



انجمن حفاظت در برابر اشعه ایران



مجله سنجش و ایمنی پرتو، جلد ۸، شماره ۴، ویژه‌نامه پرتوهای یون‌ساز، ۱۳۹۹، صفحه ۳۲۷-۳۳۲

پنجمین کنفرانس ملی سنجش و ایمنی پرتوهای یون‌ساز و غیر یون‌ساز (مهرماه ۱۳۹۷)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۶/۰۱، تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۰۷/۰۱

دزسنجی زیستی با استفاده از روش سنجش القای شیمیایی تراکم پیش‌رس کروموزومی

زهرا جباری راد^۱ و سید ابوالقاسم حائری^{۲*}

^۱دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

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

*تهران، سازمان انرژی اتمی ایران، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده راکتور، کدپستی: ۱۳۳۹-۱۴۱۵۵

پست الکترونیکی: ahaeri@aeoi.org.ir

چکیده

در سوانح پرتوی مختلف، تخمین میزان دز دریافتی افراد درگیر در سانحه، از اولویت‌های اصلی بوده و لازمه شروع اقدامات درمانی می‌باشد. در موارد پرتوگیری با دزهای بیشتر از ۶ گری، روش معمول سنجش دی‌سانتتیک، کارایی خود را در بیودزیمتری مصدومان پرتوی از دست می‌دهند. در این موارد، روش جایگزین توصیه‌شده، روش تراکم پیش‌رس کروموزومی می‌باشد. نشان داده شده است که شمارش حلقه‌های کروموزومی روش تراکم پیش‌رس کروموزومی، ساده‌تر و مناسب‌تر از روش سنجش دی‌سانتتیک در موارد پرتوگیری با دز بالا می‌باشد. در مطالعه حاضر، منحنی دز-پاسخ بیراهی‌های ناپایدار کروموزومی حلقه در لنفوسیت‌های خون محیطی با استفاده از روش القای شیمیایی تراکم پیش‌رس کروموزومی برای پرتو ایکس در محدوده صفر تا ۱۰ گری تهیه شد. بدین منظور، نمونه‌های خون محیطی ۴ فرد سالم در محدوده صفر تا ۱۰ گری پرتو ایکس پرتودهی شده و مطابق روش توصیه‌شده توسط آژانس بین‌المللی انرژی اتمی برای القای شیمیایی تراکم پیش‌رس کروموزومی، کشت و محصول برداری شدند. پس از مطالعه میکروسکوپی اسلایدها و تعیین تعداد آسیب کروموزومی حلقه در هر نمونه، منحنی دز-پاسخ مربوطه استخراج شد. این منحنی به صورت خطی-درجه دو بوده و قابل بهره‌برداری برای موارد پرتوگیری با دزهای بالا می‌باشد. شمارش بیراهی کروموزومی حلقه در روش شیمیایی تراکم پیش‌رس کروموزومی نیاز به تجهیزات خاصی نداشته و حتی در موارد پرتوگیری‌های فوق‌کشنده نیز قابل استفاده می‌باشد.

کلیدواژگان: تخمین دز، دزیمتری بیولوژیکی، تراکم پیش‌رس کروموزومی، منحنی دز-پاسخ، اشعه ایکس.

۱. مقدمه

در سوانح پرتویی مختلف، تخمین میزان دز دریافتی افراد درگیر در سانحه، از اولویت‌های اصلی بوده و لازمه شروع اقدامات صحیح درمانی می‌باشد [۱]. بررسی میکروسکوپی میزان وقوع بیراهی‌های ناپایدار کروموزومی در کشت لنفوسیت‌های خون محیطی افراد پرتودیده، روشی متداول و استاندارد شده برای تخمین بیولوژیک میزان پرتوگیری می‌باشد که به روش آنالیز متافاز یا سنجش دی‌سانتتیک معروف می‌باشد [۲]. در پرتوگیری‌های بیش از ۶ گری، روش سنجش

تراکم پیش‌رس کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی در محدوده دز صفر تا ۱۰ گری پرتو ایکس می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

تمامی موارد توصیه شده در راهنمای فنی آژانس بین‌المللی انرژی اتمی برای رسم منحنی دز-پاسخ مدنظر قرار گرفته و رعایت شدند [۳].

۱،۲. نمونه‌گیری

با توجه به ملاحظات اخلاقی، پس از اخذ رضایت‌نامه کتبی، با استفاده از سرنگ آغشته به ضد انعقاد هپارین سدیم، ۶ سی سی نمونه خون محیطی از ۴ فرد (دو مرد و دو زن در محدوده سنی 30 ± 5 سال) گرفته شد. افراد انتخاب شده سالم، غیر سیگاری و بدون سابقه ابتلا به هرگونه بیماری حاد یا مزمن بوده و حداقل شش ماه پیش از نمونه‌گیری هیچ‌گونه دارویی استفاده نکرده و پرتوگیری تشخیصی یا درمانی نیز نداشتند.

۲،۲. پرتودهی نمونه‌های خون

هر نمونه خون به صورت مساوی در ۶ میکروتیوب استریل دو میلی‌لیتری تقسیم شده و اطلاعات هر نمونه کدگذاری شد. یک نمونه به عنوان کشت کنترل (صفر گری) و پنج نمونه دیگر برای پرتودهی با دزهای ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ گری در نظر گرفته شدند. بیشینه زمان بین خون‌گیری و پرتودهی یک ساعت بود. لوله‌های حاوی نمونه خون در داخل تانک آب با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و پرتودهی اشعه ایکس با استفاده از دستگاه شتاب‌دهنده خطی در انرژی ۶ مگاولت انجام شد. بلافاصله پس از پرتودهی، نمونه‌ها به مدت دو ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس مراحل کشت سلولی آغاز شد.

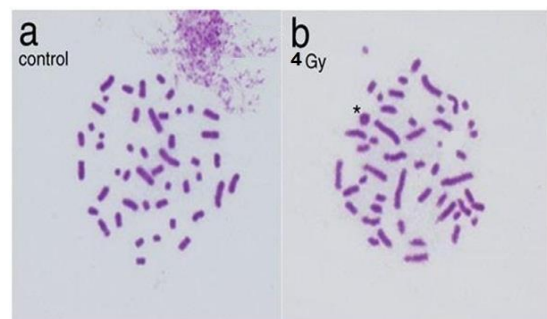
دی‌سانتتیک عملاً کارایی خود را برای تخمین دز از دست می‌دهد. در این موارد، برای غلبه بر محدودیت‌های سنجش دی‌سانتتیک، روش جایگزین توصیه شده توسط آژانس بین‌المللی انرژی اتمی، روش تراکم پیش‌رس کروموزومی^۱ می‌باشد [۳]. در روش تراکم پیش‌رس کروموزومی، کروموزوم‌ها در مرحله ایتترفاز سیکل سلولی وادار به فشرده‌سازی شده و قابل‌رویت می‌شوند و بنابراین، محدودیت‌های روش سنجش دی‌سانتتیک در دزهای بالای پرتو (آپاتوز، مرگ میتوزی، تأخیر میتوزی و توقف سیکل سلولی قبل از ورود به میتوز) برطرف می‌شود [۴]. روش القای شیمیایی تراکم پیش‌رس کروموزومی در لنفوسیت‌ها با استفاده از ماده شیمیایی کالیکولین A بهینه‌سازی شده و جایگزین روش فیوژن برای القای تراکم پیش‌رس کروموزومی شده است [۵]. تحقیقات نشان داده است که شمارش بیراهی‌های کروموزومی حلقه در روش تراکم پیش‌رس کروموزومی شیمیایی حتی در موارد پرتوگیری‌های فوق‌کشنده نیز قابل استفاده بوده و در مقایسه، ساده‌تر و مناسب‌تر از روش دی‌سانتتیک می‌باشد [۶].

با توجه به وجود اختلاف در منحنی‌های کالیبراسیون آزمایشگاه‌های مختلف بیودزیمتری، تفسیر دز با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون سایر آزمایشگاه‌ها باعث افزایش عدم قطعیت در تخمین دز خواهد شد. بنابراین، توصیه آژانس بین‌المللی انرژی اتمی این است که هر آزمایشگاه بیودزیمتری، منحنی دز-پاسخ مختص به خود را تهیه نموده و مورد بهره‌برداری قرار دهد [۳]. تهیه منحنی دز-پاسخ، یکی از مراحل ضروری قبل از بهره‌برداری از روش‌های مختلف بیودزیمتری می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، راه‌اندازی، بهینه‌سازی و تهیه منحنی دز-پاسخ با استفاده از القای شیمیایی

¹ Premature Chromosome Condensation (PCC)

۳،۲. کشت سلولی و آماده سازی کروموزومها

هر میکروتیوب حاوی خون پرتوتابی شده در دو لوله فالکون استریل دارای ۴/۵ سی سی محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۲۰٪ سرم جنین گاو، ۱٪ آنتی بیوتیک (پنی سیلین- استرپتومایسین) و ۵۰ میکروگرم فیتوهمگلوتینین (با غلظت نهایی ۱۰ میکروگرم در هر سی سی محیط کشت) ریخته شده و به مدت ۴۸ ساعت در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. کلمید (غلظت نهایی ۰/۱ میکروگرم در هر سی سی) در ساعت ۴۶ و کالیکولین-A (غلظت نهایی ۵۰ نانومولار در هر سی سی) در ساعت ۴۷ به لوله های کشت اضافه شدند. پس از اتمام ۴۸ ساعت، لوله های کشت ساتریفیوژ شده و سلولها به مدت ۲۰ دقیقه در محلول هیپوتونیک ۰/۰۷۵ مولار کلرید پتاسیم قرار داده شدند. پس از ساتریفیوژ مجدد و خارج نمودن محلول هیپوتونیک، سلولها سه مرتبه با استفاده از مخلوط متانول: اسید استیک گلاسیال (نسبت سه به یک حجمی) مورد تثبیت و شستشو قرار گرفتند. برای تهیه اسلایدها و بهینه نمودن پخش های کروموزومی بر روی اسلایدها، از دستگاه *Metaphase Spreader* استفاده شد. اسلایدها سپس با رنگ گیمسای ۵٪ به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی و لامل گذاری شدند. شکل ۱، نمونه ای از گستره تراکم پیش رس کروموزومی لئوسیت های خون محیطی که با گیمسای رنگ آمیزی شده اند را نشان می دهد.



شکل ۱: القای شیمیایی تراکم پیش رس کروموزومی در لئوسیت ها a: پخش کروموزومی کنترل و بدون آسیب b: سلول پرتودیده و دارای یک بیراهی حلقه (*).

۴،۲. بررسی میکروسکوپی سلولها

با استفاده از میکروسکوپ نوری معمولی، ۵۰۰ سلول دارای پخش کروموزومی مناسب در هر نمونه مورد بررسی قرار گرفتند. سلول های مورد بررسی در فازهای مختلف سیکل سلولی (G1, G2, M and M/A) قرار داشتند. تعداد حلقه (صرف نظر از مرحله سیکل سلولی) در دزهای مختلف اشعه ثبت شده و برای رسم منحنی دز-پاسخ لحاظ شدند.

۵،۲. ملاحظات آماری

تمامی نمونه ها کدگذاری شده و پس از اتمام مطالعه میکروسکوپی، کدها بازیابی شدند. توزیع پواسنی حلقه در سلولها با استفاده از آزمون χ^2 و نسبت واریانس به میانگین (σ^2/Y) تعیین شد. ارتباط دز- پاسخ فرکانس حلقه بر مبنای روش درست نمایی بیشینه^۱ تعیین شد. نیکویی برازش^۲ با استفاده از آزمون χ^2 تعیین شد. برای مقایسه تفاوت میان نمونه دهندگان از روش مقایسه رگرسیون استفاده شد. مقادیر ضرایب منحنی و نیکویی برازش با استفاده از نرم افزار *Dose Estimate* (نسخه ۵/۲) تعیین شدند.

۳. نتایج

۱،۳. تهیه منحنی دز-پاسخ

در صورت رعایت موارد توصیه شده توسط آژانس بین المللی انرژی اتمی، اندیس بالایی از سلول های با تراکم پیش رس کروموزومی مناسب برای بررسی میکروسکوپی به دست خواهد آمد (جدول ۱). تعداد سلول های مورد بررسی به

¹Maximum likelihood method

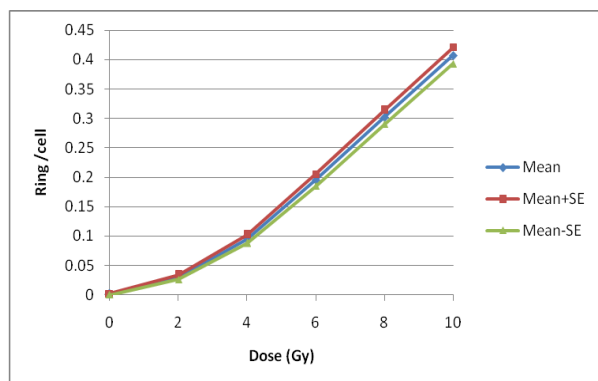
²Goodness of fit

تفکیک دزهای اشعه و توزیع حلقه در سلول‌ها در جدول ۱ خلاصه شده است. همان‌گونه که در جدول ۱ ملاحظه می‌شود، توزیع حلقه در بین سلول‌ها از توزیع پواسون تبعیت می‌نماید.

جدول (۱): میزان بیراهی‌های کروموزومی حلقه پس از تابش دزهای مختلف اشعه ایکس.

PCC index %	σ^2/Y	SE yeild	Yeild	کل حلقه‌ها	توزیع حلقه‌ها						سلول‌های شمارش شده	دز پرتو (Gy)
					۵	۴	۳	۲	۱	۰		
۲۹/۳۲۵	۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۱	۰	۰	۰	۰	۱	۱۹۹۹	۲۰۰۰	۰
۲۸/۳۲۵	۱	۰/۰۰۴	۰/۰۰۳	۵۹	۰	۰	۰	۱	۵۷	۱۹۴۲	۲۰۰۰	۲
۲۸/۱۲۵	۱	۰/۰۰۷	۰/۰۹۵	۱۹۰	۰	۰	۰	۹	۱۷۲	۱۸۱۹	۲۰۰۰	۴
۲۷/۸	۱/۱۳	۰/۰۱	۰/۱۹۵	۳۹۰	۰	۰	۲	۵۸	۲۶۸	۱۶۷۲	۲۰۰۰	۶
۲۶/۹	۰/۹۸۳	۰/۰۱۲	۰/۳۰۲	۶۰۴	۰	۰	۸	۶۲	۴۵۶	۱۴۷۴	۲۰۰۰	۸
۲۵/۵۵	۱/۰۷	۰/۰۱۴	۰/۴۰۷	۸۱۴	۱	۴	۱۷	۱۱۰	۵۲۲	۱۳۴۶	۲۰۰۰	۱۰

ترتیب ۰/۰۳۸ و ۰/۰۰۴۳ محاسبه شد. p-value محاسبه‌شده برای نیکویی برازش منحنی برابر با ۰/۰۹۰۱ بود.



شکل (۲): منحنی دز-پاسخ بیراهی‌های کروموزومی حلقه در دزهای مختلف پرتو ایکس.

محور X منحنی، دز پرتو ایکس تابش شده به نمونه‌ها و محور Y میزان بیراهی‌های ناپایدار حلقه به ازای هر سلول را نشان می‌دهد.

۲،۳. ارزیابی کارایی منحنی دز-پاسخ

رسم منحنی دز-پاسخ در نظر گرفته شدند. برای رسم منحنی دز-پاسخ، ۲۰۰۰ سلول تراکم پیش‌رس کروموزومی در هر دز مورد بررسی قرار گرفته و تعداد حلقه‌های مشاهده شده استخراج شد. با افزایش دز اشعه، افزایش مهمی در تعداد حلقه‌ها رخ داد. منحنی دز-پاسخ ترسیم شده برای فراوانی حلقه‌های مشاهده شده در محدوده دزهای صفر تا ۱۰ گری در شکل ۲ ارائه شده است.

آزمون خی ۲ وزنی، مدل خطی-درجه دو برای منحنی دز-پاسخ را تأیید نمود. ارتباط دز-پاسخ و ضرایب محاسبه شده در رابطه ۱ ارائه شده است.

$$y = (0.0005 \pm 0.0007) + (0.0108 \pm 0.0029) D + (0.0032 \pm 0.0004) D^2 \quad (1)$$

که در این رابطه، y فرکانس حلقه‌ها به ازای هر سلول و D نشان‌دهنده دز پرتو تابانیده شده به نمونه‌ها (برحسب گری) می‌باشد. p-value محاسبه شده برای ضرایب α و β منحنی به

دی‌سانتریک، برای تخمین دز بیولوژیک موارد پرتوگیری با دز بیش از ۶ گری فراهم شد. منحنی دز-پاسخ این تحقیق، هم‌خوانی قابل قبولی با منحنی‌های تهیه شده در تحقیق‌های مشابه را نشان می‌دهد [۸-۱۱].

اندیس سلول‌های قابل بررسی در این روش بسیار بالاتر از اندیس میتوزی در روش دی‌سانتریک می‌باشد و در نتیجه، تعداد بسیار زیادی سلول مناسب برای بررسی میکروسکوپی فراهم می‌گردد. با توجه به کارایی بالای کالیکولین A برای القای تراکم پیش‌رس کروموزومی، نیم سی‌سی خون برای کشت سلولی کفایت نموده و تعداد کافی سلول مناسب برای بررسی میکروسکوپی فراهم می‌نماید [۱۲].

شمارش بیراهی کروموزومی حلقه در مقایسه با سایر بیراهی‌ها نسبتاً ساده‌تر بوده و باعث افزایش سرعت بررسی اسلایدها می‌شود و بنابراین پارامتر مناسبی برای بررسی و استخراج داده‌های دز-پاسخ می‌باشد. هم‌چنین، با توجه به مدت‌زمان لازم برای کشت و مطالعه میکروسکوپی نفوسیت‌ها در سنجش تراکم پیش‌رس کروموزومی، تخمین پرتوگیری ۵۵ تا ۶۰ ساعت پس از دریافت نمونه خون ممکن خواهد بود که زمان قابل قبولی در روند درمان مصدومان پرتوی می‌باشد [۳].

روش تراکم پیش‌رس کروموزومی شیمیایی علاوه بر دارا بودن مزایای روش دی‌سانتریک در تخمین دز، بر محدودیت‌های این روش در تخمین دز موارد پرتوگیری با دز بالای پرتو نیز غلبه نموده است. نشان داده شده است که روش تراکم پیش‌رس کروموزومی قابلیت استفاده در موارد پرتوگیری فوق‌کشنده (حتی موارد تابش‌گیری بیش از ۲۰ گری) را دارا می‌باشد [۱۳].

نتایج این تحقیق نشان داد که روش تراکم پیش‌رس کروموزومی شیمیایی القاشده با کالیکولین A، روشی سریع و نسبتاً ساده برای دزیمتری بیولوژیکی پرتوگیری‌های با دز بالا می‌باشد. از آن‌جا که کشت سلولی در روش سنجش تراکم

به‌منظور ارزیابی کارایی و تأیید اعتبار منحنی دز-پاسخ تهیه شده، دو نمونه خون به‌صورت کدگذاری شده و دز فیزیکی نامعلوم پرتوتابی شده و سپس جهت تخمین دز بیولوژیک به آزمایشگاه ارسال شدند. پس از انجام کشت سلولی و بررسی میکروسکوپی ۵۰۰ سلول در هر نمونه، تخمین بیولوژیکی میزان پرتوگیری با کمک منحنی دز-پاسخ تهیه‌شده انجام شد که نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول (۲): مقایسه دز بیولوژیکی تخمین زده شده با دز فیزیکی تابانیده شده به نمونه‌های نامعلوم.

نمونه	تعداد سلول‌های مورد بررسی	تعداد بیراهی حلقه	دز بیولوژیک تخمین زده شده (گری)	دز فیزیکی تابانیده شده (گری)
۱	۵۰۰	۱۸۱	$9/074 \pm 0/774$	۸
۲	۵۰۰	۷۲	$5/218 \pm 0/594$	۴

همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تخمین بیولوژیکی انجام‌شده با تقریب مناسبی نزدیک به دز فیزیکی بوده و تأییدکننده اعتبار منحنی دز-پاسخ تهیه‌شده می‌باشد.

۴. بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که اشاره شد، روش استاندارد سنجش دی‌سانتریک برای تخمین دز پرتوگیری‌های بیش از ۶ گری کارایی ندارد. با توجه به پیشرفت‌های پزشکی و دارویی، امکان نجات مصدومان پرتوی در پرتوگیری‌های بیش از ۱۰ گری نیز فراهم شده است و بنابراین، نیاز به توسعه روش‌های بیودزیمتری برای تخمین موارد پرتوگیری بیش از ۶ گری کاملاً ضروری می‌باشد [۷].

در این مطالعه، راه‌اندازی، بهینه‌سازی و استخراج داده‌های دز-پاسخ روش شیمیایی تراکم پیش‌رس کروموزومی در محدوده صفر تا از ۱۰ گری به‌عنوان روش جایگزین سنجش

پیش‌رس کروموزومی شیمیایی مشابه روش سنجش دی‌ساتریک می‌باشد، این روش به‌سادگی در آزمایشگاه‌های بیودزیتری قابل‌راه‌اندازی بوده و نیاز به تجهیزات یا امکانات خاصی نمی‌باشد.

۵. مراجع

- [1] United States Government US Army. Medical Consequences of Radiological and Nuclear Weapons, (2013).
- [2] ISO 19238. Radiation protection: Performance criteria for service laboratories performing biological dosimetry by cytogenetics (2014).
- [3] IAEA. Cytogenetic Dosimetry: Application in preparedness for and response to Radiation Emergencies. Emergency Preparedness and Response Series, (2011).
- [4] I. Romero, A.I. Lamadrid, J.E. González, O. García, P. Voisin, L. Roy. Shortening the culture time in cytogenetic dosimetry using PCC-R assay. *Radiation Protection Dosimetry*. 163 (2015) 424-9.
- [5] E. Gotoh, Y. Asakawa, H. Kosaka. Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells. *Biomedical Research*. 16 (1995) 63-68.
- [6] S. Balakrishnan, K. Shirsath, N. Bhat, K. Anjaria. Biodosimetry for high dose accidental exposures by drug induced premature chromosome condensation (PCC) assay. *Mutat Res*. 699 (2010) 11-16.
- [7] R. Puig, L. Barrios, M. Pujol, M.R. Caballín, J.F. Barquinero. Suitability of scoring PCC rings and fragments for dose assessment after high-dose exposures to ionizing radiation. *Mutat Res*. 757 (2013) 1-7.
- [8] I. Romero, A.I. Lamadrid, J.E. González, O. García, P. Voisin, L. Roy. Shortening the culture time in cytogenetic dosimetry using PCC-R assay. *Radiation Protection Dosimetry*. 163 (2015) 424-9.
- [9] R.K. Nairy, N. Yerol, N.N. Bhat, U. Desai, K. Shirsath. Standardization of CalyculinA induced PCC assay and its advantages over Okadaic acid PCC assay in Biodosimetry applications. *J Occup Health*. 58 (2016) 563-9.
- [10] X. Lu, H. Zhao, J.B. Feng, X.T. Zhao. Dose response of multiple parameters for calyculin A-induced premature chromosome condensation in human peripheral blood lymphocytes exposed to high doses of cobalt-60 gamma-rays. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*. 807 (2016) 47-54.
- [11] I. Romero, O. Garcia, A.I. Lamadrid, E. Gregoire, J.E. Gonzalez, W. Morales. Assessment of simulated high-dose partial-body irradiation by PCC-R assay. *J Radiat Res*. 54 (2013) 863-71.
- [12] A.I. Lamadrid, O. García, M. Delbos, P. Voisin, L. Roy. PCC-ring induction in human lymphocytes exposed to gamma and neutron irradiation. *Journal of radiation research*. 48 (2007) 1-6.
- [13] E. Gotoh, Y. Tanno, K. Takakura. Simple biodosimetry method for use in cases of high-dose radiation exposure that scores the chromosome number of Giemsa-stained drug-induced prematurely condensed chromosomes (PCC). *Int J Radiat Biol*. 81 (2005) 33-40.