

آسیب های ژنتیک سلولی در سلولهای گلیوما

## بررسی مقایسه ای میزان آسیب های ژنتیک سلولی ناشی از تابش کبالت - ۶۰ در سلولهای گلیوما در حضور و عدم حضور IUDr

علی نشاسته ریز<sup>۱</sup>، غزال شفائی<sup>۲</sup>، حسین مزدرانی<sup>۳</sup>

۱- دانشیار گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

۳- استاد گروه ژنتیک سلولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۶/۶/۳۱

تاریخ دریافت نسخه اصلاح شده: ۸۶/۶/۱۹

### چکیده

**مقدمه:** گلیوما حدود نیمی از بدخیمی‌های اولیه سیستم اعصاب مرکزی را تشکیل می‌دهد. با وجود پیشرفت در روش‌های جراحی، پرتو درمانی و شیمی درمانی، بهبود عمده‌ای در افزایش بقای بیماران حاصل نشده است. استفاده از ایدودئوکسی یوریدین به عنوان حساس کننده یکی از روش‌های مورد استفاده برای بهبود پرتو درمانی می‌باشد. IUDr، یک آنالوگ تیمیدین است که در فاز سنتز به صورت انتخابی وارد سلول‌های تومور شده و سبب افزایش حساسیت سلول می‌شود.

**مواد و روشها:** در این تحقیق از روش آنالیز متافاز برای بررسی میزان آسیب های ژنتیک سلولی تشدید شده توسط IUDr به غلظت یک میکرومولار و تابش دهی به میزان  $D_0$  برای سلول‌های A172 تحت کشت تک لایه در فاز نمایی و ثابت (به ترتیب ۱/۷ و ۲/۲ گری) استفاده شد.

**نتایج:** تیمار با دارو به تنهایی به میزان قابل ملاحظه‌ای باعث القاء آسیب های ژنتیک سلولی گردید. میزان آسیب های تشدید شده توسط IUDr پس از تابش‌گیری به طور معنی‌داری از میزان تشدید شده در فاز ثابت بیشتر بود. نسبت افزایش حساسیت در دو فاز نمایی و ثابت با استفاده از روش بررسی کولنی<sup>۱</sup> به ترتیب برابر با ۱/۳۶ و ۱/۰۴ و با استفاده از روش آنالیز متافاز به ترتیب برابر با ۲/۴۹ و ۱/۰۵ به دست آمد.

**بحث و نتیجه گیری:** تفاوت نتایج دو روش احتمالاً در فرصت ترمیم سلول‌ها در روش بررسی کولنی می‌باشد. تفاوت نتایج در دو فاز نمایی و ثابت احتمالاً به دلیل تفاوت در میزان برداشت IUDr توسط سلول‌ها می‌باشد. یکی از محدودیت‌های استفاده از IUDr به همراه پرتو دهی وجود سلول‌های  $G_0$  است. اعمال تزریق طولانی و پیوسته IUDr داخل سرخرگ مشروب کننده تومور به جای تزریق وریدی ممکن است نتایج بهتری در برداشته باشد. (مجله فیزیک پزشکی ایران، دوره ۳، شماره ۱۲، پاییز ۸۵: ۷۳-۸۵)

واژگان کلیدی: گلیوما، حساس کننده پرتوی، IUDr، آسیب های سیتوژنتیکی

1-Colony assay

\* نویسنده مسؤول: علی نشاسته ریز

آدرس: گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم

پزشکی ایران، تهران neshastehriz@yahoo.com

تلفن: ۸۸۰۵۴۳۶۱- (۲۱) ۹۸+

## ۱- مقدمه

درمان سرطان همچنان با مشکلات و محدودیت‌های فراوانی مواجه است و به گزارش سازمان بهداشت جهانی<sup>۱</sup>، سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی، دومین عامل مرگ و میر شناخته شده است. امروزه درمان سرطان، سه روش عمده دارد که به تنهایی و یا به صورت ترکیبی استفاده می‌شود. این سه روش عبارتند از: جراحی، شیمی‌درمانی و پرتو درمانی. در برنامه‌های درمانی از پرتودرمانی به عنوان درمان اختصاصی یا تکمیلی استفاده می‌گردد. با توجه به این امر اهمیت پرتودرمانی در درمان سرطان‌های مختلف مشخص می‌شود. استفاده از حساس کننده‌های رادیویی بر این مبنای شکل گرفته است که با استفاده از اثر افتراقی داروی حساس کننده بر روی تومورها، سلول‌های تومور به اشعه حساس شده و آسیب بیشتری می‌بینند.

مناسب‌ترین تومور برای این روش درمانی، به لحاظ نظری، گلیوما می‌باشد [۱]. این تومور بیش از ۵۰ درصد از تومورهای بدخیم سیستم اعصاب مرکزی را تشکیل می‌دهد [۲] و از درجه بدخیمی بسیاری برخوردار است. روش‌های معمول درمانی سرطان در مورد این تومور به طور کامل جواب نمی‌دهد. به لحاظ موقعیت تشریحی تومور در همه موارد جراحی امکان پذیر نیست. از سوی دیگر به دلیل عدم وجود مرز مشخص تومور، در مواردی که امکان جراحی وجود دارد، تخلیه کامل تومور میسر نیست [۳]. شیمی‌درمانی هم به دلیل مقاومت گلیوما در برابر داروهای سیتوتوکسیک در درمان این تومور بی‌تأثیر است [۴].

سقف تحمل پرتو توسط سلول‌های طبیعی مغزی کمتر از ۶۰۰۰ سانتی‌گری است و حتی همین مقدار نیز در یک سوم موارد

سبب آتروفی مغز و بزرگ شدن بطن‌های مغزی می‌شود [۵]. بدین لحاظ ضرورت استفاده از این روش درمانی برای درمان گلیوما مشخص می‌شود. در مورد حساس کننده‌های غیر هیپوکسیک، از جمله IUDR<sup>۲</sup>، ماده حساس کننده در فاز سنتز به جای تیمیدین توسط سلول‌های در چرخه در سیستم‌های مختلف بدن برداشت می‌شود [۶ و ۷]. جایگزینی هالوپیریمیدین در DNA سبب افزایش حساسیت سلول به پرتو می‌شود [۹ و ۸] با توجه به این فرضیه، بایستی نتایج بالینی مناسبی با استفاده از این روش موجود باشد.

در سال ۱۹۹۳ تحقیقات اورتاسون، تقیان و بوداج استفاده از هالوپیریمیدین‌ها را کاملاً ناامیدانه معرفی کرده‌اند [۱۰، ۱۱]. تحقیقات فولتون، اورتاسون و دلرو در همان سال این نتایج را تأیید کردند [۱۱-۱۳]. این در حالی است که نتایج لورنس، میلر و سولیوان استفاده از این مواد را قابل قبول و موجه معرفی نمودند [۱۴، ۱۵]. تا جایی که اورتاسون، کینسلا و فارنان همچنین لیستادت به کلی استفاده از این مواد را در درمان گلیوما بسیار پیچیده و گمراه کننده خواندند و تصمیم‌گیری در مورد اثر بخشی یا عدم اثر بخشی آن را مشکل ارزیابی کردند [۱۲]. این نتایج ضد و نقیض، تصمیم‌گیری درباره تأثیرگذاری این دارو را بسیار مشکل می‌سازد.

در این تحقیق هدف آن است که با انجام مطالعات ژنتیک سلولی، میزان تأثیر داروی IUDR را بر روی یک خط سلولی منشعب از گلیوما به هنگام پرتودهی در حضور یا عدم حضور دارو مورد بررسی قرار داده و میزان صدمات ژنتیک سلولی وارده برآورد گردد. این مطالعه محدودیت‌های استفاده از این دارو را شناسایی و روش‌های بهبود آنرا ارائه می‌دهد.

2-Deoxy Uridin Iodo

1- WHO

آسیب های ژنتیک سلولی در سلولهای گلیوما

## ۲- مواد و روشها

### ۱-۲ کشت سلول

در این تحقیق از خط سلولی A172 با منشأ گلیوما که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شده بود، استفاده شد. این خط سلولی در سال ۱۹۷۲ توسط جیارد و همکارانش تهیه شده بود [۱۶]. محیط کشت مورد استفاده Minimum Essential Medium (MEM) شرکت (Gibco) بود. سلولها به صورت کشت تک لایه در فلاسکهای ۲۵ سانتی متر مکعب (Falcon) و ۷۵ سانتی متر مکعب (Nunc) در انکوباتور<sup>۱</sup> در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و غلظت دی اکسیدکربن برابر ۵ درصد و رطوبت ۹۵ درصد حد اشباع نگه‌داری شدند. محیط کشت همراه با آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین و استرپتومایسین به غلظت ۱۰۰ واحد بین المللی در میلی لیتر همراه با سرم جنین گاوی با غلظت ۱۰ درصد مورد استفاده قرار گرفت. برای استفاده از سلولها در فواصل زمانی، ذخیره سلولی در دمای ۱۹۶ °C - نگه‌داری شد. این روش در دو مرحله صورت گرفت.

۱- فاز نمایی<sup>۲</sup>: این مرحله پس از گذشت یک یا دو بار زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی از فاز تأخیری شروع شد.  
۲- فاز ثابت<sup>۳</sup>: پس از فاز نمایی، به دلیل ممانعت تماسی، سلولها امکان تقسیم را از دست می‌دهند. سلولها در این فاز از چرخه سلولی خارج و به فاز G<sub>0</sub> وارد می‌شوند.  
هر بار پس از کندن سلولهای چسبیده به ظرف به وسیله تریپسین، سلولها را شمارش کرده و به تعداد ۱۰<sup>۵</sup> سلول در فلاسک ۷۵ سانتی متر مکعب حاوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ FCS کشت داده شدند.

### ۲-۲ محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی

تعداد ۱۰<sup>۵</sup> سلول در هر خانه از صفحه ۲۴ خانه‌ای (NUNC) معلق در ۱ میلی لیتر از محیط کشت حاوی ۱۰٪ FCS کاشته شد. در فواصل ۲۴ ساعته، سلولهای ۳ خانه مورد شمارش قرار گرفتند و این شمارش به مدت ۱۴ روز انجام پذیرفت. محیط کشت خانهها هر روز تعویض شد. برای محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی<sup>۴</sup> با در نظر گرفتن نقاط ابتدایی و انتهایی در قسمت خطی منحنی از رابطه زیر استفاده شد.

$$PDT = \frac{T_H - T_i}{3.32(\log N_H - \log N_i)} \quad (1)$$

که در آن T<sub>H</sub> زمان نقطه انتهایی و T<sub>i</sub> زمان نقطه ابتدایی، N<sub>H</sub> تعداد سلول شمارش شده در نقطه انتهایی و N<sub>i</sub> تعداد سلول شمارش شده در نقطه ابتدایی می‌باشد [۱۷].

### ۳-۲ محاسبه بازده کشت<sup>۵</sup>

برای محاسبه بازده کشت سلولی، تعداد متفاوتی از سلولهای منفرد به ۶ فلاسک ۲۵ سانتی متر مکعب که هر کدام حاوی ۵ میلی لیتر محیط کشت حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی بودند منتقل و سپس به مدت یک هفته داخل انکوباتور قرار داده شدند. پس از این مدت زمان کولنی‌های ایجاد شده رنگ آمیزی شدند. تجمع سلولی بیش از ۵۰ سلول به عنوان یک کولنی در نظر گرفته شد. برای رنگ آمیزی از رنگ کریول فوشین ۱۰٪ (مرک) استفاده شد. کولنی‌های فیکس و رنگ شده هر فلاسک توسط میکروسکوپ معکوس شمارش گردید.

4- Population Doubling Time (PDT)  
5- Plating Efficiency

1- Memmert  
2- Exponential  
3- Plateau

## ۲-۴ تابش دهی

برای تابش دهی سلول‌ها در فاز نمائی و ثابت، فلاسک‌ها در ظرف عایق قرار داده شده به اتاق کبالت منتقل گردیده توسط دستگاه کبالت ۶۰ (Thecratron 780) با آهنگ دوز ۱۵۰ سانتی گری بر ثانیه برای دوز ۱۰-۲۰ گری تحت تابش قرار گرفت.

## ۲-۵ محاسبه $D_0$

از قسمت خطی منحنی بقا، شیب منحنی توسط نرم افزار Jandel Scientific به دست آمد.

## ۲-۶ تیمار دارویی با IUDr

به منظور آماده کردن نمونه هایی که با IUDr تیمار شده‌اند، قبل از انجام آزمایش سلول‌ها به مدت یک زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی با دارو تیمار شدند. برای هر بار تیمار دارویی، ۵۰ میکرولیتر از محلول ۱۰ میکرومولار داروی IUDr در محلول بافر پتاسیم به محیط کشت داخل فلاسک اضافه شد. سپس فلاسک‌ها به مدت یک زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی داخل انکوباتور  $CO_2$  قرار داده شدند.

## ۲-۷ تأثیر توأم IUDr و اشعه گامای کبالت ۶۰ بر نسبت

### بقا سلول‌ها

نمونه‌های تیمار شده با دارو و کنترل در دو فاز نمایی و ثابت، به ترتیب تحت تابش  $D_0$  مربوط به فاز نمایی و ثابت قرار گرفتند. سپس نسبت بقا در هر دوز از رابطه تعریف شده محاسبه گردید.

## ۲-۸ آنالیز متافاز

۲۴ ساعت پس از تیمار سلول‌ها با دارو و تابش گاما، ۲۰۰ میکرولیتر کلسمید (Roche) به هریک از فلاسک‌ها اضافه شد.

پس از ۳ ساعت انکوباسیون فلاسک‌ها در انکوباتور  $CO_2$  سلول‌ها تریپسینه شدند. پس از سانتریفوژ، محلول رویی در شرایط استریل دور ریخته شد. سپس ۵ میلی لیتر محلول ۰/۰۴ مولار کلرور پتاسیم به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد و لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه داخل انکوباتور نگهداری شدند سپس ۵ میلی لیتر ثابت کننده تازه تهیه شده متانول / اسید استیک (به نسبت ۱/۳) که به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $20^{\circ}C$  - نگهداری شده بود، قطره قطره به آنها اضافه شد. در همین حین لوله‌ها مرتباً تکان داده شدند. پس از دو دقیقه سانتریفوژ نمونه‌ها با دور ۱۰۰ گرم محلول رویی دور ریخته شد و توسط دستگاه ورتکس مجدداً به حالت سوسپانسیون در آمدند سپس به آرامی پنج میلی لیتر ثابت کننده به آنها اضافه شد و مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $20^{\circ}C$  - درجه سانتی گراد نگهداری شدند. مجدداً مدت دو دقیقه با ۱۰۰ گرم سانتریفوژ شدند و محلول رویی دور ریخته شد. یک میلی لیتر ثابت کننده سرد به هر یک از آنها افزوده شده و مجدداً توسط دستگاه ورتکس مخلوط شدند.

نمونه‌های سلولی در مقابل جریان بخار آب از فاصله ۵۰ - ۴۰ سانتی متری، قطره قطره به روی لام چکانده شدند. لام‌ها به شدت تکان داده شدند. مجدداً چند قطره ثابت کننده سرد به همان روش روی آنها چکانده شد. پس از خشک شدن لام‌ها، از رنگ گیمسای ۵ در صد برای رنگ آمیزی استفاده شد. پس از شستشو، لام‌ها توسط میکروسکوپ با بزرگنمایی شیئی ۱۰ برابر مورد بررسی قرار گرفتند. سلول‌های متافازی نشانه‌گیری شدند و سپس با بزرگنمایی شیئی ۱۰۰ برابر و روغن امرسیون از نظر شکست‌های کروموزومی مورد بررسی قرار گرفتند. برای هر فلاسک ۱۰۰ سلول متافازی از نظر آسیب‌های ژنتیک سلولی مطابق روش استاندارد سوج [۱۸] بررسی شدند. این آزمایش ۳ بار تکرار شد.

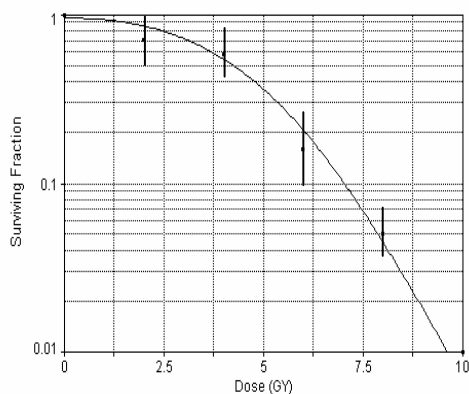
### ۲-۳ محاسبه بهره کشت

بهره کشت پس از شمارش کولنی های حاصل از کشت سلول های منفرد به دست آمد که بیشترین بهره کشت در فلاسک های ۲۵ سانتی متر مربع به ازای ۵۰۰ سلول برابر ۶۹ در صد بود.

### ۳-۳ بررسی اثر تابش با گامای کبالت ۶۰ بر سلولها

کلیه نتایج این بخش بر مبنای توانایی کولنی زایی سلول های تابش دیده و کنترل بدست آمد. کولنی های بدست آمده از نمونه های تابش دیده، نسبت به کولنی های به دست آمده از نمونه های تابش ندیده، از تراکم کمتری برخوردار بودند. نسبت بقا به ازای دوزهای مختلف محاسبه شد. شکل ۱ و ۲ نشان دهنده اثر تابش گامای کبالت ۶۰ بر سلول های کشت تک لایه در دو فاز نمایی و ثابت است. مقدار  $D_0$  از شیب خط در قسمت خط منحنی محاسبه شد که برای سلول های فاز نمایی برابر با ۱/۷ گری و برای سلول های فاز ثابت برابر با ۲/۲ گری بود.

Surviving Curve For Exponential Phase



شکل ۱: منحنی بقا سلولی برای سلول های A172 فاز نمایی

### ۹-۲ محاسبه نسبت افزایش حساسیت<sup>۱</sup> برای داروی

#### IUdR

برای سلول ها در دو فاز نمایی و ثابت، ضریب افزایش حساسیت (SER) از دو رابطه زیر بدست آمد.

$$SER = \frac{\text{تعداد سلول های کاشته شده} / \text{تعداد کولنی های تشکیل شده در حضور IUdR}}{\text{تعداد سلول های کاشته شده} / \text{تعداد کولنی های تشکیل شده در عدم حضور IUdR}}$$

$$SER = \frac{\text{تعداد آسیب های ژنتیک سلولی القا شده در حضور IUdR}}{\text{تعداد آسیب های ژنتیک سلولی القا شده در عدم حضور IUdR}}$$

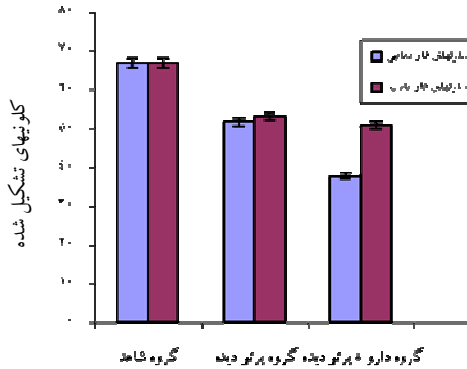
### ۱۰-۲ آنالیز آماری

برای بررسی نتایج بدست آمده در این مرحله، از آزمون ANOVA، ابتدا داده ها در هر جدول با استفاده از آزمون One – Sample Kelmegorov-Smirnov از نظر طبیعی بودن توزیع بررسی شدند.

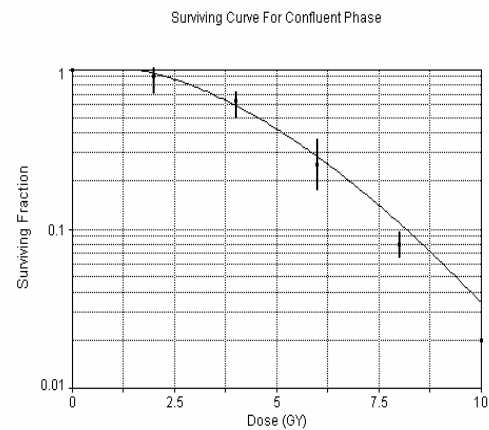
### ۳- نتایج

#### ۱-۳ محاسبه زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی

مطابق روش شرح داده شده در بخش مواد و روش ها شمارش های سلولی انجام شد. با استفاده از فرمول ۱، زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی ۳۱/۹ ساعت محاسبه گردید.



شکل ۳: بقای سلول‌های A172 در نمونه‌های شاهد و تیمار شده با IUDR به تنهایی و همراه با پرتو گاما به میزان ۱/۷ گری در فاز نمایی و ۲/۲ گری در فاز ثابت



شکل ۲: منحنی بقا سلولی برای سلول‌های A172 فاز ثابت

مقادیر SER با استفاده از فرمول ۳ برای دو فاز نمایی و ثابت سلول‌ها محاسبه شد که در هر دو معادل ۱/۰۴ بدست آمد.

### ۳-۵ اثر داروی IUDR به تنهایی و همراه با تابش گاما بر آنالیز متافاز سلول‌های A172

کشت کروموزومی در دوفاز نمایی و ثابت در چهار گروه شاهد، تیمار شده با دارو، پرتو دیده، دارو به علاوه پرتو دیده انجام شد و سپس آسیب‌های ژنتیک سلولی ارزیابی شدند. در تمام جداول مقادیر P در گروه‌های تیمار شده با دارو و پرتو دیده در مقایسه با گروه شاهد است مقادیر P مربوط به گروه دارو به علاوه پرتو دیده به ترتیب در مقایسه با گروه شاهد، گروه تیمار شده با دارو و گروه پرتو دیده می باشد.

جدول ۱: تعداد آسیب‌های ایجاد شده در چهار گروه شاهد، تیمار شده با دارو، پرتو دیده و پرتو دیده به علاوه دارو به ازاء هر ۱۰۰ سلول از فاز نمایی

نمونه‌ها	دی‌ستریک	حلقه‌ها	حذف‌های کروماتیدی	حذف‌های کروموزومی	حلقه‌های آستریک	کل آسیب‌ها
شاهد	۴/۶	۰	۹/۶	۴	۸/۶	۲۷/۶
IUDR	۱۳/۶	۰/۳	۳۷/۶	۱۷	۸/۶	۷۷/۳
<sup>60</sup> Co	۳۵/۶	۳/۳	۱۰/۳	۲۱/۳	۱۶	۸۳/۳
IUDR+ <sup>60</sup> Co	۵۵/۶	۴/۶	۵۷/۶	۴۸/۶	۴۹/۳	۲۱۶

### ۳-۴ اثر تابش گاما بر توانایی کولنی‌زایی سلول‌های تیمار شده با دارو

همانطورکه در شکل ۳ نشان داده شده است بهره کشت سلول‌های A172 در فاز نمایی ۶۶۹ می‌باشد که تحت تأثیر ۱/۷ گری تابش گاما (D<sub>0</sub>) به ۵۱/۷ کاهش یافته است. در همین فاز، تابش گاما، بهره کشت سلول‌های تیمار شده با دارو را به ۳۷/۸ رسانده است. به همین ترتیب بهره کشت سلول‌های A172 در فاز ثابت ۶۷ می‌باشد که تحت تأثیر ۲/۲ گری تابش گاما (D<sub>0</sub>) به ۵۳/۱ و تحت تأثیر IUDR و تابش گاما به ۵۰/۹ تقلیل می‌یابد.

جدول ۲: تعداد آسیب‌های ایجاد شده در چهار گروه شاهد، تیمار شده با دارو، پرتو دیده و پرتو دیده به علاوه دارو به ازاء هر ۱۰۰ سلول از فاز ثابت

نمونه‌ها	دی‌ستریک	حلقه‌ها	حذف‌های کروماتیدی	حذف‌های کروموزومی	حلقه‌های آستریک	کل آسیب‌ها
شاهد	۴/۶	۰	۹/۶	۴	۹	۲۶/۶
IUDR	۵/۶	۰/۳	۱۰/۶	۵	۹	۳۱
<sup>60</sup> Co	۱۷/۳	۱/۳	۹/۶	۱۱/۶	۱۲/۳	۵۲/۳
IUDR+ <sup>60</sup> Co	۱۷/۶	۱/۳	۱۲	۱۲	۱۲/۶	۵۵

این دارو به مدت ۹۶ ساعت، بقای ۴ ساله بیماران به میزان ۴۶ درصد را مشاهده کردند [۲۴]. تحقیقات اورتاسون در سال ۱۹۹۴ و سولون در سال ۱۹۹۶ نیز همین نتایج را تأیید کردند [۲۰،۲۵،۱۲]. این در حالی است که تقیان و بوداج در سال ۱۹۹۳ و رود ریگزر در سال ۱۹۹۴ استفاده از هالوپیریمیدین‌ها را کاملاً ناامید کننده معرفی کرده بودند [۱۳]. اخیراً تحقیقات در کاربرد حساس کننده‌ها با پایه هالوپیریمیدین‌ها بصورت خوراکی نتایج مثبتی در درمان گلیوما در حیوانات آزمایشگاهی نشان داده است [۹].

آنالیز متافاز روش قابل اطمینانی که اثرات ترکیبی دارو و پرتو را نشان دهد. در این روش صدمات با مشاهده مستقیم تشخیص داده می‌شوند و آسیب‌ها کمی بوده و قابل مقایسه‌اند [۸،۱۸]. در این تحقیق آزمایش‌ها در دو مدل کشت سلولی در فاز نمایی و ثابت انجام شد. در فاز نمایی به دلیل مهیا بودن شرایط لازم برای رشد، سلول‌ها از قدرت تقسیم بالا برخوردارند و اکثراً در چرخه سلولی هستند. اما در فاز ثابت، به دلیل ممانعت تماسی، سلول‌ها امکان تقسیم ندارند و از چرخه خارج شده در فاز G<sub>0</sub> هستند. از آنجا که مقاومت پرتوی در شرایط تقسیم شونده و G<sub>0</sub> متفاوت است لزوم انجام آزمایش‌ها در دو فاز نمایی و ثابت مشخص می‌شود.

نتایج بدست آمده نشان داده است که بهره کشت برای ۵۰۰ سلول در شرایط این تحقیق به بیشترین مقدار رسیده است. با

مقایسه تعداد کل آسیب‌ها در دو فاز نمایی و ثابت در دو گروه شاهد تفاوت معنی دار نشان نداد (P=۰/۸) در هر سه گروه تیمار شده با دارو، گروه پرتو دیده و گروه دارو به علاوه پرتو دیده، بین دو فاز تفاوت معنی دار وجود دارد (P<۰/۰۰۰۱). مقادیر SER با استفاده از فرمول ۴ برای داروی IUDR در فاز نمایی برابر با ۲/۴۹ و در فاز ثابت برابر با ۱/۰۵ به دست آمد.

#### ۴- بحث و نتیجه گیری

گلیوما بیش از ۵۰ درصد از بدخیمی‌های سیستم اعصاب مرکزی را تشکیل می‌دهد و از درجه بدخیمی بسیار بالایی برخوردار است [۱۰]. بقای بیماران از هنگام تشخیص بین ۶ تا ۱۲ ماه می‌باشد محدودیت‌هایی چون موقعیت تومور و عدم وجود مرز مشخص بین تومور و سلول‌های سالم مغزی امکان درمان قطعی گلیوما را توسط جراحی سلب می‌کند. نتایج بالینی استفاده از IUDR به‌عنوان تشدید کننده اثر پرتو، بسیار ضد و نقیض بوده است، در آزمایش‌هایی که در سال‌های ۱۹۶۸ و ۱۹۷۴ در ژاپن انجام شد، با استفاده از تزریق دارو توسط کاتتر به نزدیک‌ترین سرخرگ مشروب کننده تومور، بهبود عمده بقای یک ساله ۶۸ درصد، بقای دو ساله ۴۴ درصد و بقای سه ساله ۱۸ درصد در میان ۴۸ بیمار مشاهده شد [۱۹،۲۰]. این نتایج در سال‌های ۱۹۸۴ و ۱۹۸۵ تأیید شدند [۲۱،۲۲،۲۳]. در سال ۱۹۹۸ پرادوس و همکاران با تزریق

افزایش تعداد سلولها، بهره کشت کاهش یافته است که به علت روی هم افتادگی کولنی‌ها بوده است. بقای سلولی با افزایش دوز پرتو در هر دو فاز نمایی و ثابت کاهش نشان داده است (شکل ۱ و ۲).

این نتایج با گزارش‌های قبلی در مورد سلول‌های دیگر در توافق بود [۸]. مرگ سلولی در بالاترین دوز اعمال شده پرتو بیش از ۹۰٪ رسید [۱۷].  $D_0$  به عنوان پارامتری برای مقایسه حساسیت سلول‌ها نسبت به پرتو شناخته شده است.  $D_0$  به دست آمده از منحنی‌های بقا (شکل ۳) در فاز ثابت نسبت به فاز نمایی افزایش معنی داری نشان داده است. توجیه این مطلب تفاوت حساسیت پرتوی سلول‌های تقسیم شونده و  $G_0$  است [۸].

با توجه به مطالعات انجام شده توسط الیو در سال ۱۹۹۲ [۳۲] و همچنین گزارش ولورنس و همکاران در سال ۱۹۹۰ [۲۶]، میلر و همکاران در سال ۱۹۹۲ [۱۵] که نشان داده بودند که برداشت IUDR توسط سلول‌های توموری منشعب از گلیوما در غلظت یک میکرومولار به حد اشباع می‌رسد، غلظت مورد استفاده در این تحقیق نیز یک میکرومولار انتخاب گردید. تعداد کروموزوم-ها در خط سلول A172 بسیار متفاوت بود که با گزارش‌های قبلی نیز در توافق بود [۱۶].

با توجه به جداول ۱ و ۲ سلول‌ها در فاز نمایی در حال تقسیم مداوم هستند، تیمار با دارو به تنهایی می‌تواند صدماتی از نوع دی‌سنتریک، حذف‌های کروماتیدی و حذف‌های کروموزومی القا کند که تمامی این آسیب‌ها با آسیب‌های ایجاد شده در گروه شاهد از نظر آماری معنی دار می‌باشند اما صدماتی چون حلقه‌های آسنتریک را القا نمی‌کند. اما در فاز ثابت سلول-ها خارج از چرخه سلولی می‌باشند (فاز استراحت)، تیمار با دارو به تنهایی می‌تواند آسیب‌های از نوع حذف‌های کروماتیدی ایجاد کند، صدماتی از نوع دی‌سنتریک، حلقه،

حذف‌های کروموزومی و حلقه‌های آسنتریک را القا نمی‌نماید. آسیب‌های مشاهده شده با دارو در مقابله با آسیب‌های مشاهده شده با گروه شاهد تفاوت آماری معنی داری را نشان نمی‌دهد. این در حالی است که آت و همکاران در سال ۱۹۹۸ [۲۷] فاوول و زانکل در سال ۱۹۹۹ [۲۸]، القاء حذف‌های کروموزومی و کروماتیدی توسط IUDR را در لنفوسیت‌های انسان گزارش کرده‌اند. علت این تفاوت احتمالاً در تفاوت حساسیت لنفوسیت‌ها و سلول‌های A172 می‌باشد و یا ممکن است مطابق گزارش آت و همکاران علت تفاوت در میزان برداشت دارو بوده باشد [۲۷]. از آنجا که میزان مدت تیمار دارویی در این سه تحقیق متفاوت است، همچنین به دلیل بیشتر بودن حجم DNA در سلول‌های A172، امکان تفاوت در برداشت دارو توسط سلول‌ها در این سه تحقیق وجود دارد.

پرتو دهی در فاز نمایی انواع آسیب‌های دی‌سنتریک، حلقه، حذف کروموزومی و حلقه آسنتریک را القا می‌نماید که تفاوت تمامی این آسیب‌ها با آسیب‌های ایجاد شده در گروه شاهد از نظر آماری معنی دار می‌باشد، اما حذف کروماتیدی القا نمی‌شود و آسیب‌ها از این نوع نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی دار ندارد. در فاز ثابت نیز دی‌سنتریک، حلقه، حذف کروموزومی و حلقه آسنتریک القا می‌شود و تفاوت تمامی این آسیب‌ها نسبت به آسیب‌های گروه شاهد از نظر آماری معنی دارند. در فاز ثابت نیز آسیب حذف کروماتیدی القا نشده است و آسیب‌ها از این نوع نسبت به گروه شاهد تفاوت معنی داری را نشان نمی‌دهند و وقوع آسیب‌های کروموزومی نه کروماتیدی توسط پرتو، در پرتو دهی در فاز  $G_1$  با گزارش‌های قبلی در توافق بود [۳۴، ۸]. همراهی دارو و پرتو در فاز نمایی کلیه آسیب‌ها را نسبت به هر سه گروه افزایش داده است آسیب‌ها در گروه دارو به علاوه پرتو دیده نسبت به هر سه گروه شاهد تیمار شده با دارو و پرتو



## آسیب های ژنتیک سلولی در سلولهای گلیوما

فاز نمایی در این تحقیق می باشد. این تفاوت احتمالاً به سبب حساسیت بیشتر لنفوسیت های سالم به پرتودهی نسبت به سلول های گلیوما است.

SER محاسبه شده به روش آنالیز متافاز در فاز نمایی برابر ۲/۴۹ و در فاز ثابت برابر ۱/۰۵ به دست آمد. تفاوت این نتایج با نتایج بدست آمده از بررسی کولنی احتمالاً به این علت است که اولاً روش اول یک روش غیر مستقیم است در حالی که روش دوم یک روش مستقیم است.

در روش اول امکان ترمیم برای سلول ها وجود دارد، اما در روش دوم چنین زمانی به سلول ها داده نشده است. همچنین آسیب های ژنتیک سلولی برآورد شده در برخی سلول ها بسیار شدید بودند در حالی که در برخی سلولها اصلاً صدمه ای دیده نمی شد، که علت آن ممکن است تفاوت در میزان برداشت دارو توسط سلول های مختلف باشد. وجود سلول هایی که شدیداً صدمه دیده بودند میزان کل آسیب ها را افزایش داده بود. از تفاوت های معنی دار بین دوزهای نمایی و ثابت از کشت که مدلی از سلول های تقسیم شونده و سلول های فاز  $G_0$  هستند، چنین بر می آید که احتمالاً میزان برداشت متفاوت IUDR در سلول های در چرخه در مقایسه با سلول های خارج چرخه سبب این تفاوت شده باشد.

گرچه میزان SER در سلول های فاز  $G_0$  بیشتر از یک است، اما این مقدار به میزان معنی داری کمتر از SER سلول های تقسیم شونده است. اثر بخشی داروی IUDR برای سلول های تقسیم شونده به طور معنی داری بیشتر از سلول های فاز  $G_0$  است. بنابر این محدودیت اصلی این روش غلبه بر سلول های فاز  $G_0$  می باشد. برای غلبه بر این مشکل می توان مدت مجاورت با دارو و سلول ها را افزایش داد، اما از سوی دیگر برداشت دارو به تنهایی سبب القاء آسیب ها می شود و حتی گزارش شده که می-

دیده از نظر آماری تفاوت معنی دار دارند، به جز آسیب حلقه که در مقایسه با گروه پرتو دیده افزایش نداشته است. از این نتایج چنین استنباط می شود که همراهی دارو و پرتو کلیه صدمات را تشدید کرده اما آسیب از نوع حلقه را تشدید نکرده است. تفاوت نتایج در دو فاز احتمالاً به سبب تفاوت در برداشت IUDR توسط سلول ها در این دو فاز است.

SER محاسبه شده با استفاده از بررسی کولنی برای فاز نمایی برابر با ۱/۳۶ و برای فاز ثابت برابر با ۱/۰۴ به دست آمد. والرئ در سال ۱۹۹۲ در شرایط مشابه برای یک رده سلولی دیگر منشعب از گلیوما این مقدار را برابر ۱/۱۲ در فاز نمایی گزارش کرده بود [۲۹]. در هر دو این مطالعات اثر بخشی مشاهده شده است که در تأیید نتایج بدست آمده می باشد. میزان کل آسیب ها در فاز نمایی (جدول ۱) نشان می دهد که هم دارو هم پرتو آسیب های ژنتیک سلولی القا می کند، و همراهی دارو با پرتو این صدمات را تشدید می کند، این میزان در فاز ثابت (جدول ۲) نیز همین نتایج را بدست می دهد. فرانکن در دو تحقیق متفاوت در سال ۱۹۹۹ [۳۰، ۳۱]، تشدید آسیب های ژنتیک سلولی در کروموزوم Y و X در لنفوسیت های انسان در فاز نمایی از کشت به میزان به ترتیب ۱/۸ و ۱/۳ در تابش دهی به میزان ۲ گری را گزارش کرده بوده SER به دست آمده در این تحقیق برای کل آسیب ها در فاز نمایی ۲/۴۹ بوده. تفاوت این یافته ها ممکن است به علت تفاوت میزان تابش دهی و نیز تفاوت در حجم کروموزوم های این دو رده سلولی باشد. به علاوه تحقیق فرانکن فقط بر روی دو کروموزوم انجام شده، اما در این تحقیق کلیه آسیب های وارده به کلیه کروموزوم ها بررسی شده است.

گزارش باریا در سال ۲۰۰۲ [۳۲]، القای ۱۴/۶ صدمه در هر ۱۰۰ سلول به ازای هر ۰/۵ گری پرتودهی به لنفوسیت های بیماران مبتلا به سرطان ریه انسان دارد که کمتر از نتایج بدست آمده در

پیشنهاد می‌شود به جای آن از روش تزریق داخل نزدیک‌ترین سرخرگ مشروب کننده تومور استفاده شود.

تواند به القاء لوکمی منجر شود [۳۳]. از این رو در افزایش زمان مجاورت دارو و سلول‌ها نیز محدودیت وجود دارد. در مجموع بنظر می‌رسد که تزریق وریدی روش اثر بخشی نباشد و

## منابع

1. Kinsella TJ, Collins J, Rowland J, et al, Pharmacology and phase I/II study of continuous intravenous infusions of iododeoxyuridine and hyperfractionated radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol*. 1988 ,6(5):871-9 .
2. Sullivan FJ, Herscher LL, Cook JA, et al. National Cancer Institute (phase II) study of high-grade glioma treated with accelerated hyperfractionated radiation and iododeoxyuridine: results in anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1994 15; 30(3):583-90 .
3. Wernch. Central Nervous system tumors. Wernch, churchil livingstone. 2nd Eddition (2000)
4. Phillips PC. Antineoplastic drug resistance in brain tumors. *Neurol Clin*. 1991 9(2):383-404.
5. Leibel SA, Scott CB, Loeffler JS. Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas with radiation therapy. *Semin Oncol*. 1994 ; 21(2):198-219
6. Kortylewicz B, Nearman J. DNA uptake of 131-iododeoxyuridine. *J Nucl Med*. 2005, 46(5):898-9.
7. Xu Y, Jagtap MR, Garland T. Iododeoxyuridine uptake in proliferating smooth muscle cells in vitro. *J Vasc Interv Radiol*. 2007, 18(1 pt 1):73-8.
- ۸ دکتر حسین مزارانی. رادیوبیولوژی برای رادیولوژیست (ترجمه). ویرایش پنجم، جلد‌های اول و دوم. دانشگاه تربیت مدرس (۱۳۸۰ و ۱۳۸۱)
9. Taghian A, Suit H, Pardo F, et al, In vitro intrinsic radiation sensitivity of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1992; 23(1):55-62.
10. Saif MW, Berk G, Cheng YC. A novel oral radiosensitizer. *Expert Opin Investig Drugs* 2007, 16(9):1415-24.
11. Urtasun RC, Cosmatos D, DelRowe J, Iododeoxyuridine (IUdR) combined with radiation in the treatment of malignant glioma: a comparison of short versus long intravenous dose schedules (RTOG 86-12). *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1993, 30; 27(2):207-14.
12. Urtasun RC, Kinsella TJ, Farnan N, et al, Survival improvement in anaplastic astrocytoma, combining external radiation with halogenated pyrimidines: final report of RTOG 86-12, Phase I-II study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1996 ,1; 36(5):1163-7.

13. Taghian A, Ramsay J, Allalunis-Turner J, et al, Intrinsic radiation sensitivity may not be the major determinant of the poor clinical outcome of glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993, 15; 25(2):243-9 .
14. Sullivan FJ, Herscher LL, Cook JA, et al. National Cancer Institute (phase II) study of high-grade glioma treated with accelerated hyperfractionated radiation and iododeoxyuridine: results in anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994 15; 30(3):583-90 .
15. Miller EM, Fowler JF, Kinsella TJ. Linear-quadratic analysis of radiosensitization by halogenated pyrimidines. I. Radiosensitization of human colon cancer cells by iododeoxyuridine. *Radiat Res.* 1992 ; 131(1):81-9 .
16. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al, In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973 ; 51(5):1417-23.
17. Manfred Westphal; Hildegard Nausch; Gareth E. Jones; Dorothea Zirkel: Cell Culture of Human Brain Tumors on Extracellular Matrices: Methodology and Biological Applications In Human Cell Culture Protocols (Methods in Molecular Medicine), (Hardcover) by Human press PP. 81-100.
18. Savage JR. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet.* 1976 ; 13(2):103-22 .
19. Hoshino T Radiosensitization of brain tumors, in *Modern Radiotherapy and Oncology: Central Nervous System Tumours* (Deely TJ ed) 1974 pp 170-183, Butterworths, London.
20. Sano K, Hoshino T, Nagai M. Radiosensitization of brain tumor cells with a thymidine analogue (bromouridine). *J Neurosurg.* 1968 ; 28(6):530-8.
21. Kinsella TJ, Mitchell JB, Russo A, et al, Continuous intravenous infusions of bromodeoxyuridine as a clinical radiosensitizer. *J Clin Oncol.* 1984 ; 2(10):1144-50 .
22. Kinsella TJ, Russo A, Mitchell JB, et al, A Phase I study of intermittent intravenous bromodeoxyuridine (BUdR) with conventional fractionated irradiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1984 ; 10(1):69-76 .
23. Kinsella TJ, Russo A, Mitchell JB, et al, A phase I study of intravenous iododeoxyuridine as a clinical radiosensitizer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1985; 11(11):1941-6 .
24. Prados MD, Scott CB, Rotman M, et al, Influence of bromodeoxyuridine radiosensitization on malignant glioma patient survival: a retrospective comparison of survival data from the Northern California Oncology Group (NCOG) and Radiation Therapy Oncology Group trials (RTOG) for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1998, 1; 40(3):653-9 .
25. Sullivan FJ, Herscher LL, Cook JA, et al, National Cancer Institute (phase II) study of high-grade glioma treated with accelerated hyperfractionated radiation and iododeoxyuridine: results in anaplastic astrocytoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1994 15; 30(3):583-90 .

26. Lawrence TS, Davis MA, Maybaum J, et al, The dependence of halogenated pyrimidine incorporation and radiosensitization on the duration of drug exposure *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1990 ; 18(6):1393-8 .
  27. Ott G, Haaf T, Schmid M. Inhibition of condensation in human chromosomes induced by the thymidine analogue 5-iododeoxyuridine. *Chromosome Res.* 1998; 6(6):495-9 .
  28. Fauth E, Zankl H. Comparison of spontaneous and idoxuridine-induced micronuclei by chromosome painting. *Mutat Res.* 1999 , 6; 440(2):147-56 .
  29. Uhl V, Phillips TL, Ross GY, et al, Iododeoxyuridine incorporation and radiosensitization in three human tumor cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992; 22(3):489-94 .
  30. Franken NA, Ruurs P, Ludwikow G, et al, Correlation between cell reproductive death and chromosome aberrations assessed by FISH for low and high doses of radiation and sensitization by iodo-deoxyuridine in human SW-1573 cells. *Int J Radiat Biol.* 1999 ; 75(3):293-9 .
  31. Franken NA, van Bree C, Veltmaat MA, et al, Increased chromosome exchange frequencies in iodo-deoxyuridine-sensitized human SW-1573 cells after gamma-irradiation. *Oncol Rep.* 1999 ; 6(1):59-63 .
  32. Baria K, Warren C, Eden OB, et al, Chromosomal radiosensitivity in young cancer patients: possible evidence of genetic predisposition. *Int J Radiat Biol.* 2002; 78(5):341-6 .
  33. Raza A, Alvi S, Broady-Robinson L, et al, Cell cycle kinetic studies in 68 patients with myelodysplastic syndromes following intravenous iodo- and/or bromodeoxyuridine. *Exp Hematol.* 1997 ; 25(6):530-5.
۳۴. دکتر حسین مژدارانی. حفاظت عملی در برابر تشعشع و رادیوبیولوژی کاربردی (ترجمه). دانشگاه تربیت مدرس (۱۳۷۸)
35. Olive PL, Durand RE. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* 1994 , 13(2):121-38.