنده رابط

چکیده

زمینه و اهداف: کاهش ضخامت لایه ازن و افزایش تابش پرتوهای مضر فرابنفش خورشیدی، تهدید کننده محیط زیست و سلامت انسان است. مطالعه ارتباط پرتوهای فرابنفش با ناپایداری ژنومی سلول ها، حایز اهمیت است و میزان آسیب پذیری DNA در مقابل این پرتوها را نشان می دهد. به منظور بررسی ناپایداری ژنومی در سلولهای پرتوتابی شده با پرتوهای فرابنفش[1]، تعداد تعویض های کروماتید خواهری (SCE)[2] شاخص قابل قبولی تلقی می شود.

روش بررسی: تعداد 10^5 لنفوسیت خون محیطی جداسازی شده با فایکول[3] را در فلاسک T_{25} و به فاصله ۲۰ سانتی متری از لامپ UV (شدت فرابنفش C،420Lux) به طور مجزا در دو زمان ۳و۵ دقیقه، تحت پرتوتابی قرارگرفت و به همراه همان تعداد سلول لنفوسیتی به عنوان شاهد، در ml ۵ محیط کشت کامل F_{12} (۱۵ درصد FCS[4]) محتوی میتوژن T لنفوسیتی فیتوهماگلوتنین و در حضورBrdU[5] کشت داده و در دمای $37^{\circ}C$ انکوبه شد. با برداشت سلولهای متافازی بعد از ۷۲ ساعت از زمان کشت و رنگ آمیزی آنها با روش SCE، میانگین درصد تعویض های کروماتید خواهری در کروموزوم های صد پلاک متافازی مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته ها: میانگین درصد SCE، در بررسی صد پلاک متافازی از هر سلول پرتوتابی شده و شاهد، نشان داد که این میزان در سلولهای شاهد۳/۳۵ درصد و در سلولهای پرتوتابی شده به مدت ۳و۵ دقیقه، به ترتیب مقادیر ٤/٣٤ و ٦/٨ درصد حاصل شده است. تحلیل آماری نتایج حاصل، معنی دار بودن اختلاف را نشان داد($p<۰/۰۰۱$).

نتیجه گیری: توجه به نتایج SCE، آثار نامطلوب پرتوهای فرابنفش C در افزایش ناپایداری ژنومی، و در نتیجه، آسیب DNA را نشان می دهد؛ به طوری که میزان این ناپایداری، رابطه مستقیمی با مدت زمان تابش دهی داشته است. لذا جهت پیشگیری از ایجاد آسیبهای جبران ناپذیر DNA و عوارض ناشی از آن، مسأله کاهش لایه ازن باید مورد توجه جدی قرار گیرد و تدابیری در جهت پیشگیری از عوامل آسیب رسان آن اندیشیده و ازطرفی از قرارگیری انسان در معرض منابع مولد UV-C تا حد ممکن جلوگیری شود.

کلید واژه ها: UV، SCE، لنفوسیت T

مقدمه

فرا بنفش یکی از تشعشعات غیریونیزان در طیف امواج الکترومغناطیسی است که در محدوده طول موج ۱۰۰ نانومتر (با انرژی فوتونی تقریبا ۱۲ الکترون ولت) تا ٤۰۰ نانومتر قرار دارد. فرا بنفش را می توان به سه ناحیه طول موجی، فرابنفش A (با طول موج ٤۰۰ –۳۵۰ نانومتر)، فرا بنفش B (با طول موج ۳۱۵–۲۸۰ نانومتر) و فرا بنفشC (با طول موج ۲۸۰–۱۰۰ نانومتر) تقسیم بندی کرد. نوع C با داشتن پایین ترین طول موج، شدیدترین نوع آسیب ها را بر موجودات زنده و به ویژه انسان وارد می کند. اگرچه این نوع پرتو به طور کامل توسط لایه ازن جذب می شود، کاهش ضخامت لایه ازن، احتمال افزایش نفوذ این نوع پرتوها را بیشتر کرده است (۱و ۲).

پرتوهای فرابنفش برای این که در سطح سلول و ملکول تغییراتی ایجاد کنند، باید به وسیله مولکول های حیاتی جذب شوند و محصولات حاصل از این فرآیندها(رادیکال های آزاد) بلافاصله تشکیل شوند که اثر آنها برای مدتها باقی می‌ماند(۳). به دنبال تابش پرتوهای فرابنفش بر سلولهای پروکاریوت و یوکاریوت، مرگ سلولی، تغییرات کروموزومی، جهش و تغییرات ریخت شناختی حاصل می شود(٤). اثرات بیولوژیک پرتوهای فرابنفش به طول موج تشعشع بستگی دارد وDNA ، بحرانی ترین هدف تخریب پرتو های فرابنفش C و B است و ضایعات حاصل از این تخریب، مهمترین آسیبهای پیش جهشی تلقی می شوند(۵). همچنین تابش فرابنفش، برخی از ژن ها و ویروس هایی نظیر HIV را فعال می کند(٦).

مطالعه در زمینه نارسایی ها و اختلالات روند ترمیمی DNA متعاقب تابش فرابنفش، این واقعیت را به وضوح به اثبات رسانده است که رابطه مشخصی بین آسیب DNA در سلولهای پوستی و پیدایش انواع سرطان های پوستی وجود دارد. اثرات مضر پرتوتابی UV بر چشم، پوست و دستگاه ایمنی نیز مشخص شده است(۷). در زمینه محیط زیست نیز اثرات پرتوتابیUV بر روی رشد گیاهان، فتوسنتز و مقاومت گیاه در مقابل بیماری گزارش شده است. در اکوسیستم آبی نیز کاهش چشمگیر فیتوپلانکتون ها به علت افزایش میزان تابش فرابنفش B، به طور مستقیم برمنبع غذایی دریایی جانداران و انسان تأثیر گذاشته است(۸).

UV-C آثار نامطلوبی بر ساختار موجودات زنده به جای می‌گذارد ولی کاربردهای مختلفی در پزشکی دارد، به طوری که از خاصیت میکروب کشی آن برای ضد عفونی کردن اتاق های عمل و التیام برخی از زخم ها استفاده می شود(۹و ۱۰). منابع مولد این پرتو نظیر لامپ های مورد استفاده در پزشکی، صنعت، تجارت،

1. Ultraviolet-C
2. Sister Chromatid Exchange
3. Ficol
4. Fetal Calf Serum
5. Bromo-Deoxyuridine

Archive of SID
www.SID.ir

تحقیقات و منازل طیف پیوسته ای از پرتو های فرابنفش را منتشر می کنند(۱).

برای بررسی میزان آسیب پذیری DNA درمقابل عوامل مختلف جهش زا، می توان از بررسی میزان ناپایداری ژنومی استفاده کرد. روش مناسب و حساسی که در مطالعات سیتوژنتیک جهت بررسی ناپایداری ژنومی به کار می رود، SCE است که بر اساس آن تعداد تبادلات کروماتید خواهری در کروموزوم ها در حین تقسیم میتوز، میزان ناپایداری ژنومی را مشخص می کند (۱۱). SCE با ترمیم DNA، القای جهش های نقطه ای، بسط ژنی[1] و سمیت سلولی[2] ارتباط دارد(۱۲). بنابراین نشان دادن میزان SCE در سلولهای پرتوتابی شده با UV-C می تواند اهمیت این پرتوها را در ایجاد آسیبهای DNA نشان دهد.

مواد و روش ها

تهیه پلاک های کروموزومی به روش SCE

SCE که یکی از حساس ترین روشهای مطالعه ناپایداری ژنومی است، اثرات سیتوژنتیکی عوامل جهش زا را بهتر نشان می دهد (۱۳). مدت زمان تابش دهی بر اساس میزان شاخص میتوزی انتخاب شده است، بدین صورت که کشت های سلولی لنفوسیت های انسانی در نمونه شاهد و نمونه های در معرض، با زمانهای مختلف تابش دهی، از نظر تعداد سلول های میتوزی بررسی و مشخص شد که تعداد این سلول ها در زمان های تابش دهی ۵ دقیقه ای به شاخص میتوزی نمونه شاهد نزدیک است، لذا زمانهای ۵ و ۳ دقیقه برای این پژوهش در نظر گرفته شده است. تعداد 10^5 لنفوسیت انسانی را، که با محلول فایکول جدا سازی شده بودند، به فاصله ۲۰ سانتی متری از لامپ میکوبیولوژیUV (تولید کننده UV-C به شدت LUX ۴۲۰، اندازه گیری شده با Luxmeter) و به مدت ۳ و ۵ دقیقه قرار داده وبا شرایط مشابه و به همان تعداد سلول لنفوسیتی، به عنوان گروه شاهد، در فلاسک های T_{25} حاویml۵ محیط کشت کاملF_{12} (۱۵ درصدFCS) و دارای میتوژن فیتوهماگلوتنین (PHA)، جهت تحریک لنفوسیت هایT (در غلظت ۱/۵ میلی لیتر درصد) کشت داده شد و در دمای $37^{\circ C}$ به همراه ۵٪ CO_2 انکوبه گردید(تصویر۱). بعد از۲۴ ساعت به هر یک از محیط های کشت، محلول BrdU با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر اضافه شد و ۴۸ ساعت بعد، با افزودن محلول کلشی سین دارای غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر، عمل محصول برداری سلول های متافازی به پایان رسید. لام های حاوی پلاک های متافازی، به مدت ۱۵دقیقه در محلول آماده رنگ هوخست[3] با غلظت۱۵۰میکروگرم در میلی لیتر قرار گرفت و بعد از شستشو در محلول بافری SCC ×۲ (۰/۳ مولار کلرید سدیم + ۰/۰۳مولار سیترات سدیم) غوطه ور و در زیر لامپ UV به مدت ۲۰ دقیقه در فاصله ۴cm قرار داده شد، سپس لام ها شستشو داده شد و در محلول بافری، دردمای $65^{\circ C}$ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. بعد از طی کردن مراحل فوق، رنگ آمیزی به وسیله رنگ گیمسای یک درصد به مدت دو تا سه دقیقه انجام شد و پلاک های متافازی حاصل، با استفاده از میکروسکوپ نوری (با درشتنمایی ۱۰۰۰ ×) مورد بررسی قرار گرفت.

نحوه بررسی پلاک های کروموزومی SCE

SCE با شمارش تعداد تعویض های کروماتیدی، که از روی ناپیوستگی رنگ شدگی کروماتیدی مشخص است، بررسی می شود. هر نقطه ای از کروماتید که حاوی ناپیوستگی رنگی باشد، محل تعویض کروماتید خواهری شناخته می شود (تصویر۲). کروموزوم های بزرگترSCE های بیشتری نسبت به کروموزوم های کوچکتر دارند. کروموزوم ممکن است هیچ SCE نداشته باشد اما هومولوگ آن در همان سلول دارای SCE باشد. میزان SCE از سلولی به سلول دیگر متفاوت است. میزان متوسط SCE در سلولهای طبیعی در بالغین، بین ۵ و ۸ است و به سن فرد بستگی دارد نه به جنس او. حداکثر میزان SCE در سنین ۳۰ تا۴۰ سال مشاهده می شود(۱۰).

تعداد تعویض های کروماتید خواهری در صد پلاک متافازی از تک تک سلول های پرتوتابی شده و شاهد مورد ارزیابی قرار گرفت و فراوانی SCE های مشاهده شده، در گروههای مورد بررسی و شاهد با استفاده از روش آماری *ویلکاکسون* بررسی و تفاوت بین گروهی تعیین شد.

یافته ها

نتایج SCE از شمارش صد پلاک کروموزومی نمونه های شاهد و دو زمان تابش دهی UV، در نمودار ۱ نشان داده شده است. این نمودار نشان می دهد که میزان میانگین درصد SCE در سلولهای شاهد ۳/۳۵ درصد است، درحالی که میزان آن در سلول های پرتوتابی شده به مدت ۳ و ۵ دقیقه به ترتیب ۴/۳۴ درصد و ۶/۸ درصد بوده است. نکته حایز اهمیت دیگر این که، تعداد سلول ها بعد از پرتوتابی، به مقدار قابل قبولی کاهش یافته بود و این موضوع بررسی سیتوژنتیکی را با روش SCE با مشکل مواجه می کرد. تحلیل آماری نتایج حاصل با آزمون *ویلکاکسون* ، معنی دار بودن اختلاف گروهها را نشان داده است ($p<0/001$).

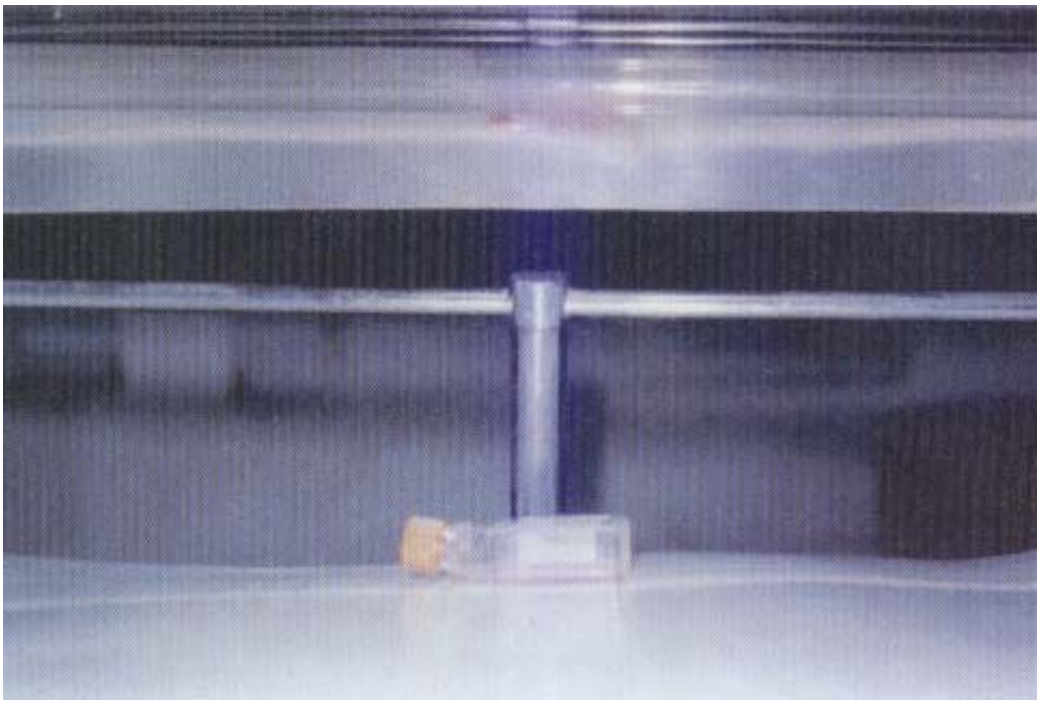
بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل ، مشخص شد که UV-C تأثیر شدیدی بر سلول های پرتوتابی شده گذاشته است و علاوه بر کاهش محسوس تعداد سلول های پرتوتابی شده در مقایسه با تعداد سلول های شاهد، میزان SCE در پرتوتابی به مدت ۳ دقیقه معادل ۹۹/ درصد و در پرتوتابی ۵ دقیقه ای ، به مقدار ۳/۴۵ نسبت به سلول های شاهد افزایش نشان داده است؛ یعنی، UVC با شدت LUX ۴۲۰ حاصل از لامپ میکروبیولوژی، موجب افزایش ناپایداری ژنومی در سلول های در معرض می شود و این میزان در زمان ۳ دقیقه ای تابش، چندان محسوس نیست اما در زمان ۵ دقیقه ای، افزایش چشمگیری نشان می دهد. بنابراین آثار نامطلوب این نوع پرتوها بر ساختار DNA و سایر عوارض آن مورد تأیید قرار گرفت و معلوم شد که زمان تابش دهی UV-C نیز در افزایش میزان SCE نقش بسزایی داشته است. پس می توان چنین فرض کرد که قرار گرفتن در معرض پرتوهای UV-C باعث تغییر DNA سلولی می شود و ژنوم را مستعد آسیب های جبران ناپذیر می کند. همچنین کاربرد مفید این نوع پرتوها در حوزه های مختلف، مراقبت های ایمنی و احتیاط های لازم جهت تقلیل آثار نامطلوب آنها را نیز می طلبد.

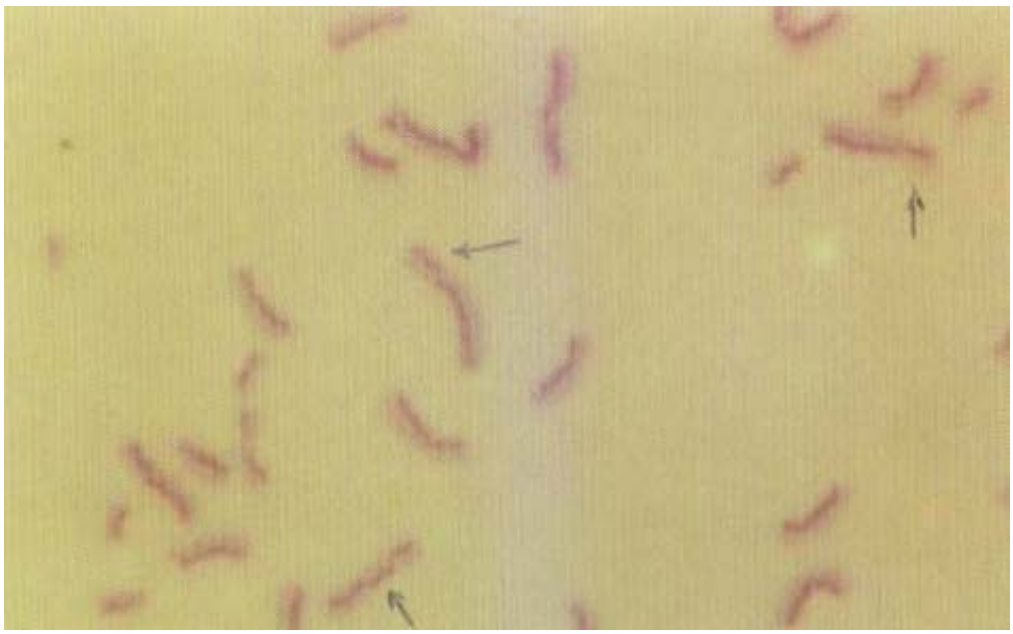
1. amplificatipon
2. cytotoxicity
3. Hoechst 33258

Archive of SID

www.SID.ir

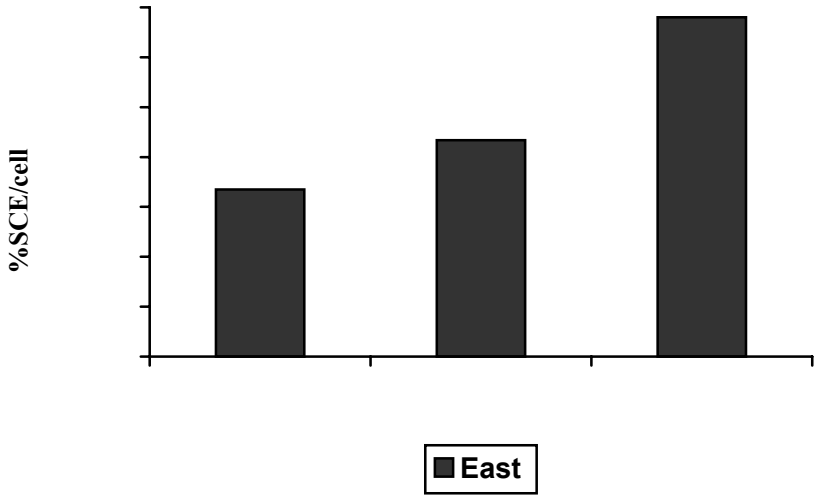


تصویر ۱ : نحوه پرتو تابی سلول ها با پرتوهای UV



تصویر۲: پلاک کروموزومی دارای SCE

www.SID.ir



نمودار۱: نتایج SCE در سلول های شاهد و پرتوتابی شده

توسعه صنایع و پیشرفت های روزافزون تکنولوژیک در جهان امروز موجب کاهش ضخامت و تخریب لایه ازن شده و امکان نفوذ پرتو های UV-C و UV-B را فراهم ساخته است. برخورد این پرتوها با بدن انسان و سایر موجودات زنده، به پیدایش آسیب های جدی در سطح DNA سلول ها می انجامد و سلامت آنها را به شدت مورد تهدید قرار می دهد. بنابراین پیشگیری از تخریب لایه ازن مهمترین اقدام ضروری به شمار می رود.

به طور خلاصه، UV-C عامل جهش زای محیطی تلقی می شود که با آسیب رساندن به DNA سلول ها موجب ناپایداری ژنومی آنها و بروز اختلالات گوناگون طبی می شود و سلامت بشر را بیش از پیش به مخاطره می اندازد.

References

1. World Health Organization. Ultraviolet Radiation. W.H.O press.1998;1-20
2. Balasubramanian D, Ultraviolet radiation and cataract. J Ocul Pharmacol Ther. 2000(Jun); 16(3):285-97
3. Halliwell B, Oxygen radicals and tissue injury. Proceeding of a brook lodge symposium. Michigan. USA press.1988; chap7.540-95
4. Wilhelm D, Bender K, Knebel A, Angel P, The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including C-N-terminal Protein Kinases and p38 Kinase by Alkylating agents. Mol Cell Biol. 1997; 17:4792-4800
5. Miralles F, Parra M, Caelles C, Nagamine Y, Felez J, Munoz-Canoves P. UV irradiation induces the Murine Urokinase-Type Plasminogen Activator Gene via the c-Jun N-Termina Kinase signaling pathway: Requirement of an AP1 enhancer element. Molecular and Cellular Biology. 1998(Aug);18(8).4537-4547
6. Kumar S, Orsini M, Lee J, Mcdonnell P, Debouck C, Young P. Activation of the HIV-1 Long Terminal Repeat by Cytokines and Environmental Stress Requires an Active CSBP/p38 MAP Kinase. The Journal of Biology Chemistry. 1996; (271)48.30864-30869
7. Garssen J, Von Loveren H. Effects of Ultraviolet exposure on the immune system. Crit Rev Immonol. 2001;21(4):359-397
8. Winter C, Moeseneder M, Herndl G. Impact of UV Radiation on Bacterioplankton Community Composition. Applied and Environmental Microbiology. 2001(Feb); 67(2)665-672.
9. Banrud H, Moan J. Use of short wave ultraviolet radiation for disinfection in operating rooms. TidsskrNor Laegeforen. 1999(Aug); 119(18):2670-2673
10. Kloth LC. Physical modalities in wound management: UV-C, therapeutic heating and electrical stimulation. Ostomy Wound Manage. 1995(Jun); 41(5):18-27
11. Ram S.V, Arvind B, Human Chromosome. New York. Mc Graw Hill.1995;143-155
12. Morris S, The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. Mutation Research.1991; 258:161-188
13. Chen YM, Yang WK, Ting CC, Tsai WY, Yang DM, Whang-Peng J, et al. Cross regulation by IL-10 and IL-2/IL-12 of the helper T cells and the cytolytic activity of lymphocytes from malignant effusions of lung cancer patients. Chest. 1997;(112):960-966

Archive of SID

www.SID.ir