

مرگ اینترفازی در سلولهای تخمدان همستر چینی بعد از پرتودهی با یونهای سنگین شتاب یافته

پریناز محنتی

استادیار گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۶/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۱۲/۱

چکیده

مقدمه: ذرات باردار سنگین شامل هسته های عناصری مانند آهن، آرگون، کربن و نئون هستند که همگی بار الکتریکی مثبت دارند. برای مفید بودن این ذرات در پرتودرمانی باید تا انرژی های چندین هزار میلیون ولت شتاب داده شوند. همچنین فضای کیهانی متشکل از فوتونهایی با انرژی بالا و ذرات تشعشعی است که تهدیدی برای فضا نوردان در ماموریت‌های طولانی فضایی بشمار میرود. بنابراین بررسی اثرات بیولوژیکی این پرتوها حائز اهمیت است.

مواد و روشها: در این تحقیق وقوع مرگ اینترفازی در سلولهای همستر چینی بعد از پرتودهی با یونهای شتاب یافته کربن، نئون، آرگون و آهن با مقادیر مختلف انتقال خطی انرژی از ۱۰ الی ۲۰۰۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر مورد بررسی قرار گرفت. دو روش جهت بررسی مرگ اینترفازی بکار گرفته شده است. روش مستقیم توسط عکس برداری دوره ای و با توجه به زمان و چگونگی تقسیم سلولی برای هر سلول بطور جداگانه مشاهده و ثبت می گردد. در روش غیر مستقیم با استفاده از کافئین توانستیم سلولهایی را که دچار مرگ اینترفازی بودند، سریعتر شناسایی کنیم.

نتایج: منحنی سلولهای پرتودیده با ایکس در مرگ اینترفازی بصورت خطی با افزایش آهنگ دز پرتوی افزایش می یابد ولی منحنی دارای آستانه یا شانه اولیه در ناحیه ۱۰ گری می باشد. در حالیکه در مورد پرتو یونهای سنگین شتاب یافته با انتقال انرژی بالا منحنی دارای شانه اولیه ای نبوده و با افزایش دز پرتوی احتمال مرگ سلولی نیز افزایش می یابد. محدوده تغییرات مقدار انرژی برای ایجاد حداکثر اثر بیولوژیکی نسبی در مورد مرگ اینترفازی از ۱۲۰ الی ۲۳۰ الکترون ولت بر میکرومتر است. همچنین احتمال بروز مرگ سلولی در سطح هدف سلولهای تخمدان همستر چینی برای یونهای سنگین در حدود ۰/۰۴ الی ۰/۰۸ محاسبه گردید.

بحث و نتیجه گیری: افزایش انتقال خطی انرژی موجب افزایش اثر بیولوژیکی نسبی خواهد بود و در ۵۰ درصد از موارد پرتو دهی با یونهای سنگین در انرژی ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر اثر بیولوژیکی نسبی به میزان حداکثر می رسد ولی بعد از آن با افزایش انرژی مقدار اثر بیولوژیکی نسبی کاهش می یابد. محدوده تغییرات مقدار انرژی برای ایجاد حداکثر اثر بیولوژیکی نسبی در مورد مرگ اینترفازی کمتر از مرگ میتوزی است. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۴، شماره ۱۴، ۱۴۰۱، بهار و تابستان ۸۶: ۸۱-۷۱)

واژگان کلیدی: مرگ اینترفازی، یونهای سنگین شتاب یافته، سلولهای تخمدان همستر چینی

* نویسنده مسؤول: پریناز محنتی

آدرس: گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
parinazmehnaty@yahoo.com

تلفن: +۹۸ (۴۱۱) ۳۳۶۴۶۶۰

۱- مقدمه

ذرات باردار سنگین مانند آهن، آرگون، کربن و نئون همگی بار الکتریکی مثبت دارند که هسته آنها فاقد تعداد یا تمامی الکترونهاست. برای مفید بودن این ذرات در پرتودرمانی باید تا انرژی های چندین هزار میلیون ولت شتاب داده شوند. همچنین فضای کیهانی متشکل از فوتونهایی با انرژی بالا و ذرات تشعشعی است که این ذرات شامل هسته اتم هایی است که توزیع یونها در آنها بصورت فشرده بوده و یکنواخت نیست. حضور ذرات باردار با انرژی بسیار بالا در فضا تهدیدی برای فضا نوردان در ماموریت های طولانی و فضایی مانند سفر به مریخ محسوب می گردد

انتقال خطی انرژی (LET)^۱ به انرژی واگذار شده در واحد طول مسیر اطلاق و با واحد کیلو الکترون ولت بر میکرومتر (KeV/μm) سنجیده می شود. اثر بیولوژیکی نسبی (RBE)^۲ برای بیان تفاوت در اثر گذاری بیولوژیکی پرتوهای متفاوت با دزهای یکسان استفاده می شود. تحقیقات با پرتوهای یونیزان نشان می دهند که وقوع مرگ سلولی در سلولهای پرتودیده بستگی به میزان LET پرتوها دارد. بدین صورت که میزان اثر بیولوژیکی نسبی همزمان با افزایش LET افزوده شده و در ۱۰۰ الی ۲۰۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر به میزان حداکثر می رسد [۱،۲]. از دست دادن توانایی تشکیل کلنی در مطالعات رادیوبیولوژیکی به عنوان نشانه مرگ سلولی در بیشتر تحقیقات اشاره شده است. زمانیکه سلولها با پرتوهایی مانند اشعه ایکس و گاما که دارای LET پایین هستند تحت پرتو تابی قرار گیرند. در مقادیر دزهای کمتر از ۱۰ گری مرگ سلولی بعد از چندین و حداقل یکبار تقسیم سلولی اتفاق می افتد که بنام مرگ میتوزی نامیده می شود. ولی در مورد پرتوهایی با LET بالا مانند یونهای

سنگین شتاب یافته از آنجائیکه این یونها در هر برخورد با ماده توانایی واگذاری مقدار قابل ملاحظه ای از انرژی را در محل برخورد را دارند [۲،۳] می توانند در محل برخورد بصورت موضعی صدمات متعددی را در ناحیه و در مولکول هدف بوجود آورند [۴]. این اثرات در مجموع موجب می گردد که سلول قبل از اینکه توانایی و یا فرصت تقسیم سلولی را داشته باشد فاکتورهای دخیل در آغاز مرگ سلولی تحریک و سلول به مرحله مرگ ایتترفازی یا مرگ بدون تقسیم سلولی وارد شود [۵]. احتمال وقوع مرگ ایتترفازی در مقایسه برای پرتوهایی با LET بالا بیشتر است. در یکی از بررسی های قبلی ما که با روش عکس برداری دوره ای انجام شده بود مشخص گردید که پرتوهای α نیز که جزو پرتوهایی با LET بالا هستند حتی با مقادیر دزهای پایین در حدود یک الی دو گری نیز می توانند موجب مرگ ایتترفازی در سلولهای هیلا گردند [۶ و ۷]. مرگ از نوع آپوپتوزی و تاخیر در چرخه سلولی در فاز G₂ بر روی سلولهای لنفوما تحت تاثیر پرتوهای α ناشی از بیسموت ۲۱۲ نیز گزارش شده است [۸].

تازگی تحقیق حاضر بدین علت است که وابستگی میان انتقال خطی انرژی و توانایی ایجاد مرگ سلولی بطور اختصاصی بررسی نموده است. مرگ سلولی از نوع ایتترفازی بعنوان مقیاس انتخاب و جزئیات رابطه بین افزایش انرژی و وقوع مرگ سلولی در یونهای سنگین شتاب یافته با LET متفاوت از ده الی دو هزار کیلو الکترون ولت بر میکرومتر مشاهده و محاسبه گردید. همچنین محدوده منطقه هدف جهت وقوع مرگ ایتترفازی و مرگ میتوزی مقایسه و نشان دادیم طبق محاسبه از لحاظ کمی این دو محدوده متفاوت بوند.

1- LET: Linear Energy Transfer

2- RBE: Relative Biological Effectiveness

۳۵ میلی متری عکس برداری می کرد، بخشی از سلولهایی که دچار مرگ اینترفازی شده بودند را با توجه به تغییرات ظاهری سلول بعد از آنالیز تصاویر ثبت شده مشخص گردیدند که این طریقه بررسی بنام روش مستقیم نامیده شد. بیشتر سلولها بجز سلولهایی که از فاز G_2 عبور کرده بودند. تاخیر در چرخه سلولی در فاز G_2 را نشان دادند. سلولهایی که تاخیر در این فاز از چرخه سلولی را داشتند دو دسته بودند دسته اول بعد از این تاخیر به چرخه سلولی ادامه داده و وارد فاز میتوز گردیده و تقسیم شدند. دسته دوم که دچار مرگ اینترفازی شده بودند بدون اینکه تقسیم سلولی داشته باشند از بین رفتند. بر اساس مشاهدات حاصل از روش عکس برداری دوره ای بیشتر سلولها در طول ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی شروع به تقسیم سلولی نمودند در حالیکه در سلولهایی که گرفتار مرگ اینترفازی شدند این زمان طولانی تر از ۲۴ ساعت بوده است.

در این تحقیق از کافئین بعلاوه اثر بخشی بر روی فاز G_2 بصورت اثر منفی یا بازدارنده [۱۱] استفاده شده است. به محیط کشت سلولها ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی ۱۰ میلی مول کافئین اضافه گردید تا سلولهایی که هنوز در فاز تاخیری G_2 بودند سریعاً وارد فاز میتوز گردند. سلولها به شکل دایره ای و گرد در آمدند این تغییر شبیه به شکل ظاهری سلول هایی بود که وارد میتوز می شدند ولی بدنال این تغییر تغییرات ظاهری شبیه به مرگ آپوپتوزی مانند پیکره آپوپتوزی و هسته تکه تکه شده در سلولها مشاهده گردید. سلولهایی که گرفتار مرگ اینترفازی بودند با شکل ظاهری کاملاً گرد در طول یک ساعت بعد از اضافه نمودن کافئین در سلولها ی پرتو دیده مشخص گردیدند. اثرات سمی کافئین بر روی روند تقسیم سلولی قابل اغماض است چون در سلولهایی که حتی ۳ ساعت در معرض کافئین بودند تغییرات قابل ملاحظه ای در درصد تقسیم و رشد سلولی مشاهده نگردید.

۲- مواد و روشها

۲-۱- سلول و پرتو دهی

در این تحقیق سلول کاربردی سلولهای تخمدان همسترچینی با نام CHO-K₁ از بانک سلولی ریکن ژاپن خریداری گردیده و در محیط کشت سلولی Ham's F12 به همراه ده درصد از سرم فیزیولوژیک جنین گاوی (FCS) کشت داده شده اند. سلولها بطور تصادفی و در حد رشد مطلوب انتخاب و در داخل فلاسک پلاستیکی مخصوص کشت سلولی (Nanc T25) قرار گرفتند. برای پرتو دهی از پرتوهایی با LET پایین پرتو ایکس (۲۵۰ کیلو ولت) با دز خروجی ۲ گری در دقیقه و پرتوهایی با LET بالا از یونهای سنگین تک انرژی با دز خروجی ۵ گری در دقیقه پرتو دهی انتخاب گردیدند. یونها کرین با انرژی ۱۳۵ و ۲۹۰ مگا الکترون ولت توسط شتاب دهنده مرکز انستیتو بین المللی علوم رادیولوژی ژاپن و برای یونهای نئون با انرژی ۹۵ و ۱۳۵ و آرگون با انرژی ۹۰ مگا الکترون ولت از مرکز انستیتو فیزیک و شیمی ژاپن توسط شتاب دهنده حلقه ای استفاده گردید. جزئیات مربوط به خروج پرتوها و دزیمتری آنها قبلاً توسط محققین اندازه گیری و محاسبه شده است. یونهای سنگین توسط لرزاننده مغناطیسی منتشر و پخش می شوند و همچنین پخش کننده جهت تولید میدان تشعشعی یکنواخت استفاده می شود [۹، ۱۰].

۲-۲- بررسی نسبت سلولها با مرگ اینترفازی

سلولها تا ۳ روز بعد از پرتو دهی با پرتو ایکس و یا یونهای سنگین از نظر تغییرات و صدمات سلولی توسط روش عکس برداری دوره ای تحت بررسی قرار گرفتند. سلولها در داخل فلاسک سلولی در فضای داخل جعبه پلاستیک مخصوص و قابل رویت با قابلیت تنظیم شرایط محیطی به ۳۷ درجه سانتیگراد و هوای ۹۵ درصد به همراه ۵ درصد دی اکسیدکربن جایگزین شدند. با اتصال جعبه به یک میکروسکوپ با موتور اتوماتیک نیکن (Nikon) که هر ۳۰ دقیقه یکبار توسط فیلم

۲-۳- اثر پرتوها بر روی رشته های DNA

صدمات وارده به DNA سلولهای پرتو دیده بصورت بررسی قطعات شکسته شده DNA با روش ژل آگارز انجام شد. نمونه مورد نظر در داخل ژل تحت اختلاف پتانسیل مناسب داخل دستگاه الکترو فورز بحرکت در می آید [۱۲]. تعداد $10^6 \times 5$ سلول بعد از پرتو دهی با محلول بافر مخلوط و بخشی پروتئینی DNA سلولی با اضافه نمودن فنل حذف و در مرحله بعدی حذف RNA سلولی انجام گردید. بعد از الکتروفورز قطعات DNA نمونه مورد نظر بر اساس وزن مولکولی ته نشین گردید. برای رنگ آمیزی از اتیدیوم برومید استفاده شد. همچنین از یک DNA مارکر استاندارد برای جداسازی قطعات DNA استفاده می شود.

روش دیگری با استفاده از دستگاه فلوسیتومتری بود. با توجه به اینکه قطعات DNA در سلولهای صدمه دیده دارای وزن مولکولی کمتری بودند و از این لحاظ قابل شناسایی هستند. بعد از مرحله تثبیت سلولی توسط اتانول جهت رنگ آمیزی از پروپیدیوم آبودین در این روش استفاده گردیده است [۱۳]. میزان پراکندگی قطعات DNA توسط دستگاه فلوسیتومتری و با استفاده از نرم افزار (Cell quest) آنالیز گردیده و بصورت منحنی نمایش داده شد.

لازم به ذکر است قسمت پرتو دهی و تصویرگیری آزمایش در مرکز تحقیقات ریکن ژاپن انجام و مرحله آنالیز تصاویر و محاسبات در دانشگاه علوم پزشکی تبریز توسط نویسنده صورت گرفته است.

۲-۴- رابطه بین اثر بیولوژیکی نسبی و ناحیه حساس

میزان اثر بیولوژیکی نسبی در سلولهای پرتو دیده با پرتوهای ایکس با بررسی نسبت آسیب ۵۰ درصدی که منجر به مرگ ایتترفازی در اثر پرتوهاست مشخص می گردد. ناحیه حساس یا هدف (σ) و محاسبه مقدار عددی این ناحیه هنگام وقوع مرگ ایتترفازی بدین صورت می باشد [۱۴].

$$\sigma (\mu\text{m}^2) = 1/F_{37} = 0.16 \times \text{LET} (\text{KeV}/\mu\text{m}) / D_{37} (\text{Gy})$$

مقدار F_{37} اشاره دارد به تعداد فوتون پرتو برخوردی در یک سطح به مساحت یک متر مربع. مقدار D_{37} مقدار دز مورد نیاز برای کاهش نسبت بقای سلولهای زنده تا ۳۷ درصد تعریف شده است و از روی منحنی پاسخ دزخطی قابل محاسبه است.

۳- نتایج

۳-۱- عکس برداری دوره ای جهت بررسی مرگ

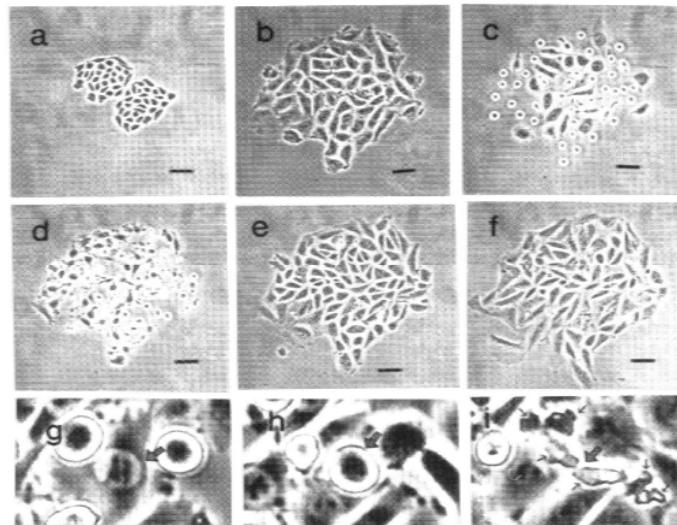
ایتترفازی

مراحل وقوع مرگ ایتترفازی ۳ روز بعد از پرتو دهی با روش عکس برداری دوره ای بررسی شد (شکل ۱) سلولهایی که در آنها مرگ ایتترفازی رخ داده است قبل از میتوز یک تاخیر سلولی بالا، بیش از ۲۴ ساعت را نشان می دهند و بعد به سلولهای غول پیکر تبدیل می شوند که در بخش a, b نشان داده شده است. تغییرات ظاهری در سلولها که تحت بررسی میکروسکوپی با روش عکس برداری دوره ای قرار داشتند ابتدا تغییر شکل سلول از حالت پهن و کشیده به حالت دایره ای و گرد دیده شد. تغییری در حالت دایره ای شکل سلول هنگام اضافه نمودن کافئین و یا در سلولهایی بدون ماده کافئین مشاهده گردید. این تغییر شکل مشابه با تغییر شکل در هنگام عبور سلولها از مرحله G_2 به فاز میتوز (تقسیم سلولی) می باشد. (بخش b, c, g, h).

بعد از تغییر شکل ظاهری سلولها و پیدایش سلولهای گرد برای یک الی دو ساعت، بعضی از این سلولها به صورت متعدد تقسیم می شوند مانند تقسیم به بیش از سه قسمتی و شروع به تکه تکه شدن می کنند (بخش d, i) گاه بعضی از آنها بعد از یک الی سه ساعت به هم پیوسته و سلولهای غول پیکری را بوجود می آورند که دارای هسته های کوچک و متعدد هستند (بخش e, f) سلولهایی که دارای هسته های متعدد هستند بتدریج بعد از سپری شدن زمان طولانی بیش از

دچار مرگ اینترفازی بودند همانطور که تغییر در شکل ظاهری آنها بعد از اضافه نمودن کافئین در ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی مشاهده می گردید. در مجموع اضافه نمودن کافئین جهت آشکار سازی و اندازه گیری آن دسته از سلولهایی که گرفتار مرگ اینترفازی شدند روش خوبی است.

۱۰ ساعت متلاشی می شوند. (توجه به باقیمانده سلولهای روی هم پاشیده در بخش f). در سلولهایی که کافئین به آنها اضافه شده است سلولها در زمان کوتاهتری (حدود یک ساعت) وارد مرگ اینترفازی می شوند (بخش b, c). در این روش ما توانستیم سلولهایی را مشخص کنیم که به طور یقین

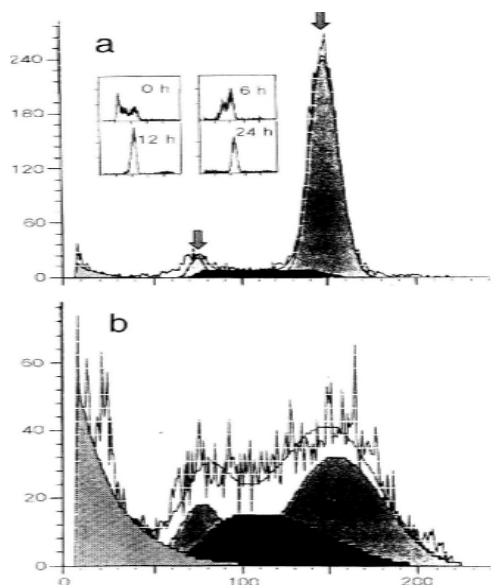


شکل ۱- تصاویر مربوط به عکس برداری دوره ای با یونهای نئون با LET معادل ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر را نشان میدهد. قسمت a: سلولها قبل از پرتو دهی، قسمت b: سلولهای قسمت a ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی، قسمت c تا f: سلولهای قسمت b بعد از اضافه نمودن کافئین با زمانهای متفاوت، قسمت c: یک ساعت بعد، قسمت d: دو ساعت بعد، قسمت e: ۵ ساعت بعد، قسمت f: ۱۲ ساعت بعد، قسمت g تا i: قطعات سلولها و سلولهای گرد و دایره ای شکل را با بزرگنمایی مربوط به ۳۰ ساعت بعد از پرتو دهی با ۵ گری از نئون می باشد. سلولهایی با تاخیر چرخه سلولی (قسمت g) بصورت دایره ای شکل (قسمت h) نمایش داده اند. در قسمت i توسط فلش های کوچک سلول قطعه قطعه شده به ۶ تکه مشهود است.

DNA شاید به همراه اضافه نمودن کافئین به محیط موجب تغییراتی در سلولها می گردد و همچنین ارتباط مرگ اینترفازی و آپوپتوزی را بیان می کند. برخی سلولهای حاوی قطعات DNA توسط فلوسیتومتری در ۲۴ و ۴۰ ساعت بعد از پرتو دهی با ۱۰ گری از یونهای نئون بدون حضور کافئین مشخص گردیدند. در شکل ۳ توزیع DNA سلولها نشان داده شده است. بیشتر سلولها در فاز G₂ در ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی قابل مشاهده هستند (بخش a) و تعدادی از این سلولها که حاوی DNA با قطعات متعدد هستند با افزایش ۱۶ ساعتی در زمان بعد از پرتو دهی (در

۲-۳- قطعات DNA همراه با مرگ اینترفازی

قطعات DNA توسط ژل آگارز الکتروفورز از سلولهایی که تحت پرتو دهی ۳۰ گری از اشعه ایکس و یا ۱۰ گری از یونهای نئون با LET برابر با ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر جداسازی گردیدند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده DNA سلولهای پرتو دیده که کافئین در حدود ۳ ساعت به محیط آنها اضافه شده است به قطعات متعدد الیگونوکلوئوزومال تبدیل شده اند (ردیف ۴ و ۶ از a و ردیف ۲ از b) ولی تعدادی از قطعات بطور قابل ملاحظه ای بزرگتر از مشاهدات انجام شده در این مورد بوده است (ردیف ۴ از بخش b). این نتایج احتمال اینکه تشکیل قطعات



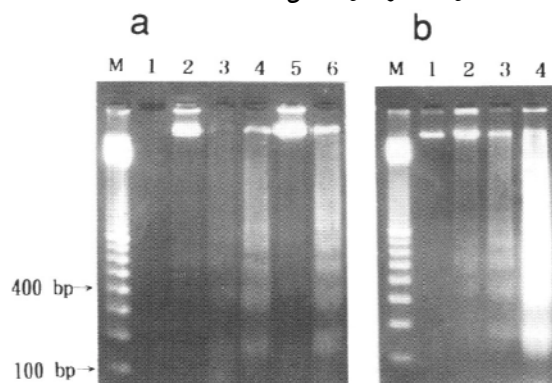
شکل ۳- سلولهای آپوتوزی بعد از پرتو دهی با یونهای نئون ۱۰ گری با LET معادل ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر. قسمت a: توزیع DNA سلولی از ساعات اولیه تا ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی. قسمت b: توزیع DNA سلولی ۴۰ ساعت بعد از پرتو دهی، فلش ها قله فاز های G1 و G2 را نشان می دهند. قسمت تاریک مربوط به سلولهای فاز S است. سلولهای آپوتوزی با خطوط پر شده مشخص اند جائیکه DNA سلولی هایپودیپلوئید بوده و در ناحیه پایین تر از G1 قرار دارد.

۳-۳- رابطه بین دز پرتوی و مرگ اینترفازی

منحنی دز پرتوی و احتمال مرگ اینترفازی با روش مستقیم (استفاده از عکس برداری دوره ای) و همچنین با روش غیر مستقیم (استفاده از کافئین) مقایسه شده است. منحنی پاسخ دز پرتوی در روش مستقیم و غیرمستقیم در دزهای بالای ۱۰ گری برای یونهای نئون با LET برابر با ۲۳۰ کیلو الکترون ولت و بالاتر از ۳۰ گری برای پرتوهای ایکس رسم شده است ولی در صورت افزایش مقادیر دز شکل منحنی در هر دو روش بطور قابل ملاحظه ای متفاوت خواهد بود (شکل ۴).

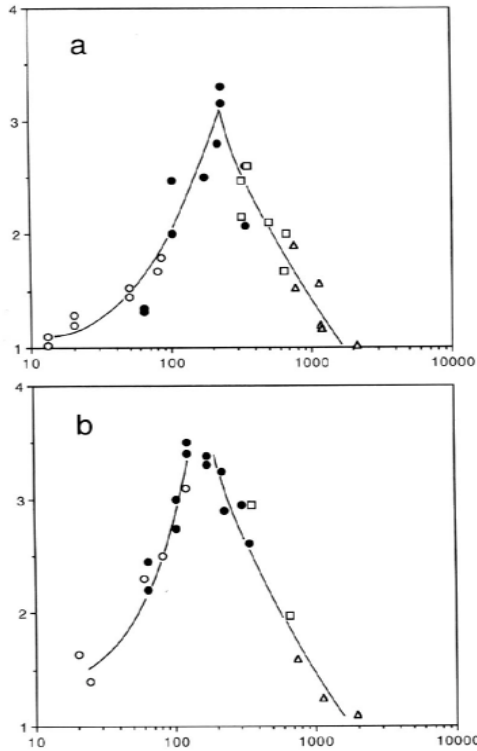
مجموع به ۴۰ ساعت) افزایش می یابد و DNA آنها بصورت هایپودیپلوئید است (بخش b).

افزایش جمعیت سلولهایی که حاوی قطعات DNA در ۴۰ - ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی بودند موجب افزایش تعداد سلولهایی شد که حاوی هسته های متعدد بوده و بدنبال آن آغاز مرحله ای که منجر به مرگ اینترفازی می گردد. (همانطور با عکس برداری دوره ای مشاهده گردید) این نتایج نشان می دهند که سلولهایی که سرنوشت مرگ اینترفازی دارند ابتدا در فاز G2 چرخه سلولی دچار تاخیر در تقسیم سلولی می شوند. بدنبال تاخیر چرخه سلولی شروع مرگ اینترفازی که با DNA قطعه قطعه شده سلولها همراه بوده قابل مشاهده اند.



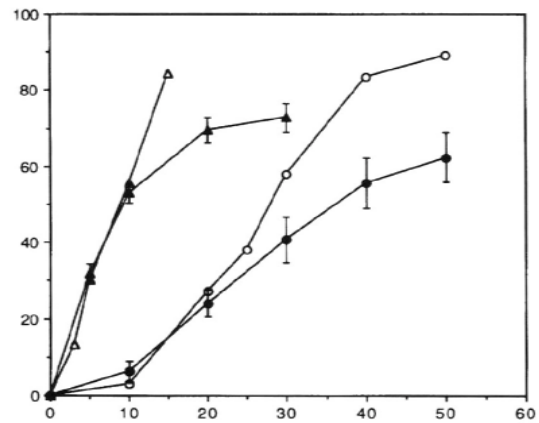
شکل ۴- الکتروفورز DNA سلولهای پرتو دیده با اشعه ایکس ۳۰ گری و یونهای نئون ۱۰ گری با LET معادل ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر. در قسمت a, b ناحیه M مربوط به مارکر DNA با قدرت شناسایی تا ۱۰۰ bp. قسمت a, ردیف ۱: سلولهای بدون پرتو دهی با کافئین بمدت ۳ ساعت، ردیف ۲: سلولها ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی با اشعه ایکس، ردیف ۳: سلولهای ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی به همراه کافئین بمدت یک ساعت، ردیف ۴: بمدت سه ساعت، ردیف ۵: سلولها بعد از ۲۴ ساعت پرتو دهی با یونهای نئون، ردیف ۶: به همراه کافئین بمدت سه ساعت، قسمت b, ردیف ۱: سلولهای پرتو ندیده، ردیف ۲: سلولها ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی با یونهای نئون، ردیف ۳: سلولهای ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی به همراه کافئین بمدت سه ساعت، ردیف ۴: سلولها ۴۰ ساعت بعد از پرتو دهی با نئون.

رابطه بین LET پرتوی و اثر بیولوژیکی نسبی هنگام بروز مرگ میتوزی (۹۰ درصد سلولها کشته و ۱۰ درصد زنده) در پرتوهای ایکس و یونهای سنگین مقایسه شده است.



شکل ۵- رابطه بین LET یونهای سنگین و RBE موثر در مرگ سلولی ایترفازی و میتوزی. قسمت a: مربوط به مرگ ایترفازی، قسمت b: مربوط به مرگ میتوزی است. یونهای کربن (○)، یونهای نئون (●)، یونهای آرگون (□)، یونهای آهن (Δ) مشخص شده است.

در شکل ۶ رابطه بین سطح هدف یا ناحیه حساس با LET پرتوهای برخوردی نشان داده شده است که روش محاسبه آنها در قسمت مواد و روشها بیان شد. شکل منحنی نشان می دهد که در LET پرتوی بیش از ۳۰۰ کیلو الکترون ولت یک ناحیه مسطح بوجود می آید که در ناحیه هدف به اندازه ۵ الی ۱۰ میکرومتر مربع خواهد بود. این مقدار محاسبه شده در مقایسه با اندازه هسته سلولی ۱۳۰ میکرومتر مربع سطح خیلی کوچکی است. بنابراین می توان نتیجه گرفت که عبور یا



شکل ۴- رابطه آهنگ دز و مرگ ایترفازی در سلولهای پرتودیده با اشعه ایکس و یونهای نئون. منحنی دز اشعه ایکس در روش مستقیم (○) و با روش غیر مستقیم (●) نشان داده شده است. منحنی پاسخ دز در یونهای سنگین نئون در روش مستقیم (Δ) و روش غیر مستقیم (▲) مشخص است. در روش غیر مستقیم میزان انحراف استاندارد برای سه بار آزمایش رسم شده است.

دلیل این تفاوت ممکن است بدین صورت بیان شود که بعضی از جمعیت‌های سلولی مانند آنهایی که در فاز G₁ بودند زمانیکه تحت پرتودهی قرار گرفتند بروز تاخیر در پیشرفت چرخه سلولی آنها موجب طولانی تر شدن زمان چرخه گردیده است (به علت وجود گیرنده های حساس به صدمات سلولی در فاز G₁). بنابراین مدت زمان طولانی تری (بیش از ۲۴ ساعت) نیاز داشتند تا به فاز G₂ برسند. لذا این سلولها در مقایسه با زمانیکه از کافئین جهت ردیابی مرگ ایترفازی استفاده شده بود مدت زمان طولانی تری را صرف رسیدن به فاز G₂ نمودند.

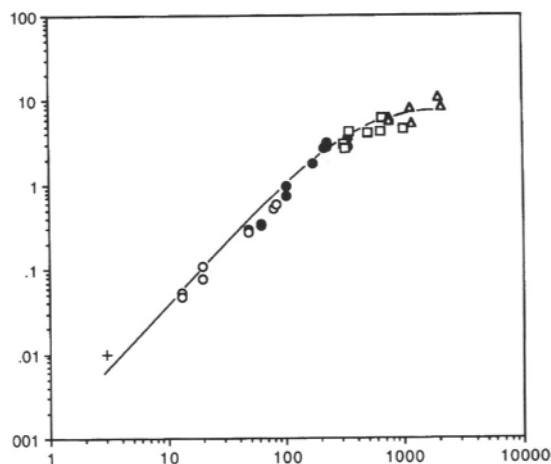
۳-۴- رابطه بین LET پرتوها و اثر بیولوژیکی نسبی (RBE)

اثر بیولوژیکی نسبی در پرتوهای X و یونهای سنگین هنگام بروز مرگ ایترفازی در این منحنی مقایسه شده است. شکل ۵ بخش a رابطه بین LET پرتوها و اثر بیولوژیکی نسبی را نشان می دهد. میزان اثر بیولوژیکی نسبی با افزایش LET افزایش می یابد و در LET حدود ۲۳۰ کیلو الکترون ولت به میزان حداکثر رسیده و بعد از آن با افزایش LET مقدار آن کاهش می یابد که در اینجا از دست دادن توانایی تشکیل کلنی بعنوان نشانه مرگ سلولی است. همچنین

هنگام پرتودهی سلولها و ناحیه هدف انجام شده در یک ناحیه مشخص و معین وجود صدمات متعدد را بیان می سازد [۴ و ۳].

صدمات سلولی در برخورد یونها با سلولها در محل بازوی DNA و عبور یونهای سنگین با LET بالا که قادرند مقادیر زیادی از انرژی خود را در هنگام عبور در محل برخورد واگذار نمایند بوجود می آیند. بنابراین پرتودهی در پرتوهایی با LET بالا در هنگام بروز صدمات DNA با شکست های دو گانه بعلت تعدد صدمات و مناطق آسیب دیده در بازوهای DNA انجام ترمیم در صدمات و آسیبهای بعید و قابل تردید است. در حقیقت خصوصیات فیزیکی و ذاتی پرتوهایی با LET بالا مانند یونهای سنگین موجب شده است که میزان ترمیم سلولی حتی در مورد صدماتی که در شرایط خاص قابل ترمیم هستند نیز قابل تردید باشد [۱۸ و ۱۹]. مطالعات خیلی کمی در مورد جزئیات مکانیسم مرگ سلولی در سلولهایی که دچار صدمات متعدد هستند انجام گرفته است بطور کلی مرگ سلولی در سلولهای پرتو داده شده اگر بعد از چندین تقسیم و یا حداقل یک بار تقسیم سلولی بعد از پرتو گیری باشد بنام مرگ میتوزی و اگر بدون هیچ تقسیم سلولی بعد از پرتو دهی باشد بنام مرگ ایتترفازی می باشد [۲۰]. در شکل ۴ نشان دادیم که دز پرتوی بیش از ۱۰ گری جهت ایجاد مرگ ایتترفازی در سلولهای CHO که تحت تاثیر پرتوهای ایکس بعنوان پرتوهایی با LET پایین قرار گرفتند لازم است. بنابراین فاکتور کاهش قابلیت ترمیم در سلولها با پرتو دهی LET بالا در مقایسه با LET پایین با تغییر در آهنگ دز می تواند نتایج تشکیل کلنی و یا بقای سلولی مشابهی را نشان دهد. احتمال اینکه شکل و نوع صدمات ایجاد شده در دو نوع مرگ ایتترفازی و مرگ میتوزی بعد از پرتو تابی متفاوت باشد وجود دارد. مرگ ایتترفازی را می توان یک پاسخ کاملا متفاوت به شکل دیگری از آسیب سلولی دانست اگر چه مطالعات و آزمایشات اولیه در مرگ میتوزی و ایتترفازی و

برخورد متعدد یونهای سنگین از ناحیه هسته ای سلول لازمه بروز مرگ ایتترفازی در سلولها پرتو دیده است.



شکل ۶- رابطه بین مساحت ناحیه هدف و مرگ ایتترفازی در مقادیر متفاوت LET یونهای سنگین. پرتوهای ایکس (+)، یونهای کربن (○)، یونهای نئون (●)، یونهای یونهای آرگون (□)، یونهای آهن (Δ) با روش محاسباتی مشخص گردیدند.

۴- بحث و نتیجه گیری

برای مشخص نمودن خصوصیات و چگونگی صدمات سلولی هنگام پرتودهی با یونهای سنگین یونیزان بررسی ها و مطالعات متعددی بر روی شکستهای DNA سلولی مانند شکستهای دو گانه [۱۵ و ۱۶] و همچنین از دست دادن توانایی تشکیل کلنی در سلولهای پرتو دیده بعنوان یک مشخصه مهم در بررسی صدمات پرتوی [۱۷ و ۱۹] انجام گرفته است. مطالعات و تحقیقات اخیر بیشتر با هدف بررسی شکستهای دو گانه DNA و بروز مرگ سلولی در رابطه با مقادیر LET پرتوها انجام گرفته بود. نتایج نشان می دهد بروز مرگ سلولی در جمعیت سلولی که حامل سلولهای آسیب دیده مانند سلولهایی با DNA شکسته شده هستند بعلت غیر قابل ترمیم بودن DNA آسیب دیده است. دلیل دیگر شاید عدم توانایی پیوست دوباره بازوی شکست یافته DNA از محل شکست بعد از گذشت ۸ الی ۲۲ ساعت بعد از پرتودهی است [۱۶]. بررسی هایی که از دید میکرو دزیمتری

تاخیر در تقسیم سلولی، و رابطه بین LET پرتوها و اثر بیولوژیکی نسبی، دو یافته کاملاً متناقض وجود دارد [۲۵] و [۲۴]. عدم توافق‌ها ممکن است بعلاوه آهنگ دز پرتوی باشد که جهت مشخص نمودن مقادیر اثر بیولوژیکی نسبی بکار رفته و نتایج نشان می‌دهند که LET پرتوی زمانی حداکثر اثر گذاری بیولوژیکی نسبی بالایی دارد که سلولها با مقادیر دز پرتوی بالایی (دز ۵ تا ۵۰ گری) و مقدار LET برابر یا بیشتر از ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر تحت پرتو دهی باشند [۲۵]. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که مقدار دز ۵ تا ۵۰ گری جهت بروز مرگ ایترفازی لازم است.

ناحیه حساس و هدف برای بروز مرگ ایترفازی به مساحت ۵ تا ۱۰ میکرومتر مربع در مقایسه با سطح هدف مرگ میتوزی به مساحت ۴۰ میکرومتر مربع کوچکتر است. این اندازه نشانگر آن است که تعداد برخوردهایی که برای ایجاد یک ضربه در مرگ ایترفازی لازم است برابر با ۱۳ تا ۲۶ برخورد در سلولی با اندازه هسته ۱۳۰ میکرومتر مربع می‌باشد. در حالیکه در مورد مرگ میتوزی تعداد برخوردها به حدود ۳ ضربه می‌رسد. بنابراین در ده‌های بالا اهمیت بروز مرگ سلولی از نوع ایترفازی بیشتر مطرح است و لزوم LET پرتوی بالا جهت اثرگذاری بیولوژیکی نسبی حداکثر در محدوده ۲۳۰ کیلو الکترون ولت بر میکرومتر مشخص می‌گردد.

۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از آقای دکتر هیروشی ساساکی که در مورد آنالیز نتایج و بحث کمک فکری شایانی نمودند، تشکر و قدردانی می‌نمایم. خدمات تمام پرسنل آزمایشگاه و مرکز پرتو دهی ریکن در ژاپن را ارج نهاده و سپاسگزارم.

وابستگی به LET پرتوی مشابه هم هستند ولی محدوده کمیت LET که بتواند حداکثر اثر بیولوژیکی نسبی را بدهد (۲۳۰ کیلو الکترون ولت) محدود می‌باشد (شکل ۵).

بنابراین وقوع مرگ ایترفازی در پرتوهایی با LET بالا این نکته را آشکار می‌سازد که وجود صدمات و آسیب‌های متعدد سلولی در مقایسه با مرگ میتوزی باید اتفاق افتد. با توجه به آزمایشات متعددی و نتایج عکس برداری دوره ای که در سلولهای تخمدان همسترچینی انجام شد دریافتیم که مرگ ایترفازی در سلولهای حجیم و با ظاهری غول پیکر که در مرحله G₂ بعد از پرتو دهی دچار تاخیر در چرخه سلولی گردیده اند اتفاق می‌افتد (شکل ۱).

نتایج بالا با روش فلوسیتومتری نیز تایید گردید (شکل ۳) و در مورد تغییر شکل ظاهری سلول و تغییر حالت کشیده سلول به دایره ای و گرد که نشانه تقسیم میتوزی می‌باشد تا مدت زمان طولانی بعد از پرتو دهی مشاهده نگردید. همچنین در روش غیر مستقیم که با استفاده از کافئین بوده توانستیم سلولهایی که دچار مرگ ایترفازی هستند را سریعتر شناسایی کنیم. کافئین با تاثیر گذاری در عوامل کنترل کننده فازهای سلولی گاه موجب مرگ سلولی آپوتوزی در سلولهایی که در مرحله G₂ دچار تاخیر هستند، می‌گردد [۲۲ و ۲۱]. انتخاب زمان ۲۴ ساعت بعد از پرتو دهی جهت اضافه نمودن کافئین بدین علت بوده که در طول این مدت زمانی بیشتر سلولها توانایی تقسیم را پیدا می‌کنند ولی هنوز مرگ ایترفازی شروع نمی‌شود. اگر کافئین زودتر از این مدت داده شود سلولهایی که در مرحله تاخیری G₂ هستند مجبور به عبور از مرحله میتوز می‌گردند و سلولهای گرد فراوانی شبیه به مرحله آغازین مرگ آپوتوز سلولی قابل مشاهده است. مرگ ایترفازی معمولاً همراه با تاخیر در فاز G₂ و تاخیر در فاز میتوزی و تقسیم سلولی است [۲۳]. در بیان چگونگی

1. Barendsen GW, Beusker ILJ, Vergroesen A J. and Budke L, Effect of different ionizing radiations on human cells in tissue culture II. Biological experiments. *Radiat Res* 1960; 13: 841-849.
2. Pathak R, Dey SK, Sarma A, Khuda-Bukhsh AR, Cell killing, nuclear damage and apoptosis in Chinese hamster V79 cells after irradiation with heavy-ion beams of (16)O, (12)C and (7)Li. *Mutat Res* 2007; 632: 58-68.
3. Brenner DJ, Ward JF., Constraints on Energy Deposition and Target Size of Multiply Damaged Sites associated with DNA Double-strand Breaks. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 737-748
4. Fakir H, Sachs RK, Stenerlow B, Hofmann W., Clusters of DNA double-strand breaks induced by different doses of nitrogen ions for various LETs: experimental measurements and theoretical analyses. *Radiat Res* 2006; 166: 917-927.
5. Mehnati P, Morimoto Sh, Yatagai F, et al, Exploration of 'Over Kill Effect' of High-LET Ar- and Fe-ions by Evaluating the Fraction of Non-hit Cell and Interphase Death. *J Radiat Res* 2005; 46: 343-350.
6. Aoki M, Furusawa Y. and Yamada T, LET Dependency of Heavy-ion Induced Apoptosis in V79 Cells. *J Radiat Res* 2000; 41: 163-175.
7. Sasaki H, Cell killing and division delay in asynchronous and synchronized Hela cells irradiated with alpha particles or X rays. *Radiat Res* 1984; 99: 311-323.
8. Palayoor ST, Humm JL, Atcher RW, Hines J.J. and Macklis R.M., G₂M arrest and apoptosis in murine T lymphoma cells following exposure to ²¹²Bi alpha particle irradiation. *Nuct. Med. Biol.* 1993; 20: 795-805.
9. Kana T, Kohno T, Minohara S, Sudou M, Takada E, Dosimetry and measured differential W values of air for heavy-ions. *Radiat Res* 1993; 135: 293-301.
10. Kanai T, Furusawa Y, Fkutsu K, et al, Irradiation of mixed beam and design of spread-out Bragg peak for heavy-ion radiotherapy. *Radiat Res* 1997; 147: 78-85.
11. Walter RA, Gurley LR. and Tobey RA, Effect of caffeine on radiation-induced phenomena associated with cell-cycle traverse of mammalian cells. *Biophys. J.* 1974; 14: 99-118.
12. Guida P, Vazquez ME, Otto S, Cytotoxic effects of low- and high-LET radiation on human neuronal progenitor cells: induction of apoptosis and TP53 gene expression. *Radiat Res* 2005; 164: 545-551.
13. Hotz MA, Gong J, Traganos F. and DarynKiewicz Z, Flow cytometric detection of the assays of in situ DNA degradation and chromatin changes. *Cytometry* 1994; 15: 237-244.
14. Goodhead DT, Munson RJ, Thacker J, Cox R, Inactivation of Cultured Mammalian Cells Exposed to Beams of Accelerated Heavy Ions IV. Biophysical Interpretation. *Int J Radiat Biol* 1980; 37: 135-167.
15. Hendry HJ, Repair of Cellular Damage after High LET Irradiation, *J Radiat Res* 1999; 40: S60-S65.
16. Roots R, Holley W, Chatterjee A, Irizarry M., Kraft G, The Formation of Strand Breaks in DNA after High-LET Irradiation: A Comparison of Data from in Vitro and Cellular Systems. *Int J Radiat Biol* 1990; 58: 55-69.
17. Blakely EA, Tobias CA, Yang TC, Smith KC. and Lyman JT, Inactivation of human kidney cells by high-energy monoenergetic heavy-ion beams. *Radiat Res* 1979; 80: 122-160.

18. Todd P., Fractionated heavy-ion irradiation of cultured human cells. *Radiat Res* 1968; 34: 378-389.
19. Blakely EA, Chang PY. and Lommel L, Cell-cycle-dependent recovery from heavy-ion damage in G1-phase cells. *Radiat Res* 1985; 104: S145-S157.
20. Ando K, Koike S, Uzawa A, Takai N, et al, Repair of skin damage during fractionated irradiation with gamma rays and low-LET carbon ions. *J Radiat Res* 2006; 47: 167-74.
21. Hartwell LH. and Weinert TA, Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 1989; 256: 629-634.
22. Palayoor SJ, Macklis RM, Bump EA. and Coleman CN, Modulation of radiation induced apoptosis and G2/M block in murine T-lymphoma cells. *Radiat Res* 1995; 141: 235-243.
23. Imaoka T, Nishimura M, Kakinuma S, Hatano Y, et al, High Relative Biologic Effectiveness of Carbon Ion Radiation on Induction of Rat Mammary Carcinoma and its Lack of H-ras and Tp53 Mutations. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 69:194-203.
24. Skarsgard LD, Kihlman BA, Parker L, Pujara CM. and Richardson S, Survival, Chromosome abnormalities and recovery in heavy-ion and X-irradiated mammalian cell. *Radiat Res Supp* 1967; 17: 208-221.
25. Lück-Huhle C, Blakely EA, Chang PY. and Tobias CA, Drastic G2 arrest in mammalian cells after irradiation with heavy-ion beams. *Radiat Res* 1979; 79: 97-112.
26. Tsuji H, Mizoe J, Kamada T, Baba M, et al, Clinical Results of Carbon Ion Radiotherapy at NIRS. *J Radiat Res* 2007; 48: A1-A13.