

دزسنجی زیستی با استفاده از سنجش ریزهسته

الهام راستخواه^۱، فریده ذاکری^{۲*}، محمدرضا فرشیدپور^۳ و محمدرضا رجب‌پور^۳

^۱ دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، تهران، ایران.

^۲ پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران.

^۳ امور حفاظت در برابر اشعه کشور، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران.

* تهران، انتهای خیابان کارگر شمالی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، کدپستی: ۵۱۱۱۳-۱۴۳۹۹

پست الکترونیکی: fzakeri@aeoi.org.ir

چکیده

پیشرفت سریع و روزافزون کاربرد پرتوها در زمینه‌های مختلف پزشکی، صنعتی و افزایش تأسیسات و فعالیت‌های هسته‌ای، افراد شاغل در این مراکز را در معرض خطر بالاتر پرتوگیری نسبت به گذشته قرار می‌دهد. با توجه به خطرات زیستی و تأثیرات سوء این پرتوگیری‌ها بر سلامت افراد، تخمین دز واقعی رسیده به بدن برای اتخاذ تدابیر درمانی مناسب و به‌موقع، حائز اهمیت فراوان است. در حوادث پرتویی با ابعاد وسیع که نیاز به دسته‌بندی سریع مصدومین است، استفاده از روش سنجش ریزهسته و دزسنجی زیستی بر اساس تهیه منحنی دز- پاسخ بسیار ارزشمند بوده و از کارایی بالایی برخوردار است. برای تهیه و رسم منحنی دز- پاسخ با این روش، نمونه خون از ۱۶ نفر زن و مرد سالم در دو گروه سنی مختلف گرفته شد و تحت تابش پرتو گاما با دزهای ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ گری قرار گرفتند. پس از کشت و محصول برداری و تهیه لام، تعداد ریزهسته‌ها در هر دز شمارش و منحنی دز- پاسخ رسم شد که از تابع خطی درجه دو تبعیت می‌کرد. جهت بررسی کارایی منحنی به‌دست آمده، تخمین دز در دو مورد حادثه پرتوگیری شغلی و دو نمونه خون پرتودهی شده با دزهای نامشخص با هر دو روش استاندارد بررسی متافاز (شکست های کروموزومی دو سانترومری) و ریزهسته انجام شد و نتایج آن مورد مقایسه قرار گرفت. تطابق بسیار خوب نتایج حاصل از هر دو روش، نشان‌دهنده کارایی بالای روش سنجش ریزهسته در تخمین دز زیستی است.

کلیدواژگان: ریزهسته، پرتو یونیزان، منحنی دز- پاسخ، دزسنجی زیستی، لئوسیت‌های خون.

۱. مقدمه

است. ریزهسته از تقسیم هسته به وجود می‌آید و می‌تواند از قطعه‌های کروموزومی بدون سانترومر و یا کروموزوم کامل باشد که در مرحله آنافاز از تقسیمات سلولی قادر به اتصال به دوک تقسیم نیستند، در نتیجه به هسته سلول دختر منتقل

سنجش ریزهسته^۱ (MN) با استفاده از روش توقف تقسیم سیتوپلاسم از روش‌های معتبر و استاندارد دزسنجی زیستی

¹ Micronucleus (MN)

نمی‌شوند. ریزهسته‌ها با شکل و ویژگی‌های رنگ‌آمیزی مشابه هسته، در درون سیتوپلاسم سلول‌های دوهسته‌ای دختری قرار می‌گیرند [۸-۱].

پرتوگیری با پرتوهای یون‌ساز سبب شکل‌گیری ریزهسته می‌گردد. البته عواملی مانند سن، جنس، رژیم غذایی و سبک زندگی نیز در بروز حد زمینه ریزهسته در جمعیت‌های مختلف تأثیر دارد [۹]. سنجش ریزهسته، از کامل‌ترین و معتبرترین روش‌های استاندارد دزسنجی زیستی است. این روش از بهترین نشانگرهای پرتوهای یونیزان است و امکان مقایسه مستقیم ایجاد ریزهسته‌ها و شکست‌های کروموزومی را میسر می‌سازد و این روش، ارزیابی پارامترهای دیگر آسیب ژنومی را نیز امکان‌پذیر ساخته است [۱۰]. پرتوگیری‌هایی با دز بالا منجر به بروز اثرات قطعی و پرتوگیری مزمن منجر به اثرات احتمالی در طول زندگی پرتوکاران می‌شود. در همین راستا، ضرورت توسعه شیوه‌های مطمئن برای برآورد میزان پرتوگیری و دز دریافتی افراد، به‌ویژه در مواردی که زمان پرتوگیری از دزسنج‌های متداول استفاده نشده باشد، روزبه‌روز بیش‌تر احساس می‌شود. بنابراین علاوه بر روش‌های فیزیکی سنجش دز، استفاده از نشانگرهای زیستی مناسب جهت تخمین دز واقعی پرتوگیری بدن یا دزسنجی زیستی ضروری به نظر می‌رسد. تعیین دز پرتو بر مبنای آثار زیستی آن، در هنگام وقوع حوادث پرتویی، به پزشکان کمک می‌کند تا نه تنها بر اساس نشانه‌های بالینی بلکه براساس نتایج تخمین دز زیستی، تدابیر لازم برای زمان شروع و روند مراقبت‌های پزشکی را اتخاذ نمایند. از این رو در طی سال‌های اخیر توجه و تمرکز جوامع علمی مرتبط با حفاظت در برابر پرتوها، بر یافتن نشانگرهای زیستی مناسب جهت تخمین دز زیستی افراد در کوتاه‌ترین زمان ممکن، معطوف شده است. نتایج بررسی‌های انجام شده کارکنان نیروگاه‌های هسته‌ای، پرتوپزشکی و رادیولوژی، وقوع شکست‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون این افراد را

نشان داده است. بر اساس قوانین کمیسیون بین‌المللی حفاظت در برابر پرتو (ICRP^۱) حد مجاز پرتوگیری برای پرتوکاران ۲۰ میلی‌سیورت در سال است که نباید از ۵۰ میلی‌سیورت در یک سال و از ۱۰۰ میلی‌سیورت در ۵ سال تجاوز کند. اما در گروه‌های مختلف پرتوکاران و حوادث، مواردی از پرتوگیری بالاتر از حد مجاز مشاهده می‌شود. در این موارد علاوه بر روش‌های فیزیکی سنجش دز، استفاده از نشانگرهای زیستی مناسب جهت تخمین دز واقعی پرتوگیری بدن یا دز زیستی ضروری به نظر می‌رسد. از آنجا که روش سنجش ریزهسته از حساسیت بالایی برخوردار بوده و در مقایسه با سایر روش‌های دزسنجی زیستی، ارتباط خوبی با نتایج روش بررسی دوسانترومیری و جابه‌جایی کروموزومی دارد، در تخمین دز حوادث پرتویی از آن استفاده می‌شود [۹].

در روش سنجش ریزهسته، کشت لنفوسیت‌ها به دو روش کشت خون کامل یا لنفوسیت‌های جدا شده صورت می‌گیرد. به‌منظور دزسنجی زیستی، کشت خون کامل مناسب‌تر است. در حالی که کشت لنفوسیت‌های جدا شده از خون امکان مطالعه آسیب‌های ژنومی بیشتری را در مقایسه با روش کشت خون کامل فراهم می‌کند [۱۲-۱۰].

علی‌رغم پیشرفت‌های انجام شده هنوز هم تفاوت بارزی در بین آزمایشگاه‌های دزسنجی زیستی وجود دارد. بنابراین آژانس بین‌المللی انرژی اتمی توصیه می‌کند که هر آزمایشگاه دزسنجی زیستی، منحنی دز-پاسخ مربوط به خود را تهیه و استفاده نماید. لذا هدف از این پژوهش بررسی اثرات پرتو گاما بر لنفوسیت‌های خون انسان و تهیه منحنی دز-پاسخ در محدوده دز ۰-۴ گری با استفاده از روش سنجش ریزهسته (کشت خون کامل) برای دزسنجی زیستی در پرتوگیری‌های شغلی بالاتر از حد مجاز و در دسته‌بندی سریع مصدومین در حوادث پرتویی است.

^۱ International Commission of Radiation Protection

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. نمونه‌گیری

بر اساس دستورالعمل استاندارد آژانس بین‌المللی انرژی اتمی [۱۳] از ۱۶ نفر داوطلب شامل ۸ نفر زن و ۸ نفر مرد در دو گروه سنی ۲۰-۳۴ و ۳۵-۵۰ (در بازه‌های ۱۵ ساله) نمونه‌گیری خون به میزان ۵ میلی‌لیتر و در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد سدیم هپارین انجام شد. داوطلبان افرادی سالم، غیرسیگاری و بدون ابتلا به هر گونه بیماری حاد یا مزمن بودند. حداقل شش ماه پیش از نمونه‌گیری هیچ گونه دارو، به خصوص از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده ننموده، تحت رادیوگرافی تشخیصی و درمانی نیز قرار نگرفته بودند. در نمونه‌گیری کلیه ملاحظات اخلاقی رعایت شده و فرم رضایت‌نامه توسط افراد تکمیل شد.

۲.۲. پرتودهی نمونه‌ها

هر نمونه خون به ۶ قسمت مساوی برای پرتودهی با دزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ گری و یک نمونه به عنوان کشت کنترل (صفر گری)، در لوله‌های کوچک استریل دو میلی‌لیتری تقسیم شد و اطلاعات هر نمونه کدگذاری شد. بیشینه زمان بین خون‌گیری و پرتودهی ۱ ساعت و بیشینه زمان بین خون‌گیری تا کشت ۳/۵ ساعت بود.

پرتودهی نمونه‌های خون با دستگاه کبالت ۶۰ (تراترون ۷۸۰ - ساخت کشور کانادا) در آزمایشگاه استاندارد ثانویه دزسنجی سازمان انرژی اتمی واقع در کرج و با دزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲ و ۴ گری انجام شد. دزهای انتخابی جهت پرتودهی نمونه‌های خون بر اساس دستورالعمل استاندارد آژانس انتخاب شد. فاصله نمونه‌ها تا منبع پرتو ۱۰۰ سانتی‌متر بود و پرتودهی در دمای اتاق در داخل فانتومی از جنس پلکسی گلاس انجام

شد. میدان تابش 30×30 سانتی‌متر و $Kair=254$ میلی‌گری در دقیقه بود [۱۳].

۳.۲. روش کشت برای سنجش ریزهسته

دو کشت مجزا هر کدام شامل ۰/۵ میلی‌لیتر خون به ۴/۵ میلی‌لیتر محیط کشت RPMI 1640 اضافه شد. کشت‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. ۴۴ ساعت پس از شروع کشت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیتوکالازین-ب به محیط اضافه شد. پس از گذشت ۷۲ ساعت، مطابق با روش استاندارد محصول‌برداری و تثبیت نمونه‌ها به ترتیب با استفاده از محلول پتاسیم کلرید (۰/۰۷۵ مولار) و محلول تثبیت‌کننده اسید استیک و متانول (به نسبت ۱ به ۳) و سه نوبت شستشوی رسوب با محلول تثبیت‌کننده انجام و از رسوب حاصل، لام تهیه شد و رنگ‌آمیزی گیمسا صورت گرفت و نمونه‌ها مورد ارزیابی میکروسکوپی قرار گرفتند [۱۳]. برای تعیین تعداد کل ریزهسته‌ها در سلول‌های دوهسته‌ای، برای هر نمونه در مجموع ۱۰۰۰ سلول دوهسته‌ای با دیواره سیتوپلاسمی سالم در زیر میکروسکوپ مطالعه شد.

۴.۲. روش کشت برای بررسی متافاز

روش بررسی متافاز، برای بررسی کارایی منحنی به‌دست آمده از روش سنجش ریزهسته و مقایسه نتایج حاصل از آن به کار گرفته شد. در این روش لئوسیت‌های جدا شده از خون با استفاده از محیط کشت شامل RPMI 1640 و ۲۰ درصد سرم جنین گاو، ۱۰۰ واحد بین‌المللی در میلی‌لیتر پنی سیلین، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین، ۰/۲ درصد فیتوهمگلوتینین و ۰/۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر کلسیمید به مدت ۴۸ ساعت کشت داده شدند (لازم به ذکر است که تمامی مواد ساخت شرکت Gibco / کشور آمریکا است). سپس

سانترومرها در طول آنافاز به سمت دو قطب مخالف کشیده شده‌اند و نشانگر میزان بازآرایی کروموزومی هستند. جوانه هسته‌ای، شکلی شبیه به ریزهسته دارد با این تفاوت که توسط یک ساقه باریک یا نسبتاً پهن به هسته متصل شده و نشانه تکثیر ژنی^۳ است.

۶.۲. بررسی‌های آماری

هدف از رسم منحنی دز- پاسخ به‌دست آوردن مناسب-ترین مقادیر ضرایب α ، β و C در معادله خطی- درجه دو است که بهترین سازگاری را با نقاط منحنی داشته باشند. بررسی واریانس، هم‌بستگی و انحراف استاندارد از میانگین، برای هر دسته از داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS-21 انجام شد. همچنین برای بررسی هم‌بستگی بین داده‌های ریزهسته با صفات مورد بررسی، ضریب هم‌بستگی نیز محاسبه شد. به منظور تطابق با مدل خطی- درجه دو از روش کمترین توان‌های دوم با آزمون تکراری^۴ استفاده شد که منجر به تخمین حداکثر احتمال^۵ برای تطابق پارامترهای به‌دست آمده شد. به منظور انجام مراحل آماری فوق از نرم افزارهای پیشنهادی آژانس بین‌المللی انرژی اتمی مانند CABAS-2 و Dose Estimate استفاده و نتایج آن با هم مقایسه شد [۱۳].

۳. نتایج

توزیع ریزهسته‌ها در لئوسیت‌های ۱۶ نمونه در دز صفر و پس از پرتودهی با دزهای مختلف شمارش شد. میانگین سنی برای زنان ۲۰-۳۴ و ۳۵-۵۰ سال، به ترتیب ۳۰ و ۳۹ سال و برای مردان به ترتیب ۳۱ و ۴۵ سال بود. انواع آسیب‌های ژنومی ناشی از پرتو در شکل ۱ نشان داده شده است.

سلول‌های کشت داده شده در محلول هیپوتونیک پتاسیم کلرید (۰/۰۷۵ مولار) با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفتند [۱۳]. با استفاده از محلول اسید استیک و متانول (۱:۳) مراحل تثبیت نمونه‌ها انجام شد. لام‌ها تهیه و در جریان هوا خشک و با استفاده از گیمسا رنگ‌آمیزی شدند. در نهایت با شمارش ۵۰۰ متافاز برای هر نمونه ناهنجاری‌های کروموزومی ناپایدار از قبیل کروموزوم دوسانترومیری و کروموزوم حلقه سانترومردار مورد بررسی قرار گرفت.

۵.۲. معیارهای انتخاب سلول‌های قابل شمارش

انتخاب سلول‌های مناسب و الگوی شمارش سلول‌های دوهسته‌ای واجد ریزهسته، با استفاده از معیارهای پیشنهادی در دستورالعمل آژانس بین‌المللی انرژی اتمی به شرح زیر انجام شد [۱۳]. ریزهسته به هسته اصلی متصل نیست. هر یک از سلول‌های دوهسته‌ای واجد ریزهسته، باید از غشاء هسته‌ای کامل برخوردار بوده و در یک محدوده‌ی سیتوپلاسمی مشخص واقع شده و هسته‌ها باید تقریباً هم‌اندازه باشند. ریزهسته خصوصیات رنگ‌پذیری مشابهی با هسته‌ی اصلی دارد و قطر آن در لئوسیت انسان بین $\frac{1}{16}$ تا $\frac{1}{3}$ قطر هسته‌ی اصلی متغیر است.

پل نوکلئوپلاسمی^۱ و جوانه هسته‌ای^۲ در سلول دوهسته‌ای مورد مطالعه در روش سنجش ریزهسته، نیز مشاهده می‌شود که از سایر آسیب‌های ژنومی هستند. پل‌های نوکلئوپلاسمی اتصال ممتدی بین هسته‌های اصلی در سلول‌های دوهسته‌ای هستند که قطرشان از $\frac{1}{4}$ قطر هسته داخل سلول بیشتر نبوده و دارای رنگ‌آمیزی یکسانی با هسته اصلی هستند. پل‌های نوکلئوپلاسمی، کروموزوم دوسانترومیری بوده که بر روی

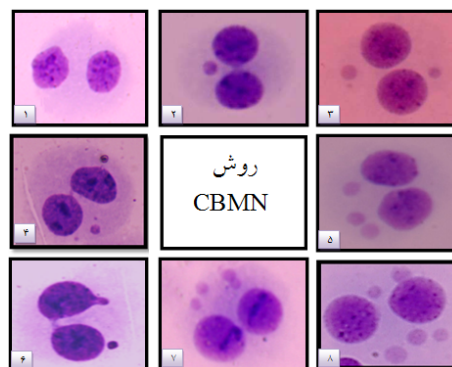
³ Gene amplification

⁴ Iteratively reweighted least squares

⁵ Maximum likelihood

¹ Nuclear Bridge

² Nuclear Bud



شکل (۱): انواع سلول‌ها و آسیب‌های ژنومی با استفاده از روش

ریزهسته، ۱. یک سلول دوهسته‌ای سالم بدون ریزهسته، ۲. با یک ریزهسته، ۳. با دو ریزهسته، ۴. با دو ریزهسته و یک پل نوکلئوپلاسمی، ۵. با سه ریزهسته، ۶. با یک ریزهسته و یک پل نوکلئوپلاسمی و یک جوانه هسته‌ای، ۷. با چهار ریزهسته، ۸. با پنج ریزهسته.

۱.۳. منحنی دز- پاسخ در دزهای ۰-۴ گری

نتایج حاصل از شمارش تعداد ریزهسته‌ها در دزهای مختلف پرتو در جدول ۱ نشان داده شده است. با استفاده از این داده‌ها منحنی کلی دز- پاسخ رسم شد که معادله آن به صورت زیر است:

$$Y = 0.0109 (\pm 0.0009) + 0.0799 (\pm 0.0030) D + 0.0284 (\pm 0.0010) D^2 \quad (1)$$

در معادله ۱، Y حاصل شکست‌های کروموزومی و D نشان‌دهنده دز پرتو است. همچنین درجه آزادی ۳، مقدار p ۰/۰۰۷، ضریب T ۰/۹۹ و ضریب کای به توان دو ۱۱/۹۸ به دست آمد.

جدول (۱): ایجاد ریزهسته‌ها در لنفوسیت‌های خون انسان ناشی از پرتو گاما.

(اعداد حاصل بیانگر تعداد ریزهسته‌ها در ۱۰۰۰ سلول دوهسته‌ای هستند)

جنس	زنان				مردان			
	سال ۲۰-۳۴		سال ۳۵-۵۰		سال ۲۰-۳۴		سال ۳۵-۵۰	
۰	۱۴	۷	۵	۱۴	۱۱	۱۰	۱۰	
۰/۲۵	۴۹	۲۴	۲۰	۳۵	۲۸	۳۶	۴۴	
۰/۵	۸۱	۶۱	۵۲	۶۸	۶۱	۶۷	۶۹	
۱	۱۳۶	۱۱۵	۱۱۹	۱۰۳	۱۴۰	۱۳۳	۱۰۲	
۲	۲۵۶	۲۸۵	۳۱۰	۲۲۰	۳۳۵	۲۲۲	۲۳۷	

نتایج به دست آمده اختلاف معنی‌داری میان ضرایب α ، β و C برای روابط به‌دست آمده برای زنان و مردان در سنین مختلف نشان نداد. در نهایت نتایج حاصل از داده‌های ۴ گروه از افراد برای رسم یک منحنی دز- پاسخ نهایی ادغام و نتیجه به‌صورت معادله نهایی گزارش شد. ضرایب α و β و C به‌دست آمده با هر دو نرم‌افزار CABAS-2 و Dose Estimate مطابقت داشتند. انتشار درون سلولی ریزهسته در سلول‌های دوهسته‌ای برای تطابق با مدل پوآسون بررسی شدند. نسبت واریانس به میانه با افزایش دز، افزایش نشان می‌دهد. برای توزیع غیرپوآسون بسیار پراکنده، در برآوردها باید پراکنندگی زیاد را مد نظر داشت.

۲.۳. ارزیابی کارایی منحنی دز- پاسخ ۰-۴ گری با روش سنجش ریزهسته

بررسی و مقایسه نتایج تخمین دز برای ۲ مورد فرد حادثه دیده در پرتوگیری شغلی از طریق دو روش سنجش ریزهسته و بررسی متافاز انجام شد که نتایج آن در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. لازم به ذکر است که این افراد پرتونگاران صنعتی بودند که در حین کار دچار حادثه و پرتوگیری ناشی از نقص فنی دستگاه شدند و جهت تشخیص میزان پرتوگیری و دز دریافتی به سازمان انرژی اتمی مراجعه کرده بودند.

جدول (۲): تخمین دز برای ۲ فرد حادثه دیده شغلی با استفاده از روش ریزهسته.

نمونه	تعداد سلول‌های دوهسته‌ای شمارش شده	فراوانی ریزهسته‌ها	دز تخمین زده شده (گری) \pm انحراف استاندارد	حد پایین دز (گری)	حد بالای دز (گری)
۱	۹۸۵	۹۲	$۰/۸۰۳ \pm ۰/۰۹۵$	$۰/۶۱۷$	$۰/۹۹۰$
۲	۱۰۰۰	۳۹	$۰/۳۱۶ \pm ۰/۰۸۴$	$۰/۱۵۲$	$۰/۴۸۱$

جدول (۳): تخمین دز برای ۲ فرد حادثه دیده شغلی با استفاده از روش بررسی متافاز.

نمونه	تعداد متافاز شمارش شده	شکست کروموزومی دوسانترومیری* و حلقه سانترومردار**	دز تخمین زده شده (گری) \pm انحراف استاندارد
۱	۵۰۰	۱۰	$۰/۸۰۸ \pm ۰/۰۹۲$
۲	۵۲۴	۳	$۰/۳۰۶ \pm ۰/۰۸۳$

شکست‌های Dicentric* و Centric Ring** از شکست‌های کروموزومی ناپایدار واجد سانترومر بوده که در تخمین دز زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

ریزهسته، $۱/۹۲۵ \pm ۰/۱۰۸$ گری و به روش بررسی متافاز، $۱/۸۷۵ \pm ۰/۱۱۵$ گری است. در نمونه ۲، میزان دز تخمین زده شده به روش ریزهسته، $۴/۰۱۳ \pm ۰/۱۲۷$ گری و به روش بررسی متافاز، $۳/۹۸۷ \pm ۰/۲۵۵$ گری است. تطابق بسیار خوبی در هر دو روش مشاهده شد.

جدول (۴): تخمین دز ۲ نمونه با دز نامشخص با استفاده از سنجش

ریزهسته.

نمونه	تعداد سلول‌های دوهسته‌ای شمارش شده	*فراوانی ریزهسته	دز تخمین زده شده (گری) \pm انحراف استاندارد
۱	۱۰۰۰	۲۷۰	$۱/۹۲۵ \pm ۰/۱۰۸$
۲	۱۰۰۰	۷۸۹	$۴/۰۱۳ \pm ۰/۱۲۷$

* فراوانی ریزهسته‌ها با توجه به سلول‌های واجد ۶-۱ ریزهسته محاسبه شده است.

جدول (۵): تخمین دز ۲ نمونه با دز نامشخص با روش بررسی متافاز.

نمونه	تعداد متافاز شمارش شده	شکست کروموزومی دوسانترومیری* و حلقه سانترومردار**	دز تخمین زده شده (گری) \pm انحراف استاندارد
۱	۳۴۲	۱۰۰	$۱/۸۷۵ \pm ۰/۱۱۵$
۲	۸۷	۱۰۰	$۳/۹۸۷ \pm ۰/۲۵۵$

شکست‌های Dicentric* و Centric Ring** از شکست‌های کروموزومی ناپایدار

واجد سانترومر بوده که در تخمین دز زیستی مورد استفاده قرار می‌گیرند.

در تخمین دز افراد حادثه دیده با دو روش نیز مطابقت بسیار خوبی میان نتایج وجود داشت. در فرد شماره ۱، میزان دز تمام بدن تخمین زده شده با استفاده از روش ریزهسته، $۰/۸۰۳ \pm ۰/۰۹۵$ گری است (حد پایین دز برابر $۰/۶۱۷$ گری و حد بالای دز برابر $۰/۹۹۰$ گری است) و میزان دز با روش بررسی متافاز، $۰/۸۰۸ \pm ۰/۰۹۲$ گری تخمین زده شد. در فرد شماره ۲، میزان دز تمام بدن تخمین زده شده با روش ریزهسته، $۰/۳۱۶ \pm ۰/۰۸۴$ گری است (حد پایین دز برابر $۰/۱۵۲$ گری و حد بالای دز برابر $۰/۴۸۱$ گری است) و دز با روش بررسی متافاز، $۰/۳۰۶ \pm ۰/۰۸۳$ گری تخمین زده شد. همان‌گونه که مشاهده می‌شود تخمین دز با هر دو روش حدود یکسانی از دز پرتو را نشان می‌دهد. همچنین ۲ نمونه خون با دز نامشخص در آزمایشگاه استاندارد ثانویه دزسنجی سازمان انرژی اتمی واقع در کرج پرتو دهی شدند و در شرایط یکسان، تخمین دز با دو روش بررسی متافاز و سنجش ریزهسته برای آن‌ها صورت گرفت، نتایج تخمین دز در جدول‌های ۴ و ۵ قرار داده شد. تمامی ملاحظات برای تخمین دز ۲ نمونه خون با دز نامشخص با هر دو روش سنجش ریزهسته و بررسی متافاز صورت گرفت. در نمونه ۱، میزان دز تخمین زده شده به روش

جدول (۶): مطابقت و مقایسه ضرایب منحنی دز-پاسخ ۰-۴ گری تحقیق حاضر با مقادیر منحنی‌های دز-پاسخ محققان سایر کشورها.

ردیف	نام محقق و سال چاپ و کشور مورد بررسی	ضریب α (گری ^{-۱})	ضریب β (گری ^{-۲})	ضریب C	نوع اشعه	محدوده دز (گری)	تندی دز (گری در دقیقه)	جنسیت	گروه سنی
۱	مقادیر حاصل از منحنی دز-پاسخ تحقیق حاضر	۰/۰۷۹۹	۰/۰۲۸۴	۰/۰۱۰۹	⁶⁰ Co اشعه گاما	۰/۲۵-۴	۰/۲۵۴	زن و ۸ مرد	۲۰-۵۰
	معادله	$Y = 0.0799 (\pm 0.009) D + 0.0109 (\pm 0.0030) D^2 + 0.0284 (\pm 0.010) D^3$							
۲	Pala F. et al, 2008 Turkey [15]	۰/۰۷۴	۰/۰۲۸	۰/۰۱۳	⁶⁰ Co اشعه گاما	۰/۱-۵	۲/۰۵	زن و ۱ مرد	۲۰-۵۰
	معادله	$Y = 0.074 (\pm 0.006) D + 0.013 (\pm 0.0007) D^2 + 0.028 (\pm 0.0020) D^3$							
۳	Di Giorgio M. et al, 1995 Argentina [16]	۰/۰۷۹۹	۰/۰۲۸۴	۰/۰۱۱۴	⁶⁰ Co اشعه گاما	۰/۳۵-۰/۴	۰/۷۰	زن و ۵۰ مرد	۴-۶۲
	معادله	$Y = 0.0799 (\pm 0.0030) D + 0.0114 (\pm 0.0014) D^2 + 0.0284 (\pm 0.010) D^3$							
۴	Go Y. et al, 2011 Korea [17]	۰/۰۱۸۸۲	۰/۰۰۱۴۳	۰/۰۰۴	¹³⁷ Cs اشعه گاما	۱-۶	۲/۱۱	زن و مرد	۲۰-۶۰
	معادله	$Y = 0.01882 (\pm 0.00097) D + 0.004 (\pm 0.0001571) D^2 + 0.0143 (\pm 0.0001571) D^3$							
۵	Amicis A. et al, 2012 Italy [18]	۰/۰۹۲۷	۰/۰۶۰۰	۰/۰۰۳۷	اشعه ایکس	۰/۲۵-۰/۴	۱	---	---
	معادله	$Y = 0.0927 (\pm 0.0156) D + 0.037 (\pm 0.0030) D^2 + 0.0600 (\pm 0.058) D^3$							
۶	Kinneberg M. & Lyulko M., 2010 New York [19]	۰/۰۳۵	۰/۰۶۱	۰/۰۴۲۰	¹³⁷ Cs اشعه گاما	۰/۱-۱۰	---	---	۲۵-۵۰
	معادله	$Y = -0.0006 D^3 + 0.061 D^2 + 0.035 D + 0.420$							
۷	IAEA, 2002 [20]	۰/۰۳۱۰	۰/۰۰۲۲	۱۳/۱۹۰۰	اشعه گاما	---	---	---	---
	معادله	$Y = 0.0310 (\pm 1/854) D + 0.0022 (\pm 0.0002) D^2 + 0.022 (\pm 0.0002) D^3$							
۸	Acharya S. et al, 2012 India [21]	۰/۰۷۵	۰/۰۱۶	۰/۰۲۵	⁶⁰ Co اشعه گاما	۰/۱-۶	۰/۰۳۳	۱ مرد	۲۸
	معادله	$Y = 0.075 (\pm 0.011) D + 0.025 (\pm 0.003) D^2 + 0.016 (\pm 0.003) D^3$							
۹	Atanasova P. et al, 2009, Bulgaria [22]	۳۹/۵۹	۱۷/۰۱	۲۰/۵۶	¹³⁷ Cs اشعه گاما	۰/۴-۰/۵	۰/۶۳	زن و ۳ مرد	۲۴-۵۱
	معادله	$Y = 17.01 D^2 + 39.59 D + 20.56$							
۱۰	Pejchal J. et al, 2011 Bulgaria [10]	۳۵/۳۸۱	۳۴/۸۲۴	۲۰	⁶⁰ Co اشعه گاما	۰/۱-۰/۵	۰/۸۳	زن و ۴ مرد	۲۶-۲۹
	معادله	$Y = 34.824 D^2 - 35.381 D + 20$							

۴. بحث و نتیجه گیری

به منظور تهیه منحنی دز- پاسخ با استفاده از روش سنجش ریزهسته، نمونه‌های ۱۶ نفر (در دو گروه زن و مرد در دو بازه سنی ۱۵ سال) تحت تابش دزهای ۴-۰ گری قرار گرفتند. از آنجایی که تفاوت معنی‌دار بین نتایج به‌دست آمده در دو گروه مجزا از نظر سن و جنس مشاهده نشد، داده‌ها ادغام شده و منحنی دز- پاسخ کلی آن به صورت خطی- درجه دو با معادله زیر به‌دست آمد:

$$Y = 0.0109(\pm 0.0009) + 0.0799(\pm 0.0030)D + 0.0284(\pm 0.0010)D^2$$

درستی ضرایب منحنی کلی رسم شده از طریق مقایسه ضرایب منحنی دز- پاسخ به‌دست آمده با منحنی‌های دز- پاسخ استاندارد رسم شده توسط کشورهای مختلف بررسی شد که نتایج آن در جدول ۶ نشان داده شده است.

جدول مذکور بر اساس متغیرهای شاخص، نام محقق و سال بررسی آن‌ها تنظیم شده است. این بررسی شامل: نام کشوری که افراد مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (که همگی سالم بودند)، نوع اشعه مورد استفاده، محدوده دز و تندی دز به‌کار رفته، جنسیت افراد و گروه سنی در مقالات مورد مطالعه تهیه شده است. مطابق مقادیر حاصل از منحنی دز- پاسخ، تحقیق حاضر با ۸ مقاله‌ی نخست هم‌خوانی خوبی دارد و با ۲ مقاله انتهایی هم‌خوانی کم‌تری دارد. این تفاوت می‌تواند ناشی از عوامل تأثیرگذار در وقوع ریزهسته شامل: جنسیت افراد، تندی دز، نوع اشعه‌ی پرتودهی شده و میزان تندی دز در مطالعات مختلف باشد که در تهیه‌ی منحنی دز- پاسخ بسیار حائز اهمیت هستند و باعث اختلاف و تفاوت در ضرایب منحنی دز- پاسخ می‌شوند [۱۴].

جهت ارزیابی کارایی منحنی دز- پاسخ ۴-۰ گری ریزهسته، مطالعات زیر به‌عمل آمد: تخمین دز دو مورد فرد حادثه دیده

شغلی و دو نمونه خون که با دز نامشخصی پرتودهی شدند با دو روش بررسی متفاوت و ریزهسته انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه، مطابقت نتایج حاصل از هر دو روش را نشان داد. تطابق بسیارخوب نتایج، بیانگر دقت تخمین دز با استفاده از منحنی دز- پاسخ تهیه شده با روش سنجش ریزهسته است. تخمین دز سریع و قابل اطمینان و صحیح حاصل نقش مهمی در تشخیص وضعیت بالینی و اتخاذ تدابیر درمانی مناسب برای افراد پرتودیده دارد. روش سنجش ریزهسته روشی دقیق و حساس است و از آن‌جا که در مقایسه با روش بررسی دوسانترومیری، از حساسیت و دقت کافی برخوردار است، می‌توان آن را جایگزین مناسبی برای روش دوسانترومیری دانست [۱۸، ۱۳، ۲۲، ۲۹]. بنابر توصیه آژانس بین‌المللی انرژی اتمی در مواقعی که بررسی‌های متعدد و سرعت تخمین دز زیستی مدنظر باشد، مانند حوادث پرتویی جدی که منجر به پرتوگیری تعداد زیادی از افراد شود، این روش حائز اهمیت فراوان است و آزمایشگاه‌های دزسنجی زیستی کشورها باید مجهز به این روش باشند.

بنابراین این منحنی در آزمایشگاه دزسنجی زیستی امور حفاظت در برابر اشعه کشور تهیه گردید. تشخیص سریع و آسان شکست‌ها که بدون نیاز به تجربه و مهارت متخصص ژنتیک است، همچنین غربالگری اقتصادی از دیگر مزایای این روش محسوب می‌شوند.

همچنین امکان شمارش خودکار ریزهسته‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای مخصوص نیز وجود دارد. استفاده از سیستم خودکار بررسی ریزهسته، مدت زمانی را که کارشناس صرف شمارش سلول‌های دوهسته‌ای می‌کند، بسیار کاهش داده و از خطاهای چشمی پیشگیری نموده و امکان انجام تحلیل‌های آماری دقیق‌تر را فراهم می‌آورد.

بنابراین در مواردی از حوادث پرتویی که تعداد زیادی از افراد درگیر در حادثه باید مورد بررسی قرار گیرند می‌تواند

حدود ۰/۱ گری کاهش می‌یابد [۳۰] و راه‌اندازی آن در آزمایشگاه‌های دزسنجی زیستی پیشنهاد می‌گردد.

۵. علایم، نشانه‌ها

Gray, Gy, گری.

Standard Deviation, SD, انحراف معیار.

بسیار مفید باشد و راه‌اندازی و استفاده از سیستم‌های خودکار جهت شناسایی و یافتن این سلول‌ها در آزمایشگاه‌های دزسنجی زیستی پیشنهاد می‌گردد.

در روش سنجش ریزهسته تخمین دز عموماً از محدوده دزهای ۰/۲-۰/۵ گری آغاز و به ۵-۴ گری ختم می‌شود. اما با ادغام آن با روش رنگ آمیزی^۱ FISH حداقل تخمین دز به

¹ Fluorescence In Situ Hybridization

۶. مراجع

- [1] O.V. Lyulko, G. Garty, G. Randers-Pehrson, B. Szolc, D. Brenner. Fast image analysis for the micronucleus assay in a fully automated high-throughput biodosimetry system, *Rad. Res.* 181(2) (2014) 146–161.
- [2] E. Ainsbury, E. Bakhanova, J. Barquinero, M. Brai, V. Chumak, V. Correcher, F. Darroudi, P. Fattibene, G. Gruel, I. Guclu, S. Horn, A. Jaworska, U. Kulka, C. Lindholm, D. Lloyd, A. Longo, M. Marrale, O. Monteiro, U. Oestreicher, J. Pajic, B. Rakic, H. Romm, F. Trompier, I. Veronese, P. Voisin, A. Vral, C. Whitehouse, A. Wieser, C. Woda, A. Wojcik. Review of retrospective dosimetry techniques for external ionising radiation exposures. *Radiat. Prot. Dosim.* 147(4) (2011) 573–592.
- [3] M. Maria, N. Frassinetti, A. Amaral. Current status of biodosimetry based on standard cytogenetic methods. *Rad. Res.* 49 (2010) 567–581.
- [4] T. Groesser, E. Chun, B. Rydberg. Relative Biological Effectiveness of HZE Fe Ions for Induction of Micro-Nuclei at Low Doses. *Rad. Res.* 168(6) (2007) 74–157.
- [5] M. Fenech. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov. Today.* 7(22) (2002) 1128–1137.
- [6] M. Fenech. The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* 455 (2000) 81–95.
- [7] M. Fenech, S. Bonassi. The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis.* 26 (2011) 43–49.
- [8] M. Kirsch-Volders, M. Fenech. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis.* 16(1) (2001) 51–58.
- [9] H. Thierens, A. Vral. The micronucleus assay in radiation accidents. *Ann. Ist. Super Sanità.* 45 (3) (2009) 260–264.
- [10] J. Pejchal, V. Vasilieva, M. Hristozova, Z. Vilasov, J. Vvrov, M. Alyakov, A. Tich, L. Zrybnick, Z. Šinkorov, V. Tambor, K. Kubelkov, J. Dresler. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay/CBMN cytome assay in human lymphocytes after in vitro irradiation and its use in biodosimetry. *Mmil. Med. Sci. Lett.* 80 (2011) 28–37.
- [۱۱] ذاکری، فریده. بررسی‌های سیتوژنتیک در تعیین دز پرتو. کتاب راهنما/ آژانس بین‌المللی انرژی اتمی. انتشارات اندیشه ظهور (۱۳۸۳).
- [12] M. Fenech. The lymphocyte cytokinesis-block micronucleus cytome assay and its application in radiation biodosimetry. *Health Phys.* 98(2010) 234–243.
- [13] International Atomic Energy Agency cytogenetic dosimetry: applications in preparedness for and response to radiation emergencies. IAEA-EPR, Vienna, (2011).
- [14] S. Acharya, G. Sanjeev, N. Bhat, Y. Narayana. Dose rate effect of pulsed electron beam on micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 61(2010) 77–83.
- [15] F. Pala, F. Alkaya, K. Tabakcioğlu, F. Tokatli, C. Uzal, S. Parlar, C. Algüneş. The Effects of Micronuclei with Whole Chromosome on Biological Dose Estimation. *Turk. J. Biol.* 32(4) (2008) 283–290.

- [16] M. Di Giorgio, N. Nora, H. Laura. Influence of Age, Sex, and life factors on the spontaneous and radiation induced micronuclei frequencies. Report on co-operative study of national nuclear regulatory of Argentina and IAEA., (1995).
- [17] Y.J. Go, J.H. Shin, K.S. Jeong, S.J. Park, M.H. Lee, D.M. Kwak, O.D. Kwon, S.H. Kim, S.Y. Ryu, C.H. Kim, E.J. Kim, Ch.M. Kang, T.H. Kim. Dose estimation with the calibration of dose-response curve of micronucleus in human peripheral lymphocytes induced by 50MeV proton beams. *I.J.R.R.* 8(4) (2011) 231–236.
- [18] A. Amicis, A. Amati, S. Cristofaro, V. Franchini, M. Franco, E. Regalbuto, F. Lista, S. Sanctis. Dose estimation for dicentric chromosome assay and cytokinesis block micronucleus assay: Comparison between manual and automated scoring in triage mode. *Nato. Otan. STO-MP-HFM-223,456* (2012).
- [19] M. Kinneberg, M. Oleksandra Lyulko. Applications of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay on human lymphocytes: Construction of a calibration curve for use in the rapid automated biodosimetry tool. Report of Columbia University on the rapid automated biodosimetric tool (RABIT) (2010).
- [20] International Atomic Energy Agency Predictive assays and their role in selection of radiation as the therapeutic modality. *IAEA-TECDOC-1297*, (2002).
- [21] S. Acharya, P. Joseph, N. Bhat, G. Sanjeev, Y. Narayana. Assessment of cell damage induced by gamma rays and pulsed electron beam at dose rates. *Indian J. Pure Ap. Phy.* 50 (2012) 474–477.
- [22] P. Atanasova, V. Hadjidekova, A. Staynova, R. Hristova. The micronuclei frequency as a biological dosimeter of absorbed dose in case of radiation accidents. *Trakia J. Sci.* 7(4) (2009) 28–32.
- [23] S. Bonassi, M. Fenech, C. Lando, Y. Lin, M. Ceppi, W. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, M. Paola Bigatti, C. Bolognesi, C. Jia, M. Di Giorgio, L. Ferguson, A. Fucic, O. Garcia Lima, P. Hrelia, A.P. Krishnaja, T. Lee, L. Migliore, L. Mikhalevich, E. Mirkova, P. Mosesso, W. Ulrich Muller, Y. Odagiri, M. Rosaria Scarfö, E. Szabova, I. Vorobtsova, A. Vral, A. Zijno. Human Micronucleus Project: International database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* 37 (2001) 31–45.
- [24] A. Rossnerova, M. Spatova, C. Schunck, R. Sram. Automated scoring of lymphocyte micronuclei by the MetaSystems Metafer image cytometry system and its application in studies of human mutagen sensitivity and biodosimetry of genotoxin exposure. *Mutagenesis.* 26(1) (2011) 169–175.
- [25] M. Ceppi, F. Gallo, S. Bonassi. Study design and statistical analysis of data in human population studies with the micronucleus assay. *Mutagenesis.* 26(1) (2011) 247–252.
- [26] I. Decordier, A. Papine, K. Vande Loock, G. Plas, F. Soussaline, M. Kirsch-Volders. Automated image analysis of micronuclei by IMSTAR for biomonitoring. *Mutagenesis.* 26(1) (2011) 163–168.
- [27] A. Vral, M. Fenech, H. Thierens. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure. *Mutagenesis.* 26(1) (2011) 11–17.
- [28] M. Fenech. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. *Drug Discov. Today.* 7(22) (2002) 1128–1137.
- [29] N. Jamal, N. Bo Nai Lee, R. Abdul Rahim, N. Yusof, H. Talib Hassan, H. Abdul Rahman. A review on current status on cytogenetic biodosimetry methods for radiation dose assessment. *Adv. Biomed. Eng. Phys.* 6(2) (2009) 1128–1137.
- [30] R. Swanson, O. Herd, E. Ainsbury, T. Mabhengu, P. Willem, H. Thierens, J. Slabbert, A. Vral. A semi-automated micronucleus-centromere assay to assess low-dose radiation exposure in human lymphocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 87 (2011) 923–931.