Archive of SID

مقایسه حساسیت سلول‌های سفید خون محیطی بیماران مبتلا به رطان پستان و افراد سالم نسبت به آسیب‌های ناشی از پرتو گاما با استفاده از آزمون کامت قلیایی

مریم شهیدي (Ph.D.)* حسین مزدارانی (Ph.D.) ** منیژه مختاري دیزجي (Ph.D.)*

چکیده

سابقه و هدف : تحقیقات قبلی نشان داده اند افزایش حساسی‌ت نسبت به اثرات تخریبی پرتوهای یون‌ساز بر روی کروموزوم ها در بسیاری از موارد نمایانگر شرای‌ط استعداد ابتلا به سرطان است. در این تحقیق حساسیت ناشی از پرتو بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم با بررسی آسیب‌های ژنتیکی اولیه القا شده ناشی از تابش پرتوهای گاما در سلول‌های سفید خون افراد بیمار و سالم با استفاده از آزمون کامت قلیایی مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها : در این تحقیق ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۱ فرد اهدا کننده سالم، مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های رقیق شده خون این افراد، در شرای‌ط *in vitro* تحت تابش دوز۱ گری پرتوهای گامای ناشی از چشمه کبالت ۶۰، با آهنگ پرتودهی ۱۱/۵۱cGy/min ± ۲۲۷/۴۸ قرار گرفتند. نمونه ها بلافاصله پس از تابش دهی، توسط آزمون کامت قلیایی مورد بررسی قرار گرفتند. کامت‌ها بوسیله طبقه بندی چشمی (پس از اثبات حساسیت و تکرارپذیری) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میزان آسیب DNA در دو گروه شاهد و بیمار تعیین گردید.

یافته ها : آسیب‌های پایه دربیماران مبتلا به سرطان پستان حدود ۱/۶ برابر بیشتر از افراد سالم بود($p=۰/۰۳$). آسیب‌های اولیه القا شده در اثر تابش پرتوهای گاما در سلول‌های سفید افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با افراد سالم نداشت. همچنین مشاهده شد که میزان آسیب‌ها در DNA افراد سالم و بیمار قبل و بعد از تابش دهی، تفاوت معنی داری را با سن افراد نشان نمی دهد.

استنتاج : این تحقیق به منظور بررسی کارآیی آزمون کامت قلیایی، به عنوان یک روش سیتوژنتیکي مناسب براي غربالگري افراد با مخاطره بالا براي ابتلا به سرطان پستان ونیز محافظت پرتويي افراد حساس به اشعه صورت گرفت. نتایج نشان می دهند افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آسیب پذیری اولیه با افراد سالم تفاوتی ندارند. این در حالی است که بالاتر بودن سطح آسیب‌های پایه در بیماران می‌تواند نشان دهنده نقص روندهای ترمیمی در بیماران باشد.

واژه هاي کلیدي : سرطان پستان، حساسی‌ت پرتوی، لوکوسی‌ت، آزمون کامت

* گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ✉
** گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

☜ تاریخ دریافت: تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: تاریخ تصویب:

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

تخمين زده می‌شود حدود ۱۰ درصد افراد جامعه به پرتوهای یون‌ساز، حساسیت غیر طبیعی نشان می‌دهند این حساسیت ناشی از وجود ژن‌های حساس به پرتو است که موجب آسیب در مولکول DNA می‌شود. دستیابی به آزمون‌هایی که بتوانند بادقت و در زمان کوتاهی افرادی را که از حساسیت بالاتری نسبت به پرتوها برخوردارند شناسایی کنند، حائز اهمیت است. زیرا از یک سو امکان شناسایی افراد مستعد ابتلا به سرطان را فراهم می سازند و از سوی دیگر نقش مهمی در انفرادی نمودن برنامه درمانی افراد براساس خصوصیات بیولوژیکشان ایفا می کنند(۱-۵).

عقیده بر این است که حدود ۷۰ درصد تفاوت‌های فردی در حساسیت پرتوی بافت سالم بیماران مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی افراد است(۱) و عامل اصلی تعیین‌کننده واکنش بافت سالم به پرتوها، حساسیت ذاتی سلول‌ها می‌باشد(۱-۶). پاسخ سلول‌ها به تابش پرتو های یونساز وابسته به حضور ژن‌های گوناگونی است که مسئول ترمیم DNA، تنظیم سیکل سلولی و سرکوب تومور می‌باشند(۷). مطالعاتی که بر روی سلول‌های بدن بیماران مبتلا به بیماری‌های ارثی (همراه با نقائص مربوط به ترمیمDNA وسیکل سلولی همراه باحساسیت به پرتو) مانند آتاکسی‌تلانژکتازیا(ataxia telangiectasia AT) و زیرودرما پیگمنتوزوم (XP Xeroderma Pigmentosum) انجام شده نشان داده‌است ارتباطی بین افزایش حساسیت پرتوی و استعداد ابتلا به سرطان وجود دارد(۸،۲). نقائص مربوط به ترمیم DNA و/ یا ناهنجاری‌های چرخه سلولی با اکثر ژن‌هایی که مستعد کننده ایجاد سرطان هستند همراهند(۲). همچنین احتمال می‌رود درصد قابل توجهی از افراد، حامل ژن‌های گوناگونی باشند که موجب تغییر پاسخ سلول‌ها نسبت به پرتوها می‌شوند(۲). مجموع این مسائل سبب شده است که تحقیقات زیست پرتوی به سمت اثبات نظریه وجود ارتباط ما بین حساسیت پرتوی و استعداد ابتلا به سرطان سوق پیدا کند.

از آنجا که تغییرات ساختماني کروموزوم ارتباط مستقیمي با ایجاد سرطان (از طریق فعال شدن انکوژن‌ها و غیرفعال شدن ژن‌هاي سرکوب‌کننده تومور) نشان مي‌دهد و از طرف دیگر کلیه عوامل دخیل در ایجاد سرطان در نهایت باعث فعال شدن انکوژن‌ها و غیر فعال شدن ژن‌هاي سرکوب کننده تومور مي‌شوند، بنابراین بررسي حساسیت ماده ژنتی‌کی افراد نسبت به عوامل مختلف سرطان‌زا (ازجمله پرتوهاي‌یونیزان) یک نشانگر بیولوژیک مهم براي ابتلا به سرطان مي‌باشد(۳).

به دلیل شیوع بالای سرطان پستان در زنان، طی سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری در این زمینه انجام گرفته است. در کشورهای صنعتی، از هر ده زن یک نفر در دوره‌ای از زندگی خود به این نوع سرطان مبتلا می‌گردد. سرطان پستان از لحاظ علت شناختی، یک بیماری چند علتی بوده و عوامل مختلفی از جمله عوامل محیطی، هورمونی و توارثی در ایجاد آن دخالت دارند. بیشتر موارد (حدود ۸۰ درصد) تک گیر هستند و توسط جهش‌های سوماتی‌ک بوجود می‌آیند،و حدود ۲۰ درصد موارد دارای سابقه خانوادگی شامل ۵ درصد نرخ جهش غالب اتوزومی با نفوذ بالا هستند(۹). تغییرات ژن‌های سرکوبگر تومور BRCA1 و BRCA2 خطر ایجاد سرطان پستان را بالا می‌برند. جهش در ژن BRCA1 تقریبا در ۵۰ درصد خانواده‌های با شیوع بالای سرطان پستان و حداقل در ۸۰ درصد خانواده‌های دارای نرخ بالای سرطان‌های زودرس تخمدان و پستان دیده می‌شود. به طور مشابه، جهش در ژن‌های BRCA2 باعث سرطان پستان زودرس در زنان گردیده و همچنین احتمال ابتلا در مردان را نیز افزایش می‌دهد(۱۰). در کنار دو ژن پر نفوذ BRCA1,BRCA2 که استعداد ابتلا

www.SID.ir

Archive of SID

به سرطان پستان را افزایش مي‌دهد، ژن‌هاي كم نفوذ زيادي نيز ممكن است در افزايش اين استعداد دخيل باشند و نقش ژن‌های سركوبگر تومور همچون p53 ونیز ATM كه ژن حساس به پرتو می‌باشد در بروز سرطان پستان تایید شده است(۱۱). لذا انتظار می رود سلول‌های این افراد نسبت به افراد سالم، حساسیت بیشتری در برابر پرتوهای یونساز نشان دهند.

روش‌هاي سيتوژنتيك‌متداول براي بررسي‌حساسيت پرتوی شامل آنالیز متافاز، تبادل كروماتيدهاي خواهري، تراكم زودرس كروموزوم و سنجش ميكرونوكلئي مي‌باشد. روش‌های مذکور به دلایل پیچیدگی، نیاز به انجام كشت سلولی و گرانی نسبی روش‌های مناسبی به عنوان آزمون‌های غربالگر افراد حساس به پرتو در به كارگيری در سطح جامعه و در سطح گسترده نیستند.

در این تحقیق به منظور بررسی آسیب‌های ایجاد شده در DNA متعاقب تابش دهی از روش كامت "Comet assay" استفاده‌گردی‌د. این روش یک تكنيك ميكروالكتروفورتيك است و به كمك آن می‌توان آسیب‌های ایجاد شده در DNA را در تک تک سلول‌ها به‌طور مستقیم مشاهده نمود. استفاده از این روش از مزایای متعددی برخوردار است. این روش سریع، آسان، حساس، قابل اعتماد و نسبتاً ارزان است. جهت بررسی آسیب‌ها با این روش‌نیازی به‌كشت سلول‌ها وجود ندارد و نتایج ظرف مدت چند ساعت پس از نمونه‌گیری از سلول‌ها قابل دستیابی است. این روش حساس است و قادر است آسیب‌های DNA را در نتیجه تابش دوزهای در حد چند cGy آشكار سازد. در این روش سلول‌هایی که توسط عوامل ژنوتوكسیک آسیب دیده‌اند، پس از رنگ‌آمیزی با یک رنگ فلورسانس در میدان میكروسكوپ به‌صورت یک ستاره دنباله‌دار با یک سر و یک دم مشاهده می‌شوند. با اندازه‌گیری پارامترهایی مانند طول دم كامت، اندازه سر و اندازه نسبت سر به دم كامت و نیز با درجه‌بندی كامت می‌توان آسیب ایجاد شده در DNA را بطور كمی بیان نمود (۱۳،۱۲).

در این تحقیق آسیب القا شده در مولكول DNA توسط تابش پرتوهای گاما را در سلول‌های سفید خون محیطی ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و۳۱ فرد سالم ، بلافاصله بعد از تابشدهی با استفاده از آزمون كامت بررسی شد. هدف از این تحقیق ارزیابی میزان حساسیت پرتوی سلول‌های تابش دیده بیماران در مقایسه با سلول‌های افراد سالم بوده است.

مواد وروش ها

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در ای‌ن تحقی‌ق از شركت‌های ذی‌ل تامی‌ن شدند: آگاروز با نقطه ذوب پای‌ی‌ن از شركت فرمنتاس، سی‌ناژن ای‌ران؛ آگاروز معمولی، دیمتیل سولفوكساید، تریتون X-۱۰۰ ، اتیدیم بروماید، نمک سدی‌م ان لوری‌ل سارکوزان، كلری‌د سدیم، هیدروكسید سدیم، تریس بازی، سدیم دو دسیل سولفات از شركت مرک، بهزیست دارو، ایران؛ فسفات بافر سالین(PBS)، دی سدیم-EDTA از شركت سیگما، سیناژن، ایران.

نمونه‌گیري

نمونه‌هاي بيمار انتخاب شده، شامل ۲۹ زن مبتلا به سرطان پستان بودند كه مورد نمونه برداری و ی‌ا عمل جراحي ماستكتومي قرار گرفته بودند. از اين بيماران قبل از شروع عوامل مداخله‌گر درماني (شيمي درماني- راديوتراپي) و پس از اخذ رضايت نمونه‌گيري انجام شد. تعداد نمونه‌هاي شاهد ۳۱ نفر انتخاب شد كه ۱۰ نفر آنها زن بودند، همچنين به منظور رد نمودن اثر جنسيت و ساير عوامل مداخله گر بر روي آزمايش‌هاي انجام

www.SID.ir

Archive of SID

شده و همچنین مساوی بودن شرایط اقتصادی، فرهنگی، بهداشتی و تغذیه‌ای، از ۲۱ مرد که اغلب آنان همسران بیماران مبتلا به سرطان پستان بودند نیز نمونه خون تهیه شد(۴،۳). عمل نمونه‌گیری از افراد سالم نیز پس از کسب موافقت از آنها انجام گردید.

نمونه‌های خون محیطی پس از جمع‌آوری، در ظروف استریل حاوی ماده ضد انعقاد دی‌سدیم-EDTA ریخته می‌شد. در هریک از قسمت‌های آزمون مقدار ۷/۵ µL از خون در میکروتیوب‌های با حجم ۱/۵ mL که حاوی ۱ mL PBS بودند، ریخته می‌شد.

تابش دهی نمونه ها

تابش دهی با استفاده از چشمه کبالت ۶۰ (تراترون ۷۸۰E، کانادا) واقع در بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد. نمونه‌های خون حاصل از افراد پس از رقیق شدن در PBS، به طور in vitro ، بر روی یخ در فاصله ۶۰ سانتی‌متری از چشمه تابش، پرتودهی شدند. تابش‌دهی با نرخ تابش ۱۱/۵۱ ± ۲۷۷/۴۸ cGy/min انجام شد و نمونه‌ها تحت تابش دوز کلی ۱Gy قرار گرفتند.

آماده سازی لام

به‌منظور آماده کردن لام‌ها، ابتدا لام‌ها پیش پوشش داده شدند. بدین منظور لام‌ها دریک بشر ۵۰ mL حاوی آگاروز معمولی مذاب با غلظت ۱ درصد در آب فروبرده و پس از خارج نمودن، پشت آنها به کمک دستمال تمیز و در فر گرم خشک شدند.

نمونه‌های خون پس از تابش‌دهی روی یخ به آزمایشگاه حمل شدند. با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار، سلول‌ها ته نشین شدند. مایع بالای ته نشست سلولی دور ریخته شد و ته نشست سلولی با ۱۰۰µL آگاروز با نقطه ذوب پایین باغلظت ۰/۷۵ درصد در PBS در دمای ۳۷°C مخلوط شد. این مخلوط روی لام قرار داده شد و بلافاصله روی آن لامل قرار گرفت. لام به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال (4°C) قرار داده شد تا آگاروز سفت شود. پس از سفت شدن آگاروز لامل برداشته شد.

آزمون کامت قلیایی

از نسخه قلیایی ارائه شده توسط کالینز و همکاران (۲۰۰۲) که به طور وسیعی در تحقیقات به کار گرفته می‌شود، استفاده شد(۱۳). لام‌ها به مدت یک ساعت در محلول لیزیس قلیایی با pH=۱۰، حاوی ۲/۵ mM کلرید سدیم، ۱۰۰EDTA mM، ۱۰ mM تریس، ۱ درصد سدیم لوریل سارکوزان و ۱ درصد تریتون ۱۰۰ -X قرار گرفتند. پس از مرحله لیزیس، لام‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در یک تانک الکتروفورز افقی (SEU-7305 ، پایا پژوهش، ایران) در محلول تازه قلیایی با pH >۱۳ حاوی ۱mM EDTA و M NaOH ۰/۳ قرار گرفتند تا پیچش رشته‌های DNA از یکدیگر باز شود. پس از آن عمل الکتروفورز به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط ۰/۷ volt/cm انجام شد. پس از الکتروفورز عمل خنثی سازی با سه بار شست و شوی لام‌ها در بافر خنثی‌ساز(محلول تریس با ۷/۵= pH) هر بار به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. پس از خنثی‌سازی، لام‌ها به مدت ۵ دقیقه در اتانل قرار داده شدند و پس از آن در مجاورت هوا خشک شدند. تمامی مراحل پروتکل آزمون کامت قلیایی در دمای ۴ °C انجام گرفت.

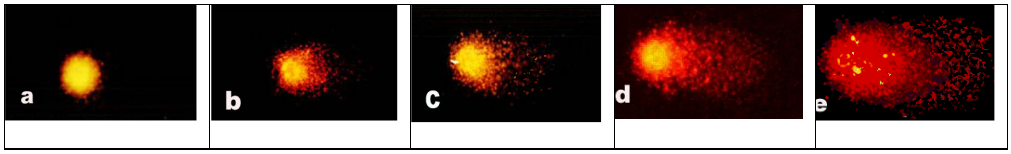
رنگ آمیزی و بررسی میکروسکوپی

لام‌ها با ۵۰ µL محلول اتیدیم بروماید با غلظت ۲۰ µg /mL رنگ‌آمیزی شدند و پس از قرار

www.SID.ir

Archive of SID

دادن لامل بر روی آنها، با میکروسکوپ اپی فلورسنت (Nikon E 800) بامحدوده طول موج ۵۱۶-۵۴۶ نانومتر و همچنین فیلتر Barrier با طول موج ۵۹۰ نانومتر و با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر مورد مشاهده قرارگرفتند. ارزیابی نتایج به صورت چشمی و مقایسه‌ای انجام گرفت. آسیب‌ها بر اساس ظاهر کامت‌ها، با در نظر گرفتن میزان مهاجرت DNA، مطابق معیارهای ارائه شده در مقالات مرجع (۱۵،۱٤) به ۵ دسته (نوع صفر تا چهار) دسته بندی گردیدند. کامت‌های دارای سر درخشنده و فاقد دم به عنوان نوع صفر (سلول‌های فاقد مهاجرت DNA) در نظر گرفته شدند و کامت‌های فاقد سر و یا دارای سر کوچک و دم پراکنده و دراز در نوع چهار (سلول‌های بسیار آسیب دیده) قرار گرفتند. کامت‌های دارای خصوصیات حد واسط در انواع ۱، ۲ و ۳ قرار گرفتند (شکل شماره۱). در هنگام بررسی با میکروسکپ هر کدام از کامت‌های دیده شده با یکی از این تصاویر شبیه‌سازی گردیده و بدین ترتیب اعداد صفر تا چهار به هر کدام از کامت‌ها نسبت داده شد.



شکل شماره۱ : انواع کامت‌ها با درجات مختلف مشاهده شده در نمونه های مورد بررسی a) نوع صفر، b) نوع یک، c) نوع دو، d) نوع سه، e) نوع چهار

آسیب‌های DNA (DD) ناشی از تابش، با بررسی نمودن ۱۰۰ سلول از دو لام تهیه شده در هر یک از شرایط آزمایشی در هر فرد و انتساب هر یک از اعداد از صفر تا چهار کمی شد و توسط معادله زیر محاسبه گردید. و بدین ترتیب آسیب کلی ارائه شده در هر فرد به صورت محدوده‌ای از ۰ تا ۴۰۰ ارزیابی گردید که به عنوان شاخص کلی میزان آسیب موجود در DNA گزارش گردید(۱۰).

$$DD = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4)/(\Sigma/100)$$

که در این معادله :

DD: آسیب DNA

n_0-n_4 : تعداد کامت‌های از نوع ۰ تا ۴

اعداد ۰ تا ۴ : ضرایب ثابت مربوط به هر یک از کامت‌های صفر تا چهار

Σ : مجموع کامت‌های شمارش‌شده، شامل نوع صفر

آسیب‌های اولیه پایه DNA در نمونه های تابش ندیده (DD0) نیز با بررسی نمودن ۱۰۰ سلول از دو لام تهیه شده در هر یک از شرایط آزمایشی در هر فرد مانند آنچه در بالا ذکر شد، محاسبه گردید و آسیب خالص حاصل از تابش‌گیری به صورت تفاضل آسیب پایه از آسیب القا شده محاسبه گردید

آسیب خالص = $DD - DD_0$

www.SID.ir

Archive of SID

روش‌های آماری

آسیب اولی‌ه القا شده در DNA بعد از تابش ۱گری پرتوهای گاما (DD)، آسیب پای‌ه (DD_0) ونی‌زآسیب خالص اولی‌ه القا شده در DNA پس از

یافته‌ها

در تحقیق حاضر القای آسیب در DNA ، به عنوان شاخصی از حساسی‌ت پرتوی در سلول‌های سفید نمونه خون افراد، توسط نسخه قلیایی آزمون کامت مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون‌های حساسیت پرتوی لازم بود دوز تابشی انتخاب گردد که هنگام قرار گرفتن سلول‌ها در مقابل آن پاسخ متوسطی در سلول‌ها مشاهده گردد. بدین ترتیب چنانچه فردی حساس به پرتو باشد، آسیب بیش‌تری در سلول‌های وی ایجاد می‌گردد و این آسیب قابل مشاهده خواهد بود. طی آزمایش‌های مقدماتی انجام شده که به منظور یافتن شرای‌ط مناسب آزمای‌شی انجام ی‌افته بود، مشاهده گردید که در دوز یک گری در سلول‌ها آسیب متوسطی القا می‌شود. در بررسی‌های میکروسکوپی نیز در اثر تابش ی‌ک گری، انواع کامت‌ها مشاهده می‌گردید و همچنین اکثریت کامت‌ها از نوع دو بودند. بدین جهت دوز ی‌ک گری به منظور انجام آزمون‌های حساسی‌ت پرتوی در مراحل بعدی آزمون انتخاب گردید.

نتای‌ج حاصل از بررسی آسیب‌های پایه و القا شده در DNA زنان و مردان گروه شاهد

از نمونه های خون جمعا ۳۱ فرد سالم شامل ۱۰ زن و ۲۱ مرد به عنوان گروه شاهد استفاده گردد. در این تحقیق سه پارامتر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت: الف- آسیب پایه یا زمینه موجود در DNA در سلول‌های تابش ند یده (DD_0)، ب- آسییب القا شده در DNA در کسر نمودن آسیب پایه($DD-DD_0$)، بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم، با استفاده از روش t-test مقایسه گردیدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

اثر تابش 1Gy پرتوهای گاما (DD_1) و ج- آسیب خالص القا شده در DNA در اثر تابش 1Gy پرتوهای گاما پس از کسر آسیب زمینه (DD_1-DD_0).

مقایسه میانگین آسیب DNA در میان زنان و مردان گروه شاهد در هر سه حالت قبل از پرتو دهی (DD_0) ، پس از پرتو دهی (DD_1) و پس از پرتودهی پس از کسر آسیب زمینه (DD_1-DD_0) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های زن و مرد شاهد وجود ندارد ($p=۰/۱۱$) وبنابراین میانگین آسیب، درکل مردان و زنان شاهد، به منظور مقایسه با گروه بیمار در نظر گرفته شد.

مقایسه نتایج آسیب‌های زمینه و القا شده در گروه شاهد و بیماران مبتلا به سرطان پستان

در این تحقیق از نمونه خون ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان که تحت شیمی درمانی و پرتو درمانی قرار نگرفته بودند، استفاده گردید و آسیب‌های زمینه موجود (DD_0)، آسی‌ب القا شده پس از تابش ۱ Gy پرتوهای گاما (DD_1) و آسیب خالص القا شده پس از کسر آسیب زمینه (DD_1-DD_0) در DNA سلول‌های سفید خون آنها مورد بررسی قرار گرفت و با نتایج گروه شاهد مقایسه شد (جدول شماره ۱).

مقایسه میانگین آسیب زمینه در افراد سالم و بیمار نشان داد که آسیب زمینه در بیماران مبتلا به سرطان پستان حدود۱/۷ برابر میانگین آسیب زمینه در افراد سالم بود و بررسی‌های آماری نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار

www.SID.ir

Archive of SID

جدول شماره ۱: میانگین و انحراف معیار آسیب در گروه بیمار و شاهد ، قبل و بعد از تابش یک گری پرتو به همراه مقادیر تصحیح شده (با کسر آسیب زمینه)

نمونه	جنسیت	تعداد	DD_0 Mean ±SD	P	DD_1 Mean ±SD	P	DD_1-DD_0 Mean ±SD	P
	زن	۱۰	۳٤/٥±٤٤/٦٨	۰/۱۱	۱٥۳/۹±٥۹/۹۷	۰/۲۸	۱۱۹/٤±۳٥/۲۲	۰/۷۳
شاهد	مرد	۲۱	٦۸/۰۹±٥۷/۱٤		۱۸۱/٦۷±٦۸/۰		۱۱۳/٥۷±٤۷/٤٥	
	کل	۳۱	٥۷/۲٦±٥٥/۰٥	۰/ ۰۳	۱۷۲/۷±٦٥/۸۸	۰/۰٥	۱۱٥/٤٥±٤۳/۳۷	۰/۹۷
بیمار	زن	۲۹	۹۱/۲۷±٦۷/۱٤٦		۲۰٦/۲۷±٦۷/٥٥		۱۱٥/۰±٦۱/٥۳	

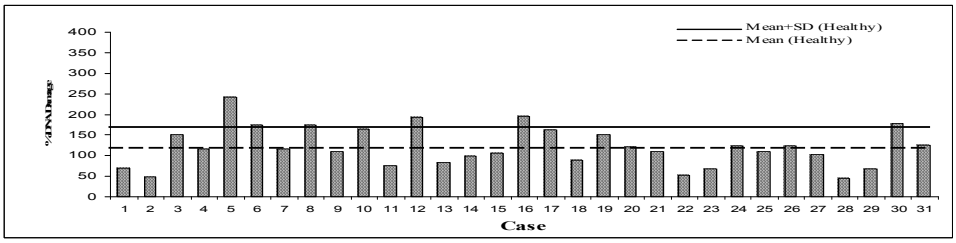
بین میانگین آسیب زمینه موجود در DNA در افراد بیمارو سالم بود (p=۰/۰۳). پس از تابش یک گری پرتوهای گاما، مقدار متوسط آسیب اولیه القا شده هم در افراد سالم و هم در بیماران نسبت به حالت قبل از پرتو دهی، به طور مشخص افزایش یافت. بررسی‌های آماری نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین آسیب‌های اولیه القا شده و آسیب زمینه موجود در DNA در افراد سالم و نیز در بیماران بود (p=۰/۰۰۰).

مقایسه آسیب اولیه القا شده (DD_1) در گروه‌های شاهد و بیمار نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد (p=۰/۰٥٦). برای حذف آثار احتمالی ناشی از سن و سایر عوامل مداخله گر بر روی نتایج آسیب DNA پس از پرتودهی، در هر فرد میزان آسیب زمینه از مقادیر آسیب اولیه القا شده کسر گردید و بدین ترتیب مقادیر خالص آسیب القا شده درDNA محاسبه گردید و سپس نتایج حاصل مورد بررسی آماری مجدد قرار گرفت. بررسی‌های‌آماری نشانگر اختلاف معنی‌داری بین آسیب خالص القا شده در گروه‌های شاهد و بیمار متعاقب تابش یک گری پرتوهای گاما نبود (p=۰/۹۷).

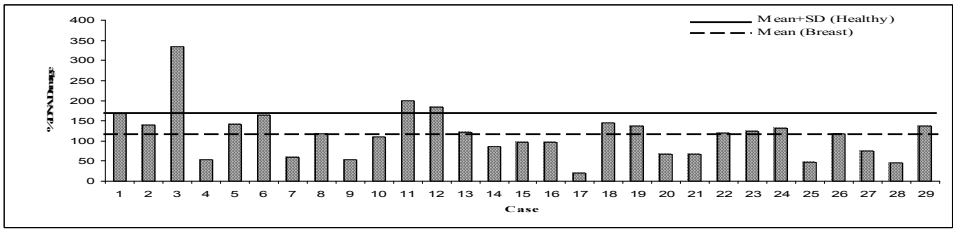
نتایج‌نشان‌می‌دهند با درنظرگرفتن‌آسیب‌های خالص اولیه القاشده درDNA به‌عنوان شاخص حساسیت پرتوی و مقایسه آن بین افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان، تفاوتی بین حساسیت پرتوی افراد سالم و بیمار وجود ندارد. نمودارهای شماره ۲ و ۳ به ترتیب نمودار آسیب خالص القا شده در DNA افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم را در مقایسه با مقادیر میانگین هر یک از گروه‌ها و میانگین به‌علاوه یک انحراف معیار افراد سالم نشان می‌دهد، اگر افرادی را که میزان آسیب‌هایشان از "میانگین به علاوه انحراف معیار" افراد سالم بیش‌تر باشد" حساس به اشعه" در نظر بگیریم ، ۱۲ درصد از بیماران (۳ نفر از ۲۹ نفر) و ۱۸ درصد از گروه شاهد (٦ نفر از ۳۱ نفر) حساسیت پرتوی بالاتر از معمول داشته‌اند (نمودارهای شماره ۲و۳).

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار شماره۲ : تغییرات آسیب های القا شده در DNA سلول‌های خونی افراد سالم، پس از تابش Gy ۱ پرتوی گاما، در مقایسه با مقادیر میانگین و میانگین به علاوه انحراف معیار، آشکار شده توسط آزمون کامت قلیایی. خطوط نقطه‌چین میانگین گروه و خطوط ممتد میانگین به علاوه یک انحراف معیار (SD + Mean) افراد سالم را نشان می‌دهد.



نمودار شماره۳: تغییرات آسیب های القا شده در DNA سلول‌های خونی بیماران مبتلا به سرطان پستان پس از تابش Gy ۱ پرتوی گاما، در مقایسه با مقادیر میانگین و میانگین به علاوه انحراف معیار ، آشکار شده توسط آزمون کامت قلیایی. خطوط نقطه‌چین میانگین گروه و خطوط ممتد میانگین به علاوه یک انحراف معیار (SD + Mean) افراد سالم را نشان می دهد

مقدار آسیب زمینه (DD_0)، هم در بیماران مبتلا به سرطان پستان و هم در افراد سالم از تغییرات گسترده‌ای برخوردار است. بررسی‌های‌آماری نشان می‌دهند چنانچه افراد بیمار و سالم به دو گروه سنی کم‌تر و بیش‌تر از ۵۰ سال مجزا شوند و سپس مقادیر آسیب، قبل از پرتودهی (DD_0) ، پس از پرتودهی(DD_1) و پس از پرتودهی تصحیح شده (DD_1-DD_0) مورد مقایسه قرار گیرند، در افراد کم‌تر از ۵۰ سال مقادیر آسیب زمینه و القا شده در بیماران مبتلا به سرطان پستان بیش از افراد سالم است و با افزایش سن، مقدار آسیب زمینه (DD_0) و القا شده (DD_1) دربیماران وافرادسالم با یکدیگر مشابه می‌گردد.

انالیز همبستگی بین میزان آسیب و سن افراد شاهد و بیمار در سه حالت قبل از پرتودهی، پس از پرتودهی و پس از پرتودهی تصحیح شده (کسر آسیب زمینه) انجام شد. افزایش آسیب به ازای سن در نمونه‌های شاهد و در بیماران مبتلا به سرطان پستان، قبل از پرتودهی(DD_0) ، پس از پرتودهی (DD_1) و پس از پرتودهی تصحیح شده(DD_1-DD_0) از لحاظ آماری معنی‌دار نیست.

در نمودار شماره ٤ رابطه بین آسیب القا شده در DNA و سن نمونه‌های بیمار و شاهد پس از ۱ گری پرتودهی و کسر آسیب زمینه مشاهده می‌گردد.

بحث

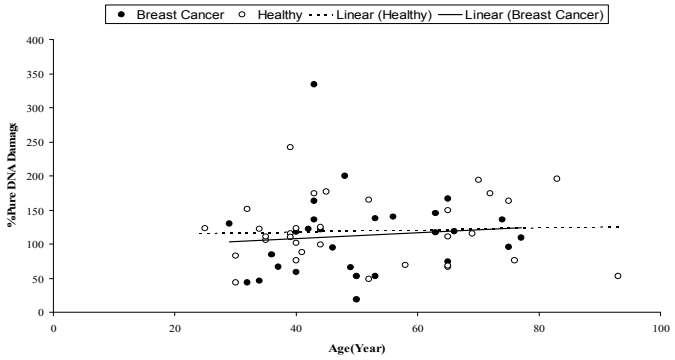
سرطان پستان از شايع‌ترين بدخيمي‌ها در زنان مي‌باشد و شايع‌ترين علت مرگ ناشي از سرطان در زنان ٥٤-٤٠ ساله است(۹). از شروع بدخيمي در پستان تا وقتي كه بتوان آنرا به كمك مامو گرافي و يا لمس فيزيكي آشكار نمود، زمان طولاني خواهد گذشت. بنابراين اغلب سرطان‌هاي پستان قبل از اين كه به مرحله تشخيص برسند، منتشر شده‌اند. در حال حاضر روشي

www.SID.ir

Archive of SID

براي تشخيص قبل از بروز سرطان پستان وجود ندارد و تنها روش متداول براي آشكار نمودن سرطان پستان قبل از بروز علايم باليني و غربالگري عموم جامعه براي يافتن افراد مشكوك به بيماري، ماموگرافي است(۱۶). اين روش علاوه بر محدوديت‌هاي تشخيصي با پرتوتابي به زنان همراه مي‌باشد و خود ممكن است باعث بالابردن خطر ابتلاء به سرطان در افراد مستعد گردد(۱۷). بنابراين يافتن روش‌هاي غربالگري با تهاجم كم‌تر كه قادر به شناسايي افراد مستعد به سرطان باشد، از اهميت خاصي برخوردار است.

در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی در رابطه با یافتن روش‌های مناسب غربالگری و شناسایي افراد مستعد به سرطان صورت گرفته است و مقالات بسیار زیادی در



نمودار شماره ۴: رابطه آسیب القاشده در DNA و سن نمونه های بیمار و شاهد پس از ۱ گری پرتو دهی و کسر آسیب زمینه

این باره انتشار یافته است. برای مثال در تحقیقی که در آن لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به سرطان پستان و نیز افراد سالم در فاز G2 سیکل سلولی تحت تابش پرتوهای یون‌ساز قرارگرفته‌اند پس از بررسی آسیب‌های کروموزومی مشخص گردید ۴۲ درصد بیماران مبتلا به سرطان پستان دارای حساسیت پرتوی بالایی می‌باشند. این نسبت درافراد سالم برابربا ٦ درصد بوده است(۳ تا ۵). افزایش حساسیت پرتوی همچنین در وابستگان خونی بیماران مبتلا به سرطان پستان نیزمشاهده شده است(۱۱،۱) و احتمال داده می‌شود که درصد بالایی از بیماران مبتلا به سرطان پستان حامل ژن‌های کم نفوذی باشند که باعث بالابردن استعداد ابتلا به سرطان پستان می گردد(۳ تا ۵).

در این تحقیق حساسیت پرتوی افراد، با بررسی آسیب‌های اولیه القا شده توسط تابش پرتوهای گاما در سلول‌های سفید خون محیطی ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۱ فرد سالم، با انجام آزمون کامت قلیایی بلافاصله بعد ازتابش‌دهی موردبررسی گرفت. این تحقیق با هدف یافتن شاخص مناسب به منظور شناسایی افراد حساس به پرتو صورت گرفت و نهایتا کارآیی نسخه قلیایی آزمون کامت- هنگامی که به منظور آشکارسازی آسیب‌های اولیه القا شده در اثر تابش پرتوهای یون‌ساز به کار برده می‌شود- در شناسایی افراد حساس به پرتو مورد بررسی قرار گرفت. علت انتخاب " آسیب‌پذیری اولیه‌سلول‌ها" به‌عنوان شاخصی ازحساسیت‌پرتوی وجود نظرات متفاوتي بود كه در مورد علت حساسيت پرتوي افراد حساس به پرتو وجود دارد، مطالعات گوناگونی در این زمینه صورت گرفته و نتایج در برخي موارد مبتني بر ايجاد آسيب‌هاي اوليه بيش‌تري متعاقب تابش‌گيري در

www.SID.ir

Deleted: y

Archive of SID

افرادحساس به پرتو و عدم وجودتفاوت از لحاظ توانايي ترميم آسيب‌ها، بين اين افراد و افراد سالم است(۱۸). اما بررسي‌هايي نيز وجود دارند كه نشان داده اند كه ممكن است روند ترميم در سلول‌هاي افراد حساس به پرتو و سالم از يكديگر متفاوت باشند(۲۰،۱۹،۱۰).

سطح آسيب‌هاي پايه، پيش از پرتودهي به نمونه‌ها، در DNA سلول‌هاي سفيد خون بيماران مبتلا به سرطان پستان بيش از افراد سالم (۱/۷ برابر) بوده است (جدول شماره ۱). اين مسأله با تحقيقات قبلي كه در آنها از روش‌هاي بررسي شكست‌هاي كروموزومي و ميكرونوكلئي استفاده شده بود، هماهنگي دارد (۳ تا ۵). نتايج به دست آمده در اين تحقيق در زمينه آسيب پايه، با تحقيقاتي كه بر روي آسيب‌هاي DNA در سلول‌هاي خوني بيماران مبتلا به سرطان پستان توسط آزمون كامت انجام شده است(۲۱ تا ۲۳) كاملاً هماهنگي دارد. از جمله اسميت و همكاران(۲۰۰۳) درتحقيق خودتفاوت مشابهي (بين ۱/۷۵– ۱/۵ برابر) بين آسيب پايه موجود در DNA افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم گزارش نموده اند كه با نتايج اين تحقيق كاملاً هماهنگي دارد(۲۳).

درگروه‌هاي شاهد وبيمار، در بررسي همبستگي بين ميزان آسيب‌پايه درDNA و سن افراد، ارتباط معني‌داري بين سن و افزايش آسيب DNA مشاهده نشد. تحقيقات قبلي انجام شده توسط آزمون كامت در سلول‌هاي كليه موش،آزمون‌آپوپتوز در اسپرم انسان،آناليز شكست‌هاي كروموزومي وميكرونوكلئي بيانگر افزايش آسيب پايه با افزايش سن افراد بوده‌اند(۲۵،۲۴،۴) درحالي‌كه تحقيقاتي نيزبا استفاده از آزمون كامت در زمينه حساسيت پرتوي افراد مبتلا به سرطان صورت گرفته‌اند كه ارتباط و همبستگي بين افزايش آسيب DNA و سن افراد را نشان نداده‌اند(۲۰).

بررسي‌ها نشان داده‌اند وجود آسيب‌هاي پايه در DNA انعكاس دهنده بيشتر قرارگرفتن در معرض عوامل كارسينوژن و نيز نقص در ترميم است (۲۶،۲۲). سطوح بالاي اضافات[1] DNA و آسيب‌هاي اكسيداتيو بازها در سلول‌هاي تومور و بافت‌هاي اطراف تومور در بيماران مبتلا به سرطان پستان در مقايسه با افراد سالم گزارش شده است(۲۶). اين يافته‌هاي نشان مي‌دهند كه تجمع آسيب در DNA ممكن است در سرطان‌زايي پستان نقش داشته باشد و ناپايداري DNA و بالاتر بودن سطح آسيب پايه در يك فرد مي‌تواند نقش تعيين كننده‌اي در استعداد ابتلا به سرطان و نيز ايجاد سرطان پستان داشته باشد(۳ تا ۵، ۲۱).

در اين تحقيق، آسيب پايه مشاهده شده در بيماران جوان مبتلا به سرطان پستان بيش از افراد جوان سالم است و با افزايش سن چنان‌كه مشاهده مي‌گردد مقدار آسيب پايه در بيماران و افراد سالم تا حدودي با يكديگر مشابه مي‌گردد به نحوي كه خط برازش براي آسيب DNA افراد بيمار و سالم در سنين بالا تلاقي مي‌كنند. تحقيقاتي كه در مورد بيماران مبتلا به سرطان پستان ارثي در مقايسه با سرطان‌هاي پستان تك‌گير انجام شده نشان مي‌دهد كه سرطان‌هاي پستان ارثي، بيماران را در سنين كم‌تر مبتلا مي‌سازند(۲۷). بالا تر بودن آسيب زمينه تجمع يافته در DNA در بيماران جوان‌تر، حاكي از ناپايداري DNA وعدم توانايي لازم در ترميم آسيب‌ها به هنگام مواجه شدن با عوامل آسيب رساننده به DNA در بيماران جوان‌تر است و مي‌تواند اشاره‌اي به قوي‌تر بودن جنبه‌هاي ژنتيكي ابتلا به سرطان پستان در زنان جوان داشته باشد.

هنگام بررسي تأثير سن افراد در ميزان آسيب القا شده و نيز آسيب خالص القا شده در DNA بررسي‌هاي آماري نشان دهنده اختلاف معني دار و وجود همبستگي بين آسيب‌هاي القا شده و خالص DNA و سن افراد نبودند. اين مي‌تواند بدين معنا باشد كه آسيب‌پذيري

1. DNA adducts

www.SID.ir

Archive of SID

اولیه و القاء آسیب در DNA سلول‌های سفید افراد با گذر زمان تغییر چندانی نمی‌کند .

نتایج نشان می‌دهند با انتخاب آسیب‌های خالص اولیه القا شده در DNA به عنوان شاخص حساسیت پرتوی و مقایسه آن بین افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان، تفاوتی بین حساسیت پرتوی افراد سالم و بیمار مشاهده نمی‌شود و افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آسیب‌پذیری اولیه با افراد سالم تفاوتی ندارند. در این بررسی افرادی حساس به اشعه در نظر گرفته شدند که میزان آسیب‌هایشان از "میانگین به علاوه انحراف معیار" همان گروه بالاتر باشد. با چنین معیاری ۱۲ درصد از بیماران (۳ نفر از ۲۹ نفر) و ۱۸ درصد از گروه شاهد (٦ نفر از ۳۱ نفر) حساسیت پرتوی بالاتر از معمول داشته‌اند (شکل‌های شماره۳و٤). البته تعیین تعدادافراد باحساسیت پرتویی بالا به مقدار زیادی به محدوده طبیعی تعریف شده برای پاسخ به پرتو (cut-off)، بستگی دارد.

Scott و همکاران در سال ۱۹۹۸، در تحقیقات خود در مورد حساسیت پرتوی بیماران مبتلا به سرطان پستان با آزمون آنالیز متافاز، با در نظر گرفتن محدوده بالاتر از میانگین به علاوه دو انحراف معیار به عنوان ناحیه با حساسیت پرتویی بالا، ۳۰ درصد ازبیماران را حساس به اشعه گزارش نموده‌اند. همین گروه در تحقیق خود با روش میکرونوکلئی۱۹۹۹، ۲۵درصد ازبیماران را حساس به اشعه گزارش کرده‌اند(۳،٤). قابل ذکر است آزمون‌های آنالیز متافاز و میکرونوکلئی آسیب‌هایی را نشان می‌دهند که در DNA ایجاد شده‌اند و سلول پس از گذر از مراحل ترمیم موفق به تعمیر آنها نشده است. مولر و همکاران در تحقیقات خود در مورد بررسی روند ترمیم آسیب‌های القا شده در DNA بیماران مبتلا به سرطان و افراد سالم، افرادی راحساس به پرتو دانسته‌اندکه شیب نزولی منحنی تغییرات آسیب باقیمانده درDNA با افزایش زمان ترمیم، کم‌تر از شیب میانگین باشد(۱۹،۲۰). البته مطالعات زیادي لازم است تا بتوان این آستانه را با درستي بیش‌تري تعیین نمود.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق مبین آن است که افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آسیب پذیری اولیه با افراد سالم تفاوتی ندارند. این در حالی است که بالاتر بودن سطح آسیب‌های پایه در بیماران می‌تواند نشان دهنده نقص در روندهای ترمیمی در بیماران باشد.

سپاسگزاري

این تحقیق با حمایت مالی امور پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از همکاری جناب آقای دکتر فرهاد سمیعی، سرکار خانم موسوی نیا و کارکنان بخش معراج انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تهران، سرکارخانم تیز مغز و کارکنان بخش پرتودرمانی بیمارستان امام خمینی تهران که با کمک‌های خود انجام تحقیق حاضر را میسّر نمودند، قدردانی و تشکر می‌شود.

www.SID.ir

Archive of SID

فهرست منابع

1. Fertil B, Malaise E.P. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. ***Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys,*** 1981; 7: 621-629.
2. Fearon E.R. Human cancer syndromes clues to the origin and nature of cancer. ***Science***, 1997; 278(5348): 1043-1056.
3. Scott D, Barber J.B. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? ***Br.J. Cancer,*** 1998; 77(4): 614-620.
4. Scott D, Barber J.B.P. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. ***Int. J. Radiat. Biol,*** 1999; 75(7): 1-10.
5. Scott D, Spreadborough A. Genetic predisposition to breast cancer. ***Lancet,*** 1994; 344: 1444.
6. Deschavanne P.J, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. ***Int. J. Radiation. Oncology Biol. Phys,*** 1996; 34(1): 251-266.
7. McKay M, Peters L, Genetic determination of radiation response. ***Int.J.Radiat.Biol,*** 1997; 72(2): 225-229.
8. Parshad R, Stanford K.K. Radiation induced breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. ***Clinical Reviews in Oncology/Hematology,*** 2001; 37: 87-96.
9. Robbins S.L, Cotran R.S, Kumar V. ***Basic Pathology,*** Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002/2006.
10. Nascimento P.A, Da Silva M.A, Oliveira E.M, Suzuki M.F, Okazaki K. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. ***Braz. Med. Biol. Res,*** 2001; 34(2): 165-76.
11. Teare M.D, Wallace S.A. Cancer experience in the relatives of an unselected series of breast cancer patients. ***Br. J.Cancer,*** 1994; 10: 102-111.
12. Rojas E, Lopez M.C, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, ***Journal of Chromatography B,*** 1999; 722: 225-254.
13. A. Collins, THE COMET ASSAY modified for detection of oxidized bases with the use of bacterial repair endonucleases, ***Comet assay interest group website*** (2002), http://comet assay.com/.
14. Kobayashi H, Sugiyama Ch, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. ***MMS Commun,*** 1995; 3(2): 103-115.
15. Visvardis E-E, Tassiou AM. & Piperakis SM. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and

www.SID.ir

Archive of SID

cryopreserved lymphocytes exposed to H_2O_2 and γ-irradiation with the alkaline comet assay. ***Mutation Research,*** 1997; 383: 71-80.

16. J R C Sainsbury, T J Anderson, D A L Morgan. ABC of breast diseases. ***Breast cancer*** 2000 Sep; 321(23): 745.
17. Chakraberly R, Sankavarayanan K, Cancer Predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation induced cancers. ***Radial. Res,*** 1995; 143: 293-301.
18. Mozdarani H, Bryant P. Kinetics of chromatid aberrations in G2 ataxia-telangiectasia cells exposed to x-rays and ara A. ***Int. J. Radiat. Biol,*** 1989; 55(1): 71-84.
19. Muller W.U, Bauch T. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. ***Int. J. Radiat. Biol,*** 1994; 65(3): 315-9.
20. Muller W.U, Bauch T. Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. ***Radiat Environ Biophys,*** 2001; 40(1): 83-9.
21. Rajeswari N, Ahuja Y.R, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao K.V. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. ***Carcinogenesis,*** 2000; 21: 557-561.
22. Udumudi A, Jaiswal M, Rajeswari N, Desai N, Jain S, Balakrishna N, et al. Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis: a study of DNA damage and repair. ***Mutat. Res,*** 1998; 412: 195-205.
23. Smith T.R, Miller M.S, Lohman K.K, Douglas Case L, Hu1 J.J. DNA damage and breast cancer risk, ***Carcinogenesis,*** 2003; 24(5): 883-889.
24. Singh N.P, Muller C.H, Berger R.E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm, ***FERTILITY AND STERILITY*** 2003 Dec; 80(6): 83-9.
25. Singh N.P, Ogburn C.E, Wolf N.S, Van Belle G, Martin G.M. DNA double-strand breaks in mouse kidney cells with age, ***Biogerontology*** 2001; 2: 261-270.
26. Grossman L, Matanoski G, Farmer E, Hedayati M, Ray S, Trock B, et al. DNA repair as a susceptibility factor in chronic diseases in human populations. In Dizdaroglu, M. and Karakaya, A.E. (eds) ***Advances in DNA Damage and Repair.*** New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999; pp: 149-167.
27. Altaha R, Read E, Abraham J. Breast and ovarian cancer genetics and prevention. ***W V Med J.*** 2003 Sep-Oct; 99(5): 187-91.

www.SID.ir