Archive of SID

مجله سنجش و ایمنی پرتو، جلد ٤، شمارهٔ ١، زمستان ١٣٩٤

مروری بر انواع روش‌های سیتوژنتیک در دزیمتری بیولوژیکی

فریده ذاکری

تهران، سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، کد پستی : ٨٣٦- ١٤٣٩٥

پست الکترونیکی:fzakeri@aeoi.org.ir

چکیده

کاربرد وسیع و روزافزون پرتوهای یونساز در بخش‌های مختلف صنایع، پزشکی، کشاورزی؛ تحقیقات ریسک پرتوگیری کارکنان و مردم را افزایش داده است. پرتوهای یونساز به عنوان یک عامل کلاستوژن قوی سبب بروز انواع آسیب‌های DNA و شکست‌های کروموزومی می‌گردد. دزیمتری بیولوژیک با استفاده از آنالیز سیتوژنتیک لنفوسیت‌های خون محیطی انسان کاربرد وسیعی در تخمین دز پرتو در موارد پرتوگیری شغلی وحوادث پرتوی، به خصوص در مواردی که دزیمتری فیزیکی موجود نبوده و یا اطلاعات حاصل از آن دقیق نباشد، دارد. اطلاعات حاصل از دزیمتری بیولوژیکی، پزشک را در اتخاذ تدابیر درمانی مناسب کمک می‌کند. چندین روش سیتوژنتیک جهت تخمین دز بیولوژیکی وجود دارد که با این روش‌ها می‌توان انواع آسیب‌های کروموزومی ناپایدار و پایدار ناشی از پرتو را سنجیده و با استفاده از منحنی کالیبراسیون مناسب که قبلاً در آزمایشگاه و با پرتوهایی با همان کیفیت تهیه شده باشند، دز جذب شده را تخمین زد. در حال حاضر، دزیمتری بیولوژیکی بر اساس بررسی کروموزوم‌های دی‌سانتریک روش اصلی و معتبر تخمین دز در موارد پرتوگیری شغلی و حوادث پرتوی است. علاوه بر آن آنالیز جابه‌جایی‌های کروموزومی با رنگ‌آمیزی (FISH)، سنجش ریز هسته یا میکرونوکلئوس(MN) و تراکم پیش‌رس کروموزومی(PCC) از دیگر روش‌های سیتوژنتیک در بیودزیمتری هستند. نشانگرهای بیولوژیک دیگری نیز وجود دارند که به دلایل مختلف کاربرد آن‌ها محدود و یا در مرحله تحقیقاتی می‌باشد.

کلیدواژگان: دزیمتری بیولوژیکی، دی‌سانتریک، جابه‌جایی‌های کروموزومی، ریز هسته، تراکم پیش‌رس کروموزومی.

١. مقدمه

دزیمتری بیولوژیکی براساس بررسی کروموزوم‌های دی‌سانتریک، از اواسط دهه‌ی ١٩٦٠ انجام می‌شود. در طی این سال‌ها توسعه سریع این روش باعث شده است تا در بسیاری از برنامه‌های حفاظت در برابر پرتو کشورهای عضو آژانس، بررسی دی‌سانتریک به‌صورت یک روش رایج درآید. تجربه‌ی به‌کارگیری آن در هزاران مورد پرتوگیری واقعی یا مشکوک، نه تنها کارآیی این روش را به‌خوبی به اثبات رساند بلکه محدودیت‌های آن را نیز کاهش داده است. تخمین دز پرتوگیری افراد در حوادث پرتوی، به چند دلیل حائز اهمیت است. در پرتوگیری با دز بالا (حاد، بیشتر از ١ گری)، تخمین دز به تصمیم‌گیری در مورد نحوه‌ی درمان کمک کرده و پزشک از عوارضی که در هفته‌ها یا ماه‌های بعد بروز می‌کند مطلع می‌شود. در پرتوگیری با دزهای کم‌تر از حدی که نیاز به درمان باشد، اطلاعات دزیمتری بیولوژیکی برای پزشک، جهت مشاوره با افراد پرتودیده و آگاه ساختن آن‌ها از مخاطره ابتلاء به عوارض دیررس احتمالی، مانند سرطان حائز اهمیت

www.SID.ir

Archive of SID

است. عدم افزایش معنی‌دار آسیب‌های کروموزومی در افرادی که پرتوگیری آن‌ها در حد بسیار کم (کمتر از ۵۰mGy) است، اغلب اطمینان بخش می‌باشد. از جمله این موارد هنگامی است که اطلاعات بسیار ناچیزی از جزئیات حوادث در دست باشد و محاسبه یا اندازه‌گیری دز فیزیکی امکان‌پذیر نباشد. در این مواقع تنها راه تعیین دز از طریق دزیمتری بیولوژیکی است[۱]. در این مقاله مروری، موارد زیر شرح داده شده‌اند:

- دزیمتری بیولوژیکی
- انواع آسیب‌های کروموزومی ناشی از پرتو
- سنجش دی‌سانتریک
- سنجش جابه‌جایی با روش FISH
- سنجش ریزهسته
- سنجش تراکم پیش‌رس کروموزومی
- روش‌های خودکار بررسی شکست‌های کروموزومی
- نرم‌افزار CABAS جهت تخمین دز بیولوژیکی
- مقایسه روش‌های سیتوژنتیک در بیودزیمتری

۲. دزیمتری بیولوژیکی

دزیمتری بیولوژیکی بر پایه اثرات بیولوژیکی القاء شده ناشی از پرتو در یک نشانگر بیولوژیکی است که میزان این اثرات در ارتباط با دز دریافتی است، لذا به کمک آن می‌توان دز پرتو را تخمین زد. اثرات بیولوژیکی القاء شده در نشانگرها، تغییرات سلولی و مولکولی ناشی از برخورد پرتوهای یونساز به بافت زنده است. شکست‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی انسان شایع‌ترین و اصلی‌ترین سیستم مطالعه شده است که واجد اکثر خصوصیات یک دزیمتر بیولوژیک ایده‌آل است. باید دقت کرد که نشانگرهای بیولوژیک متعددی وجود دارند اما تنها برخی از آن‌ها دزیمتر بیولوژیک محسوب می‌شوند. خصوصیات یک دزیمتر بیولوژیک ایده‌آل عبارتند از:

- برای تشعشع، اختصاصی باشد.
- جمع‌آوری نمونه، ساده باشد(ادرار- خون).
- حساسیت بالا داشته باشد (واکنش پاسخ به دز، از مقادیر کم پرتو شروع شود).
- رابطه دز- اثر مناسب داشته باشد (قابلیت آشکارسازی در محدوده وسیع پرتو داشته باشد).
- پایداری اثر داشته باشد (در یک محدوده زمانی معین ترمیم نشود).
- امکان دستیابی سریع به نتایج (لازمه شروع اقدامات درمانی) را داشته باشد.
- قادر به تشخیص و تمایز بین پرتوگیری تمام بدن و پرتو گیری بخشی از بدن باشد.

دزیمتری بیولوژیکی در موارد مختلف پرتوگیری‌های حاد یا درازمدت و تقطیعی و موارد پرتوگیری یکنواخت تمام بدن و یا پرتوگیری بخشی از بدن به‌صورت موضعی هر کدام متفاوت بوده و ملاحظات خاص خود را دارند که برای اطلاعات دقیق می‌توان به گزارش‌های فنی آژانس بین‌المللی انرژی اتمی[۳-۱] و استانداردهای ملی شماره ۸٦٦۲ و ۱۲۲۳۰مراجعه کرد[٤، ٥].

۳. انواع آسیب‌های کروموزومی ناشی از پرتو

پرتوهای یونساز می‌توانند سبب شکست در یک یا هر دو زنجیره(DNA (DSB, SSB، آسیب باز و اتصال متقاطع پروتئین‌های DNA شوند. پس از پرتودهی سلول‌های نرمال،DSB آسیبی است که مسئول تشکیل اکثر شکست‌های کروموزمی قابل مشاهده در مرحله متافاز از تقسیمات سلولی است. پرتوهای یونساز یک کلاستوژن غیر وابسته به مرحله سنتز (s) در چرخه سلولی است و بر خلاف آن پرتو UV وجهش‌زاهای شیمیایی وابسته به مرحله s هستند. بنابراین پرتودهی سلول‌ها با پرتوهای یونساز در مرحله G0/G1 و

www.SID.ir

Archive of SID

G2/S از چرخه سلولی، به ترتیب شکست‌هایی از نوع کروموزومی و کروماتیدی ایجاد می‌کند در حالی که UV و مواد شیمیایی در کلیه مراحل چرخه سلولی فقط شکست‌های کروماتیدی ایجاد می‌کنند. آسیب‌های کروموزومی به دو دسته آسیب‌های پایدار و ناپایدار تقسیم می‌شوند. دی‌سانتریک، آسیب اصلی مورد استفاده در دزیمتری بیولوژیکی، یک آسیب ناپایدار است که در شکل کامل آن به همراه یک قطعه بدون سانترومر (فرگمنت) مشاهده می‌شود. پس از پرتوگیری با دزهای بالا اشکال سه یا چهار سانترومری به ترتیب به همراه دو و سه قطعه فرگمنت مشاهده می‌شوند. حلقه‌های سانترومردار نیز مشابه دی‌سانتریک یک آسیب ناپایدار در لنفوسیت‌های انسان است که در تخمین دز به‌کار می‌روند اما وقوع آنها نادرتر از وقوع دی‌سانتریک‌ها است (شکل ۱). از دیگر شکست‌های ناپایدار می‌توان به انواع قطعات بدون سانترومتر اشاره کرد. جابه‌جایی‌های متقابل[1] و غیر متقابل[2] و بینابینی[3] که با استفاده از روش نواربندی–G و دورگ‌گیری فلوئورسانس درجا (FISH) قابل مشاهده هستند از نوع شکست‌های پایدار هستند. از شکست‌های ناپایدار از نوع دی سانتریک وحلقه سانترومردار در دزیمتری بیولوژیک موارد پرتوگیری که مدت زمان زیادی از آن نگذشته باشد استفاده می‌شود، در حالی که در دزیمتری بیولوژیکی گذشته‌نگر باید از بررسی شکست‌های پایدار استفاده نمود.

٤. سنجش دی سانتریک

تعیین میزان وقوع شکست‌های کروموزومی دی‌سانتریک در مرحله متافاز درکشت لنفوسیت‌های خون محیطی انسان، روش توصیه شده برای دزیمتری بیولوژیکی است. لنفوسیت‌ها با روشی کشت می‌شوند که مطالعه متافازهای اولین تقسیم سلولی را میسر سازند. در این روش خون کامل و یا لنفوسیت‌های جدا شده از خون کشت داده می شوند تا نهایتاً امکان شمارش اولین نسل سلول‌های متافازی فراهم شود. یک ماده متوقف‌کننده به نام کلسمید یا کلشی سین برای توقف تقسیم سلولی در مرحله متافاز اضافه می‌شود. برای اطمینان ازحصول اندیس میتوزی مناسب که اکثر سلول‌ها در متافاز اولین تقسیم سلولی باشند، باید مدت زمان کشت سلولی و زمان اضافه نمودن کلشی سین (ماده متوقف‌کننده) بهینه شود. جداسازی متافازها از طریق سانتریفیوژکردن، قراردادن درمحلول نمکی هیپوتونیک و تثبیت در مخلوطی از الکل و اسیداستیک انجام می‌شود. سلول‌های تثبیت شده بر روی لام ریخته شده و رنگ‌آمیزی می‌شوند. لام‌های میکروسکوپی رنگ‌آمیزی شده برای یافتن شکست‌های دی‌سانتریک مورد بررسی قرار می‌گیرند[٤].

دستورالعمل دقیق کشت سلول، محصول‌برداری و رنگ‌آمیزی متافازها در گزارش‌های فنی آژانس بین‌المللی انرژی اتمی قابل دسترس هستند[۱،۲]. هنگامی که شکست‌های کروموزومی به‌عنوان نشانگر بیولوژیکی شمارش شوند، دقیقاً منعکس‌کننده اثر دز رسیده بر هسته سلول‌ها است. با مراجعه به داده‌های منحنی کالیبراسیون دز – پاسخ، تعداد دی‌سانتریک‌های مشاهده شده در تعداد مناسب متافازهای شمارش شده به تخمین دز جذب شده تبدیل می‌شود. این دز، تقریبی از متوسط دز رسیده به تمام بدن است زیرا لنفوسیت‌ها به‌طور گسترده‌ای در بدن منتشر و متحرک هستند. این منحنی با پرتودهی خون با دزهای مناسب در آزمایشگاه تهیه می‌شود. دزی که به نمونه‌ها داده می‌شود باید قابل ردیابی از طریق دستگاه‌های فیزیکی مانند یک اتاقک یونیزاسیون استاندارد باشد[۳]. آزمایشگاه می‌تواند دی‌سانتریک‌های مشاهده شده در موارد مختلف را با استفاده از سطح حد زمینه دی‌سانتریک (یا دی‌سانتریک و حلقه سانترومردار) بسنجد.

اگرحاصل شکست به‌دست آمده به‌طور معنی‌داری با میزان وقوع آن در کنترل متفاوت نباشد، بهترین تخمین دز برای فرد

1-Reciprocal translocation
2-Non- reciprocal translocation
3-Interstitial translocation (insertion)

www.SID.ir

Archive of SID

در حدود بالای اطمینان، صفر است. اگر حاصل شکست اندازه گیری شده به‌طور معنی‌داری بالاتر ازسطح آن در کنترل باشد، تخمین دز با میزان عدم اطمینان آن با استفاده از منحنی محاسبه وگزارش خواهد شد. نتایج دز تمام بدن معمولاً باحدود اطمینان ۹۵٪ گزارش می‌شود که همیشه به‌صورت یک تقریب است ،زیرا عدم اطمینان‌ها روی منحنی کالیبراسیون به‌صورت یک تابع احتمالی با پراکندگی نرمال است، درحالی‌که بر روی حاصل شکست‌های اندازه‌گیری شده معمولاً دارای پراکندگی پوآسون یا توزیع پراکنده است[۲].

اختصاصی بودن روش سنجش دی‌سانتریک با این واقعیت مشخص می‌شود که عموماً در یک جمعیت طبیعی، یک دی‌سانتریک در هر ۱۰۰۰ گستره متافازی مشاهده می‌شود که این تعداد تقریباً غیروابسته به سن وجنس می‌باشد. دقت این روش به تعداد سلول‌های مشاهده شده، سطح زمینه و منحنی کالیبراسیون مورد استفاده بستگی دارد.

حداقل آشکارسازی دز با این روش ۰/۱Gy بوده که با شمارش ۱۰۰۰-۵۰۰ متافاز حاصل می‌شود. به‌کارگیری این روش برای دزیمتری در مواردی که مدت زمان زیادی از حادثه گذشته است باید با در نظر گرفتن نیمه‌عمر ٦ ماه تا ۳ سال برای لنفوسیت‌ها و همچنین با استفاده از تابع G در محاسبات باشد. همچنین در مواردی که پرتوگیری حاد، همگن نبوده و به‌صورت موضعی باشد از روش Qdr برای محاسبه دز استفاده می‌شود. همچنین در حوادث پرتوی با ابعاد وسیع که تعداد قربانیان زیاد است معیارهای خاصی برای دزیمتری با روش دی‌سانتریک وجود دارد از جمله آن‌که شمارش ۵۰-۲۰ سلول و یا مشاهده ۱۰۰ دی‌سانتریک در هر تعداد سلول شمارش شده برای تریاژ سیتوژنتیک کافی می‌باشد[۵].

اگر چه تحولات اخیر در نرم افزارهای پردازش تصویر، امکان شمارش خودکار کروموزوم‌های دی‌سانتریک را فراهم کرده است اما همچنان دانشمندان به دنبال یافتن روش‌های سریع و آسان‌تر برای آنالیز کروموزوم‌های دی‌سانتریک هستند، به‌طوری‌که با پیشرفت روش‌های فلوسیتومتری و پردازش خودکار تصاویر آن امکان آنالیز دی‌سانتریک‌ها به روشی سریع‌تر فراهم شده است[٦].

اساس فلوسیتومتری بر پایه لیز غشاء خارجی سلول و بکارگیری رنگ‌های فلورسنت برای رنگ‌آمیزی DNA (اسیدهای نوکلئیک) و یا ترکیبی از رنگ‌های فلورسنت با آنتی بادی‌های مونوکلونال با نام عمومی کنژوگه است. فلوسایتومتری تکنیکی بسیار سریع و قدرتمند برای شناسایی و ارزیابی خصوصیّات ذرات میکروسکوپی مانند سلول‌ها وکروموزوم‌ها و همچنین برای شمارش آن‌ها است که با تعلیق ذرات مورد آزمایش، آن‌ها در یک جریان مایع با سرعتی حدود ۵ تا ۵۰ متر در ثانیه قرار داده می‌شوند و از میان منفذی باریک و از مقابل پرتوی باریکی از نور لیزر عبور می‌کنند و بدین ترتیب امکان جمع‌آوری اطلاعات مربوط به ۵۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ سلول در هر ثانیه فراهم می‌شود. فلوسایتومتری در بخش‌های تحقیقاتی و تشخیصی برای تشخیص بیماری‌ها کاربرد وسیعی دارد. غالباً حجم مورد نیاز از نمونه مورد آزمایش نیز خیلی کم و حدود ۱۰۰ میکرولیتر و دقت آن در حد تشخیص ۱ سلول سرطانی در میان ۱۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰ سلول عادی موجود در نمونهٔ مغز استخوان است[۷].

برای استفاده از روش فلوسایتومتری در آنالیز دی‌سانتریک‌ها، سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی جداسازی شده و به روش معمولی کشت داده می‌شوند و پس از ٤٨ ساعت قرار گرفتن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، کروموزوم‌ها جداسازی شده و با یدید پروپیدیوم (PI[1]) رنگ‌آمیزی و سانترومرها نشان‌دار می‌شوند. در این حالت کروموزوم‌های واجد یک و دو سانترومر به خوبی از هم تفکیک و شناسایی می‌شوند[٦]. با این روش منحنی دز-پاسخ تهیه شده و نتایج آن با روش‌های روتین فعلی مقایسه شده است. نتایج نشان داده است که آنالیز خودکار کروموزوم‌های نشان‌دار شده با

1-Propidium iodide

www.SID.ir

Archive of SID

فلوکروم‌ها از صحت و دقت بسیار خوبی در مقایسه با روش‌های خودکار روتین آنالیز دی‌سانتریک برخوردار است و می‌توان از آن به عنوان یک تکنولوژی جدید و سریع‌تر در موارد حوادث پرتوی با ابعاد وسیع استفاده کرد[۸].

۱.٤. مزایا و محدودیت‌های روش سنجش دی‌سانتریک در تخمین دز بیولوژیکی

از مزایای روش سنجش دی‌سانتریک آن است که آسیب دی‌سانتریک تقریباً مختص پرتوهای یونساز می‌باشد و میزان زمینه آسیب دی‌سانتریک بسیار پایین است (حدود ۱ در هزار متافاز). همچنین حساسیت این روش بالا بوده (پرتوگیری ۰/۱ گری قابل آشکارسازی است). از جمله محدودیت‌های این روش آن است که دردوزهای بالاتراز ۵ گری به‌دلیل کاهش اندیس میتوزی وعدم امکان تقسیم میتوزی کارایی ندارد و به دلیل ناپایدار بودن آن در دزیمتری گذشته‌نگر استفاده نمی‌شود.

۵. سنجش جابه‌جایی کروموزومی با روش FISH

FISH روشی است که در آن از توالی‌های خاص DNA به عنوان پروب یا کاوشگر برای قسمت‌های خاص ژنوم استفاده می‌شود و به کمک اتصال فلوروکرومه‌ای مختلف، رنگ‌آمیزی کل یا نواحی از کروموزوم میسر می‌شود. با رنگ‌آمیزی کروموزوم‌ها با روشFISH، جابه‌جایی‌ها یا شکست‌های پایدار کروموزومی به صورت بازآرایی رنگی در میکروسکوپ فلوئورسانس مشاهده و تشخیص داده می‌شوند. لذا از این روش در دزیمتری گذشته‌نگر استفاده می‌شود.

کلیه مراحل کشت لنفوسیت‌ها و محصول‌برداری سلول‌های تثبیت شده مشابه سنجش دی‌سانتریک است تنها تفاوت این دو روش در نوع رنگ‌آمیزی اسلایدهاست که در روش دی‌سانتریک از رنگ گیمسا و در روش FISH از رنگ‌های فلوئورسانس استفاده می‌شود. در این روش می‌توان تنها از یک رنگ (FISH تک‌رنگ) یا چندرنگ (FISH چندرنگ[۱]) برای رنگ‌آمیزی کروموزوم‌های مختلف استفاده کرد یا به‌طور اختصاصی فقط سانترومرها یا تلومرها رنگ‌آمیزی شوند. در مطالعات تخصصی‌تر می‌توان فقط بخش‌هایی از یک کروموزوم خاص را رنگ‌آمیزی کرد که این موارد اغلب در تشخیص سندرم‌های ژنتیکی کاربرد دارند.

در کاربرد بیودزیمتری معمولاً از رنگ‌آمیزی ۳ کروموزوم بزرگتر که نمایانگر حدود ۲۰٪ ژنوم باشند و بنابراین قادر به آشکارسازی ۳۳٪ کل جابه‌جایی‌ها باشند استفاده می‌شود. درصد ژنوم هرکوکتل استفاده شده نسبت به کل ژنوم با اندازه‌گیری طول کروموزوم‌ها تعیین می‌شود[۹]. وقوع جابه-جایی‌ها درکل ژنوم با استفاده از فرمول استانداردی که توسط لوکاس و همکارانش[۱۰] پیشنهاد شده تعیین می‌شود با این‌فرض‌که جابه‌جایی کروموزوم‌ها به‌صورت ساده صورت گیرد. چندین روش برای گزارش شکست‌های کروموزومی با روش FISH وجود دارد از جمله سیستم نامگذاری PAINT که کاملاً توصیفی است[۱۱] و سیستم ساویج و سیمپسون که شامل اعداد و حروف برای شرح هر نوع جابجایی است[۱۲]. هنگامی که برای دزیمتری بیولوژیکی پس از گذشت ۱۰ سال یا بیشتر از وقوع پرتوگیری، میزان جابه‌جایی‌ها به روش FISH اندازه‌گیری شوند، دز تخمین زده شده، متوسط دز رسیده به مغز استخوان فعال را نشان می‌دهد. زیرا پرتوگیری اولیه مربوط به سلول‌های ریشه‌ای است که اجداد لنفوسیت‌های شمارش شده هستند. برای دزیمتری در زمان‌های کوتاه‌تر، جابه‌جایی‌ها در مخلوطی از لنفوسیت‌های با عمر طولانی و نسل‌های بعدی سلول‌های ریشه‌ای پرتودیده، مشاهده می‌شود[۳]. میزان کنترل برای جابه‌جایی‌ها بیشتر از دی‌سانتریک‌ها است. بخشی به آن دلیل که جابه‌جایی‌ها شکست‌هایی از نوع پایدار می‌باشند. همچنین ارتباط قوی بین جابه‌جایی‌ها با سن وجود دارد که

2-Multi-Color FISH

www.SID.ir

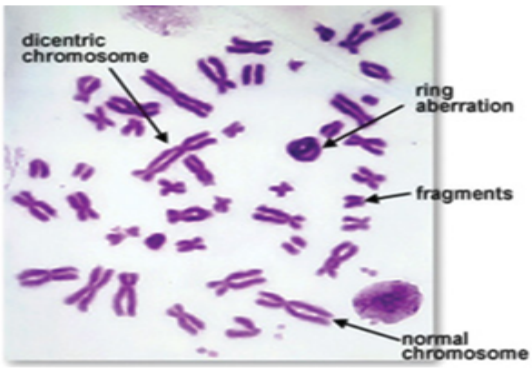
Archive of SID

باید در نظر گرفته شود و سیگار نیز اثر معنی‌داری بر وقوع حد زمینه جابه‌جایی‌ها دارد [۲]. سوروکین - دروم و همکارانش[۱۳]، اطلاعات مربوط به ۸ آزمایشگاه را جمع‌آوری نموده و نشان دادند که حاصل معادل (equivalent yield) کل ژنوم برای جابه‌جایی‌های دوطرفه بین ۱۰-۲ در هر ۱۰۰۰ سلول در سنین بین ۸۰-۱۰ سال است. کلیه دستورالعمل‌های تخمین دز برای دی‌سانتریک برای جابه‌جایی‌های به‌دست آمده با سنجش FISH نیز به کار می‌رود با این تفاوت که برای محاسبه دز از فرمول لوکاس و منحنی کالیبراسیون اختصاصی FISH استفاده می‌شود.

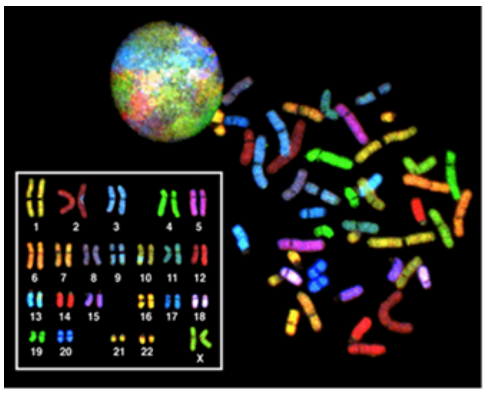
۱.۵. مزایا و محدودیت‌های روش FISH در تخمین دز بیولوژیکی

روشFISH به علت بررسی شکست‌های کروموزومی پایدار، در دزیمتری بیولوژیکی گذشته‌نگر استفاده می‌شود. اما رنگ‌آمیزی اسلایدها پیچیده و مشکل است و شمارش (اسکور) آن نیاز به مهارت‌های تخصصی و تجربی دارد، مواد و دستگاه‌های مورد نیاز آن بسیار گران‌قیمت است و در دزهای بالاتر از ۵ گری به‌دلیل کاهش اندیس میتوزی و عدم امکان تقسیم میتوز کارایی ندارد.

قبل از این روش، از روش دیگری به نام G- Banding برای مطالعه جابه‌جایی‌های کروموزومی استفاده می‌شد که یک تکنیک اختصاصی رنگ‌آمیزی است که به کمک شستشو با تریپسین و سپس رنگ‌آمیزی متداول گیمسا انجام می‌شود. با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا کروموزوم‌ها را به صورت نوارهای تاریک و روشن رنگ‌آمیزی می‌کنند، که به G-banded معروف هستند. این نوع رنگ‌آمیزی منجر به ایجاد الگویی از نوارهای روشن و تاریک می‌شود که برای هر جفت کروموزوم منحصربه‌فرد خواهد بود و کروموزوم‌ها را در ۲۴ کلاس متفاوت طبقه‌بندی می‌کند. تشخیص باندهای مختلف کروموزوم‌ها و جابجایی بین آن‌ها با این روش کاری دشوار و بسیار تخصصی است اما با روش FISH تفرق رنگ تشخیص را ساده کرده است.



شکل (۱): انواع شکست‌های کروموزومی (دی‌سانتریک وحلقه سانترمردار و قطعات فرگمنت) در لنفوسیت خون انسان در مرحله متافاز با رنگ‌آمیزی متداول گیمسا



شکل (۲): رنگ‌آمیزی کروموزوم‌های لنفوسیت انسان در مرحله متافاز با روش FISH چند رنگ

۶. روش سنجش ریزهسته (MN)

آنالیز ریزهسته یا میکرونوکلئوس (MN) از تکنیک‌های معتبر و استاندارد بیودزیمتری است[۱۴]. سلول‌ها در محیط کشت حاوی سیتوکلازین-B (که باعث بلوکه‌شدن مرحله‌ی سیتوکینز از تقسیم سلولی و تولید سلول‌های دوهسته‌ای می‌شود) کشت داده می‌شوند. سپس ریزهسته‌ها که یک تقسیم سلولی را پشت‌سر گذاشته‌اند شناسایی و به عنوان نشانگر آسیب‌های کروموزومی استفاده می‌شوند (شکل۳). MN ریزهسته‌ای است که از تقسیم هسته به‌وجود آمده است. این ریزهسته‌ها می‌توانند از قطعه‌های کروموزومی بدون سانترومر و یا کروموزوم کامل

www.SID.ir

Archive of SID

باشند که در مرحله آنافاز قادر به اتصال به دوک تقسیم نیستند، در نتیجه به هسته سلول دختر منتقل نمی‌شوند. این اجسام به شکل کروی بوده و به‌طور مشخص و مجزا از هم، قابل مشاهده هستند. دارای مورفولوژی و ویژگی‌های رنگ‌آمیزی مشابه هسته بوده و در درون سیتوپلاسم سلول‌های دو هسته‌ای دختری قرار می‌گیرند. وقوع MN در افراد تحت تأثیر عوامل مختلفی چون سن، جنس، نوع رژیم‌غذایی و سبک زندگی است. این قطعات در اثر عواملی مثل پرتوهای یونیزان نیز به‌وجود می‌آیند[۳-۱، ۱٤]. این روش برای پرتوگیری‌های کم و درازمدت از پرتوهای یونیزان مانند پرتوگیری شغلی از حساسیت بالایی برخوردار است. همچنین روش‌های خودکار بررسی ریزهسته‌ها به‌صورت تجاری موجود می‌باشد که شمارش آن را بسیار تسریع نموده است.

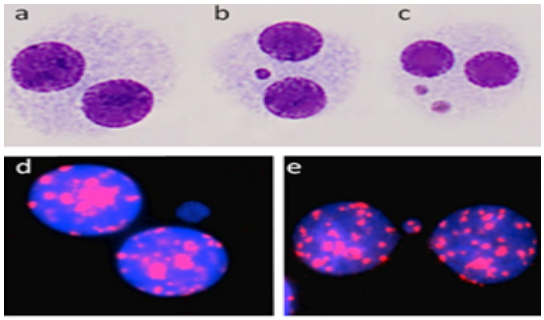
در سال‌های اخیر از روش فلوسایتومتری نیز برای آشکارسازی ریزهسته‌ها استفاده می‌شود. براساس تحقیقی در سال ۲۰۱٦، این روش به نحوی ارتقاء داده شده است که می‌توان پس از زمان ٤۸ ساعت کشت (به جای ۷۲ ساعت) و با استفاده از ۲۰۰ Lμ (به جای ۰/۵ ml) خون، با دقت Gy ۰/۵± تخمین دز نمود[۱۵]. بهبود این روش‌ها همچنان ادامه دارد به‌طوری‌که تلاش‌های اخیر برای استفاده از سیستم‌های اسکن تصاویر فلوسایتومتری منجر به ارتقاء این روش و خودکار شدن آن شده است.

با این حال از روش خودکار فقط در دزهای بالاتر از یک گری استفاده می‌شود، زیرا در موارد پرتوگیری با دزهای کمتر از یک گری هنوز از دقت و حساسیت لازم برخوردار نیست[۱٦].

۱.٦. مزایا و محدودیت‌های روش سنجش ریز هسته در تخمین دز بیولوژیکی

این روش دقیق و حساس است. در مواقعی که بررسی‌های متعدد و سرعت تخمین دز بیولوژیکی مدنظر باشد، مانند حوادث پرتوی جدی که منجربه پرتوگیری تعداد زیادی از افراد شود این روش اهمیت فراوانی پیدا می‌کند. تشخیص سریع و آسان شکست‌ها بدون نیاز به تجربه و مهارت خاص است، غربالگری با این روش اقتصادی است و امکان شمارش خودکار این روش با استفاده از نرم‌افزارهای مخصوص وجود دارد.

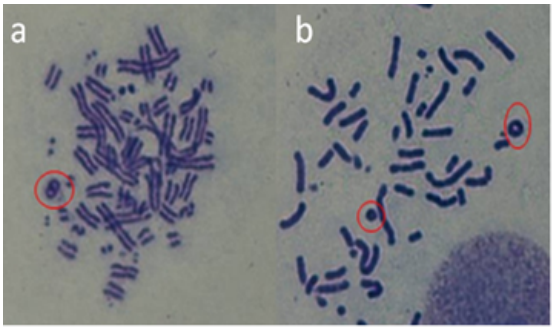
در گزارشات تکنیکی آژانس، روش میکرونوکلئوس به عنوان روش مناسب و جایگزین روش دی‌سانتریک معرفی شده است[۳-۱]. محدودیت‌های روش میکرونوکلئوس، زمان کشت طولانی (حداقل ۷۲ ساعت) است. حداقل دز قابل آشکارسازی ۰/۲ گری و بیشینه دز حداکثر ۵-٤ گری است (البته با ادغام آن باروش FISH حداقل دز قابل آشکارسازی به ۰/۱-۰/۰۵ گری کاهش می‌یابد.) امکان تخمین دز در پرتوگیری‌های مزمن را ندارد. تخمین دز به روش MN دارای محدودیت زمانی است. فراوانی حد زمینه در جمعیت پرتو ندیده متغیر و بالاست. وقوع MN ذاتاً پراکندگی بیش از حد دارد[۱٤].



شکل (۳): لنفوسیت دوهسته ای انسان با رنگ‌آمیزی متداول گیمسا: (a) نرمال، (b) با یک ریزهسته، (c) با دو ریزهسته و d) لنفوسیت دوهسته ای انسان بارنگ‌آمیزی FISH با یک ریزهسته بدون سانترومر و (e) با یک ریزهسته واجد دو سانترومر

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (٤): تراکم پیش رس کروموزومی: (a) سلول PCC درمرحله M/A با یک حلقه، (b) سلول PCC در مرحله G2 با دو حلقه

۷. روش تراکم پیش‌رس کروموزومی(PCC)

هنگامی‌که سلول‌های در گردش خون وارد تقسیم میتوز می‌شوند، کروماتین به اشکال کروموزومی متراکم می‌شود. روش‌هایی وجود دارند که قادرند در مواقعی که میتوز صورت نمی‌گیرد سبب تراکم کروماتین شوند که به این حالت تراکم پیش‌رس کروموزومی (PCC) می‌گویند. مطالعات نشان داده‌اند که دو روش متداول بررسی دی‌سانتریک و ریزهسته (MN) فقط هنگامی میسر است که لنفوسیت‌ها به مرحله میتوز از تقسیم سلولی می‌رسند (یعنی به ترتیب پس از ٤٨ ساعت و ٧٢ ساعت کشت) اما سلول‌هایی که به شدت آسیب دیدند به کندی رشد می‌کنند و ممکن است به مرحله تقسیم نرسند. اما در روش PCC تاخیر در تقسیم میتوز و مرگ سلولی در محیط کشت به دنبال پرتوگیری با دزهای بالا اثری ندارد.

تراکم پیش‌رس کروموزومی به دو روش امتزاج (فیوژن) و روش شیمیایی انجام می‌شود. تراکم پیش‌رس به کمک امتزاج سلول‌های انترفازی مانند لنفوسیت‌های G0 خون انسان با سلول‌های در حال تقسیم تخمدان همستر چینی (CHO) یا سلول‌های HeLa ، به‌وسیله مواد امتزاجی مانند ویروس سندایی یا پلی‌اتیلن گلیکول صورت می‌گیرد. روش PCC مشاهده مستقیم آسیب کروموزومی ناشی از پرتو را در لنفوسیت‌های انترفازی و تحریک نشده‌ی خون انسان میسر می‌سازد(شکل ٤). ثابت شده است که روش PCC، روش بسیار مفیدی برای تحقیق در زمینه‌ی فرآیندهایی که بلافاصله پس از پرتوگیری رخ می‌دهد، نحوه‌ی جبران شکست کروموزومی و / یا ترمیم ناقص که منجر به شکست‌ها (دی‌سانتریک‌ها و جابه‌جایی‌ها) می‌شود، است[۱۹-۱۷] .

استفاده از روش‌های شیمیائی القاء PCC با استفاده از مهارکننده‌های فسفریلاسیون DNA مانند اوکاداییک اسید یا کالیکولین A نیز توسعه یافته است. در اکثر این روش‌ها به سلول‌های در حال چرخه در کشت نیاز است[۳-۱، ۱۷]. در روش شیمیایی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول جدا شده و سلول‌ها به محیط کشت استاندارد لنفوسیت منتقل خواهند شد. ٢٤ ساعت پس از شروع کشت، کلسمید به محیط‌های کشت اضافه خواهد شد و ٤٧ ساعت پس از شروع کشت، کالیکولین A اضافه خواهد شد. در نهایت محصول‌برداری نمونه‌های کشت شده در ساعت ٤٨ انجام خواهد شد. شکست‌های کروموزومی در پخش‌های سلولی تهیه شده مورد بررسی قرار می گیرد. با استفاده از منحنی کالیبراسیون مناسب تخمین دز انجام می شود.

تشخیص یکنواخت بودن یا نبودن پرتوگیری جهت کمک به پزشک برای تصمیم‌گیری در مورد پیوند مغز استخوان یا درمان دارویی در حوادث پرتوی با دزهای بالا بسیار اساسی است و PCC تنها روشی است که قدرت تشخیص دزهای بالا و تفکیک پرتوگیری یکنواخت را از غیریکنواخت دارد و می‌تواند دز تمام یا بخشی از بدن را تخمین بزند.

در تحقیق اخیر در سال ۲۰۱۵ نشان داده شده است که در تریاژ حوادث پرتوی می‌توان از ادغام روش PCC با رنگ‌آمیزی FISH با استفاده از پروب‌های سانترومری[1] و پروب برای اسید نوکلئیک‌های پپتید تلومری (PNA[2])، به عنوان یک روش سریع تخمین دز استفاده کرد. در این روش که به آن سنجش کروموزوم‌های دی‌سانتریک با تراکم پیش

1-Pan Centromeric probe
2-Telomeric peptide nucleic acid probe

www.SID.ir

Archive of SID

رس (PCDC[3]) می‌گویند پتانسیل تخمین دز تنها ٦ ساعت پس از جمع‌آوری نمونه‌های خون فراهم می‌گردد [٦].

۱.۷. مزایا و محدودیت‌های روش بررسی تراکم پیش‌رس کروموزومی در دزیمتری بیولوژیکی

سرعت بالای تخمین میزان پرتوگیری در روش فیوژن (۵ تا ٦ ساعت پس از نمونه‌گیری)، تفکیک پرتوگیری تمام بدن و بخشی از بدن، تخمین دزهای فوق‌کشنده از جمله مزایای این روش و سختی روش فیوژن و گران‌بودن روش شیمیایی از جمله محدودیت‌های این روش هستند.

۸. روش‌های خودکار بررسی شکست‌های کروموزومی

دزیمتری بیولوژیکی براساس آنالیز کروموزومی (بررسی شکست‌های کروموزومی) یکی از روش‌های مهم پایش پرتوی و از برنامه‌های اصلی حفاظت در برابر پرتو کشورهای عضو آژانس محسوب می‌شود. بررسی شکست‌های کروموزومی به عنوان یک روش ارزشمند در تریاژ و تعیین دز در حوادث پرتوی و در تشخیص موارد پرتوگیری واقعی و مشکوک، مستمر و مزمن کاربرد دارد. این روش از پیچیدگی‌های ویژه‌ای برخوردار بوده و تخمین دقیق دز به‌وسیله آن نیازمند شمارش تعداد زیادی از سلول‌ها (متافازها) و تشخیص شکست‌های کروموزومی در آن‌ها می‌باشد که این فرآیندی بسیار زمان‌بر و نیازمند دقت فراوان است. به خصوص در مواردی از حوادث پرتوی که تعداد زیادی از افراد درگیر در حادثه باید مورد بررسی و شمارش شکست‌های کروموزومی قرار گیرند و یا در تشخیص پرتوگیری‌های با دز کم که نیازمند شمارش تعداد زیاد متافاز است، استفاده از سیستم‌های خودکار شناسایی و یافتن متافازها بسیار حائز اهمیت است و امروزه در آزمایشگاه‌های دزیمتری بیولوژیکی کاربرد رو به افزایشی یافته است. روش‌های خودکار بررسی کروموزوم‌ها شامل مراحل استخراج ویژگی‌ها، پیداکردن متافازهای قابل بررسی، طبقه‌بندی کروموزوم‌ها، جداسازی کروموزوم‌های روی هم افتاده یا بهم چسبیده و ارزیابی خودکار شکست‌های کروموزومی می‌باشد که تحول عظیمی را در مطالعات سیتوژنتیک به‌وجود آوردند. سیستم‌های اسکن تصویر میکروسکوپی با نام‌های MetaSystems، به‌صورت تجاری موجود می‌باشد. با وجود پیشرفت‌هایی که سیستم‌های کامپیوتری در بررسی کروموزوم در طی سه دهه‌ی گذشته داشتند اما با محدودیت‌های زیر مواجه هستند. اولین مورد این که دقت سیستم‌های فعلی به شدت متاثر از مراحل آماده‌سازی اسلاید و سیستم‌های عکس‌برداری می‌باشد. با ارتقا مراحل آماده‌سازی اسلاید، استفاده از میکروسکوپ با کیفیت اپتیکی مناسب و استفاده از دوربین‌هایی با وضوح و قدرت تفکیک‌پذیری بالا عملکرد سیستم بهبود می‌یابد. اگرچه سیستم و نرم‌افزارهای تجاری توسعه یافته‌اند، اما محصولات آن‌ها عمدتاً نیمه‌خودکار بوده است. از طرفی شناسایی متافازهای خوب گسترش یافته، دقت و سرعت سیستم‌های تجاری کنونی پاسخگوی تقاضای خدمات آزمایشگاهی بالینی نیست. در سیستم‌های تجاری رایج کنونی بعد از این که متافازهای با گسترش مناسب به صورت غیرخودکار شناسایی شد، سیستم‌های کامپیوتری تنها قادر به شناسایی بخشی از کروموزوم‌های دارای گسترش مطلوب می‌باشند و در نهایت این سیستم‌ها نیاز به تعامل با تکنسین ماهر برای بررسی نتایج دسته‌بندی، دارند.

۹. نرم‌افزار CABAS جهت تخمین دز بیولوژیکی

چندین نرم افزار جهت تخمین دز بیولوژیکی معرفی شده است که در بین آنها نرم افزار CABAS از قابلیت بالایی برخوردار است. نرم‌افزار CABAS جهت تطابق منحنی دز-پاسخ با

3-Prematurely condensed dicentric chromosome

www.SID.ir

Archive of SID

معادله خطی- درجه دو [۱] به روش حداکثر راست‌نمایی[۲] مورد استفاده قرار می‌گیرد. هدف از طراحی این نرم‌افزار، استفاده از آن در دزیمتری بیولوژیکی بر اساس بررسی شکست‌های کروموزومی از نوع کروموزوم‌های دوسانترومری و حلقوی، در اسلایدهای رنگ‌آمیزی شده با رنگ گیمسا می‌باشد. همچنین این نرم‌افزار جهت جابجایی‌های کروموزومی نیز مناسب است. البته، با این نرم افزار نمی‌توان میزان آسیب‌ها در کروموزوم‌های رنگ شده را به کل ژنوم نسبت داد. این نرم‌افزار قادر به محاسبه ضرایب معادله منحنی دز-پاسخ و تخمین دز با حدود اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد. سایر کاربردهای این نرم افزار به شرح ذیل می‌باشد:

جدول (۱): مقایسه روش‌های سیتوژنتیک در دزیمتری بیولوژیک

روش	زمان مناسب بکارگیری روش پس از پرتوگیری	سلول‌های مورد مطالعه	نوع پرتوگیری قابل آشکارسازی	محدوده آشکارسازی دز (گری)
آنالیز متافاز (دی سانتریک)	روزها تا هفته ها	لنفوسیتها	حاد تمام بدن یا بخشی از بدن	۰/۱-۵
ریز هسته میکرونوکلئوس	روزها تا هفته ها	لنفوسیتها	حاد تمام بدن	۰/۲۵-۵
تراکم پیش رس کروموزومی	ساعتها تا روزها	لنفوسیتها	حاد تمام بدن یا بخشی از بدن	۰/۱-۲۰
جابجایی کروموزومها	چند سال پس از پرتوگیری (گذشته نگر)	لنفوسیتها	حاد و مزمن تمام بدن	۰/۳-۵

- تعیین درصد بخش پرتو دیده بدن (در مواردی که فقط بخشی از بدن پرتوگیری کرده باشد که اصطلاحاً پرتوگیری موضعی نامیده می‌شود)[۳].
- تعیین حداقل تعداد سلول لازم جهت شمارش برای تعیین دز معینی از پرتو.
- تعیین عامل وابسته به زمان که با واژه"G-function" شناخته می‌شود، جهت تصحیح مقدار دز در پرتوگیری‌های بخش بخش.

1-Linear-quadratic
2-Maximum-likelihood method
3-Partial-Body Exposure

باید توجه نمود که از نرم‌افزار CABAS جهت مطابقت منحنی دز-پاسخ به‌دست آمده از پرتوهای با انتقال انرژی خطی پایین[۴] (همانند پرتوهای ایکس و گاما) در هنگامی که توزیع شکست‌ها به صورت پوآسون باشد استفاده می‌گردد. همچنین استفاده از این نرم‌افزار جهت مطابقت منحنی دز-پاسخ برای پرتوهای با انتقال انرژی خطی بالا (در جایی که توزیع شکست‌ها عموماً به صورت فوق پراکنده [۵] می‌باشد) امکان‌پذیر است. اما در این گونه پرتوگیری‌ها، محاسبه حدود اطمینان ۹۵ درصد شکست‌ها و دز با تخمین کمتر از واقع[۶] انجام می‌شود[۲۱-۲۰] .تحقیقات اخیر تحول عظیمی در استفاده هرچه دقیق‌تر از نرم‌افزارهای تخمین دز به‌وجود آورده است. یکی از نرم‌افزارهای دیگر تخمین دز بیولوژیکی نرم افزار R است که در سال ۲۰۱۵ به‌صورت بسته جدیدی تحت عنوان radir [۷] طراحی و معرفی شده است. این نرم افزار احتمال بروز حادثه را بر اساس اطلاعات موجود قبلی مانند عدم‌قطعیت[۸] آن شرح می‌دهد. این بسته جدید، تخمین دز را با فرض پوآسون بودن شکست‌های کروموزومی شمارش شده انجام می‌دهد و هدف آن معرفی متدولوژی جدید دزیمتری یا در نظرگرفتن بایاس[۹] آماری است[۲۲].

۱۰. مقایسه روش‌های سیتوژنتیک در دزیمتری بیولوژیکی

مقایسه روش‌های سیتوژنتیک در دزیمتری بیولوژیکی به طور خلاصه در جدول (۱) نشان داده شده است.

۱۱. نتیجه‌گیری

درحال حاضر روش دی‌سانتریک بهترین نشانگر بیولوژیکی و ابزار دزیمتری بیولوژیک در موارد پرتوگیری‌های اخیر به

4-Low LET Radiation
5-Overdispered
6-Underestimate
7-radiation inverse regression
8-Uncertainty
9-Bayesian-type dose estimation

www.SID.ir

Archive of SID

حساب می‌آید. بخشی از مشکل زمان‌بر بودن شمارش شکست‌ها در این روش با استفاده از سیستم‌های خودکار آنالیز شکست‌ها مرتفع شده است. اما مشکل تخمین دزهای کمتر از ۰/۱ گری همچنان باقی است. استفاده از روش FISH دزیمتری‌های گذشته‌نگر را ممکن می‌سازد اما تخمین دقیق دز به دلیل وابسته‌بودن حد زمینه آن به سن و شرایط زندگی افراد ازجمله استفاده از سیگار دشوار بوده و از طرف دیگر مواد و ابزار مورد نیاز آن بسیارگران‌قیمت هستند. در سال‌های اخیر روش ریزهسته به دلیل دقت و سهولت شمارش، کاربرد گسترده‌ای در ارزیابی دز در سوانح و همچنین در بیومونیتورینگ پرتوگیری‌های شغلی یافته است به‌خصوص آنکه تلفیق این روش با رنگ‌آمیزی FISH، حداقل آشکارسازی دز را به ۰/۰۵Gy کاهش داده است. اما تاثیر عواملی نظیر تفاوت‌های فردی، جنسیت، سن و سایر عوامل همچنان از محدودیت‌های این روش محسوب می‌شود. روش PCC امکان تخمین دز در دزهای بالا و تفرق بین پرتوگیری تمام بدن از بخشی از بدن را فراهم می‌کند اما روش فیوژن روش بسیار مشکل و روش شیمیایی گران‌قیمت می باشد. سایر نشانگرهای بیولوژیک شناخته شده مانند پروتئین H2AX، بیان ژن و سنجش Comet کاربردهای محدودی داشته و پروتئومیکس و متابولومیکس در مراحل تحقیق و توسعه هستند.

۱۲. مراجع

[1] IAEA. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. A Manual Technical reports series no. 405, Vienna, (2001).

[2] IAEA. Cytogenetic Dosimetry: Applications in Preparedness for and Responseto Radiation Emergencies, IAEA-EPR, Vienna, (2011).

[۳] ذاکری، فریده. بررسی های سیتوژنتیک در تعیین دز پرتو، تهران، اندیشه ظهور، (۱۳۸۳).

[٤] استاندارد ملی ایران، شماره ۸٦٦۲ ،حفاظت دربرابر پرتو – معیارهای کارایی برای آزمایشگاههای دزیمتری بیولوژیکی با استفاده از روشهای سیتوژنتیک، (۱۳۸۵).

[۵] استاندارد ملی ایران، شماره ۱۲۲۳۰، حفاظت در برابر پرتو معیارهای کارآیی آزمایشگاههای انجام دهنده تریاژ سیتوژنتیکی برای ارزیابی صدمات توده مردم در فوریتهای پرتوی و هسته ای، اصول کلی و کاربرد سنجش دی سانتریک، (۱۳۸۸).

[6] Y. Suto, T. Gotoh, T. Noda, M. Akiyama, M. Owaki, F. Darroudi, M. Hirai. Assessing the applicability of FISH-based prematurely condensed dicentric chromosome assay in triage biodosimetry. Health Phys.;108(3):371-6, (2015).

[7] Clinical Flow Cytometry, Emerging Applications, Ingrid Schmid, , ISBN 978-953-51-0575-6, 214 pages, Publisher: InTech, under CC BY 3.0 license. DOI: 10.5772/2680, (2012).

[8] L.A. Beaton, C. Ferrarotto, B.C. Kutzner, J.P. McNamee, P.V. Bellier, R.C. Wilkins. Analysis of chromosome damage for biodosimetry using imaging flow cytometry. Mutat Res.; 756(1-2), (2013). 192-195

[9] F. Darroudi. Use of FISH translocations analyses for retrospective biological dosimetry: How stable are stable chromosome aberrations?. Radiat. Prot. Dosim. 88, (2000). 101-109.

[10] J.N. Lucas, A. Awa, T. Straume, M. Poggensee, Y. Kodama, M. Nakano, K. Ohtaki, HU. Weier, D. Pinkel, J. Gray. Rapid translocation frequency analysis in humans decades after exposure to ionizing radiation. Int. J. Radiat. Biol. 62, (1992). 53-63.

[11] J.D. Tucker, WF. Morgan, A.A. Awa, M. Bauchinger, D. Blakey, M.N. Cornforth, L.G. Littlefield, A.T. Natarajan, C. Shasserre.et al. PAINT: A proposed nomenclature for structural aberrations detected by whole chromosome painting. Mutat. Res. 347 ,(1995). 21-24.

[12] J.R.K. Savage, P. Simpson. On the scoring of FISH painted chromosome exchange aberrations, Mutat. Res. 307, (1994). 345-353.

[13] I. Sorokine-Drum, C. Whitehouse , A.A. Edwards. The variability of translocation yields amongst control populations, Radiat. Prot. Dosimetry 88, (2000). 93-99.

[14] H. Thierens, A. Vral. The micronucleus assay in radiation accidents. Ann Ist Super Sanita, (2009) 260–264.

[15] M.A. Rodrigues, L.A. Beaton-Green, R.C..Wilkins, Validation of the Cytokinesis-block Micronucleus Assay Using Imaging Flow Cytometry for High Throughput Radiation Biodosimetry. Health Phys, 110(1), (2016).29-36.

www.SID.ir

Archive of SID

[16] M.A. Rodrigues, L.A. Beaton-Green, B.C. Kutzner. Automated analysis of the cytokinesis-block micronucleus assay for radiation biodosimetry using imaging flow cytometry. Radiat Environ Biophys.; 53(2), (2014). 273-282.

[17] G.E. Pantelias, H.D. Maillie. The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. Radiat. Res, (1984). 140-150.

[18] R.C. Vyas, F. Darroudi, A.T. Natarajan. Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes. Mutat. Res, (1991). 29-35.

[19] F. Darroudi. Detection of total and partial body irradiation in a monkey model : A comparative study ofchromosomal aberration, micronuclei and premature chromosome condensation assays. Int. J. Radiat. Biol, (1998). 207-215.

[20] M. Szluinska, A. Edwards, D. Lloyd. Presenting statistical uncertainty on cytogenetic doseestimates.Radiat. Prot.Dosim, (2007). 443-449.

[21] J. Deperas, M. Szluinska ,M. Deperas-Kaminska, A. Edwards, D. Lloyd, C. Lindholm, et.al. A freely available PC program for fitting calibration curves in chromosome aberration dosimetry. Radiat. Prot. Dosim, (2007). 115-123.

[22] D. Moriña, M. Higueras, P. Puig, E. A. Ainsbury and K. Rothkamm, radir package: an R implementation for cytogenetic biodosimetry dose estimation, Journal of Radiological Protection, V. 35, No.3, (2015). 557-569

www.SID.ir