



## روشی نوین جهت محاسبه درصد دز عمقی: بررسی روش دزیمتری بیولوژیک

سید محمد مهدی، ابطحی<sup>۱\*</sup>؛ معصومه، یداللهی<sup>۲</sup>؛ سید محمودرضا، آقامیری<sup>۱</sup>؛ عزیز،

محمودزاده<sup>۳</sup>؛ حسینی، خلفی<sup>۴</sup>

۱. دانشگاه شهید بهشتی، دانشکده مهندسی هسته ای، گروه پرتوپزشکی

۲. دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده پیراپزشکی، گروه رادیوبیولوژی

۳. انستیتو پرتوپزشکی نوین

۴. سازمان انرژی اتمی ایران - پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای

### چکیده:

با توجه به ماهیت دزیمتری بیولوژیکی، این روش نسبت به دزیمترهای فیزیکی نزدیکی بیشتری به بافت‌های طبیعی از دیدگاه پاسخ به پرتو دارد. در این مطالعه، ویال‌های حاوی خون در عمق‌های مختلف یک فانتوم معادل بافت جایگذاری شد و فانتوم مورد پرتودهی قرار گرفت. سپس فراوانی میکرونوکلیی ایجاد شده در عمق‌های مختلف مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. محدوده اختلاف PDD های محاسبه شده با این روش و اتافک یونس در عمق‌های بررسی شده در این پژوهش بین ۱۱٪ تا ۱۸٪ می‌باشد که این اختلاف با بررسی‌های بیشتر و اعمال تصحیحات لازم می‌تواند تا حد زیادی کاهش یابد. در کل این روش دزیمتری بعد از بررسی‌های بیشتر می‌تواند به عنوان ابزاری دقیق برای محاسبه PDD به کار رود.

کلمات کلیدی: دزیمتری بیولوژیکی، روش میکرونوکلینی، درصد دز عمقی، فانتوم، شتاب‌دهنده.

### ۱- مقدمه:

در سال ۱۹۶۴ بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی به عنوان روشی بیولوژیکی برای تخمین دز تشعشعی پیشنهاد شد [۱] و امروزه آنالیز ناهنجاریهای کروموزومی به عنوان یک روش ارزشمند تخمین دز بکار می‌رود [۲]. روش CBMN (Cytokinesis- Block Micronucleus) یکی از روش‌های دزیمتری بیولوژیکی است که در سال ۱۹۸۵ بوسیله morley و fenech توسعه یافت [۳]. میکرونوکلیی (MN) یک هسته کوچک است که علاوه بر هسته اصلی و در نتیجه شکست‌های کروموزومی یا کروموزوم‌های کامل عقب‌مانده از میتوز ایجاد می‌شود. آنها در لنفوسیت‌های خون محیطی و در اولین انترفاز بعد از تقسیم سلولی شمارش می‌شوند. با اضافه کردن سیتوکالازین B در طول کشت سلول و ممانعت از تقسیم سیتوپلاسمیک سلول می‌توان این سلول‌ها را به صورت دو هسته‌ای مشاهده کرد [۴]. تشعشعات یونساز القاء کننده قوی MN هستند و ثابت شده CBMN

assay یک تکنیک استاندارد، کاملاً مطمئن و معتبر برای تخمین مواجهه با پرتو به صورت تصادفی، شغلی و پزشکی به صورت Invivo و همچنین برای ارزیابی حساسیت پرتویی به صورت Invitro میباشد [۵-۶]. وابستگی شدید تعداد MN القاء شده توسط پرتو به میزان دز جذبی و همچنین کیفیت پرتو به طور گسترده در پژوهش‌های پیشین بررسی شده است [۷-۹]. برای پرتوهای با LET پایین و LET بالا به ترتیب وابستگی به صورت درجه ۲ و خطی گزارش شده است، بنابراین در دزهای یکسان، پرتوهای با LET بالا MN بیشتری تولید می‌کنند [۱۰].

با توجه به اینکه مواد ژنتیکی، هدف بحرانی پرتو در سلول می‌باشند، به دست آوردن توزیع دز عمقی با روش‌های سیتوژنتیک می‌تواند گامی به سمت طراحی دقیق‌تر و واقع بینانه‌تر فیلد درمان باشد. اهداف ما در این کار ابتدا استفاده از دزیمتری بیولوژیک برای به دست آوردن توزیع دز عمقی و مقایسه منحنی دز-پاسخ به دست آمده با یک دزیمتر متداول بود. هدف بعدی ساخت یک ماده معادل بافت بود که چند دقیقه پس از ترکیب در دمای اتاق ژلاتینی شود و سلول‌ها را در یک وضعیت ثابت در خود نگه‌دارد با این کار ما به ساختاری مشابه با بافت بدن دست پیدا کردیم.

## ۲- مواد و روش‌ها:

برای ثابت نگه داشتن ویالهای حاوی نمونه‌های خون در فضا از یک فانتوم ژلاتینی استفاده شد. برای ساخت این نوع فانتوم از محلول PVA ۱۰٪ استفاده می‌شود که با استفاده از گلوترآلدهید (G.A.) در آن اتصال عرضی ایجاد می‌شود و پیوندهای تقریباً محکم کوالانسی را شکل می‌دهد. همچنین این فانتوم با توجه به اینکه قبل از اضافه شدن G.A مایع است شکل ظرف را به خود می‌گیرد و قابلیت ساخت هندسه انواع بافت نرم بوسیله آن وجود دارد. بعد از ساخت فانتوم مایع، هر سی‌سی خون را در شرایط استریل و زیر هود لامینار درون یک ویال با حجم یک سی‌سی ریخته و در عمق‌های مختلف فانتوم قرار داده می‌شود در این مرحله G.A اضافه می‌شود. پس از چند دقیقه فانتوم ژلاتینی حاصل می‌شود. فانتوم با یک دستگاه شتاب دهنده خطی Compact Elektra (AU۰۵۱) مورد پرتودهی قرار گرفت. پارامترهای پرتودهی ۲۶۲ MU و ۶ Gy/min در عمق ماکزیمم بود. اندازه میدان ۲۰×۲۰ cm<sup>۲</sup> و SSD برابر با ۱۰۰cm بود و دز در نقطه ماکزیمم برابر ۴Gy بود. پس از پرتودهی، درون ویال‌های کشت بر روی هر سی‌سی خون ۹mL محیط کشت (Gibco-RPMI ۱۶۴۰) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FCS) و L-glutamine و ۱٪ آنتی بیوتیک (پنی‌سیلین و استرپتومایسین) اضافه می‌شود. برای تحریک سلول‌ها و ورود آن‌ها به چرخه سلولی و رشد، به هر یک از ویال‌های کشت ۱/۱ میلی‌لیتر

فیتوهماگلو تینین (PHA) اضافه شده، سپس در ویال‌ها کامل بسته شده و به انکوباتور  $CO_2$  دار منتقل می‌شوند. ۴۴ ساعت پس از کشت و تحریک لئوسیت‌ها، به منظور توقف سلول‌ها در مرحله سیتوکینز، سیتوکالازین (Sigma) B با غلظت نهایی  $5 \mu g/mL$  به محیط اضافه می‌شود. ۷۲ ساعت پس از شروع کشت محصول برداری انجام می‌گردد. پس از سانتریفیوژ و شوک هیپوتونیک کوتاه مدت، سلول‌ها با فیکساتیو (مخلوطی از اسید استیک و متانول به نسبت حجمی ۱:۶) تثبیت و به روی لام تمیز منتقل می‌شوند. لام‌ها با محلول گیمسای ۱۰٪ (Merck) رنگ‌آمیزی و با میکروسکوپ نوری (Nikon) با درشت‌نمایی ۴۰ بررسی و فراوانی میکرونوکلئ‌ی در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای برای هر عمق تعیین می‌شود.

### ۳- نتایج و بحث:

در مطالعه حاضر، ویال‌های حاوی خون در عمق‌های ۰/۵، ۱/۷، ۲/۹، ۴/۱ و ۵/۳ سانتی‌متر مورد پرتودهی قرار گرفتند سپس فراوانی میکرونوکلئ‌ی ایجاد شده در هر ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای لئوسیت برای هر عمق مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از چهاربار بررسی سیتوژنتیکی نمونه‌های خونی واقع در عمق‌های مختلف در جدول (۱) آمده است.

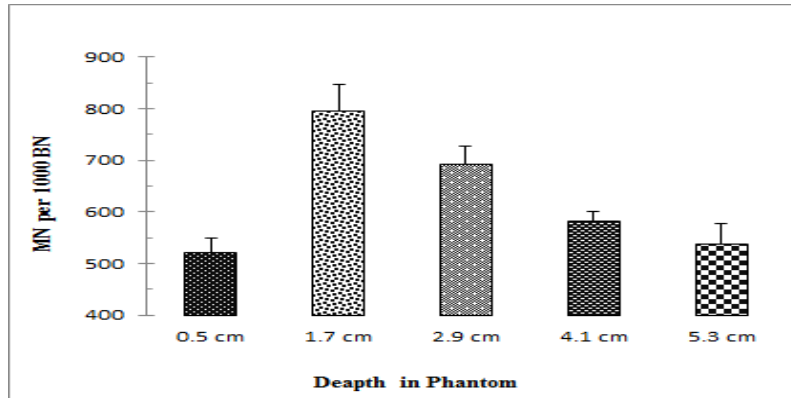
جدول (۱): نتایج حاصل از چهار بار بررسی سیتوژنتیکی نمونه‌های خونی در عمق‌های مختلف. شمارش، تعداد میکرونوکلئ‌ی در هر هزار سلول دو هسته‌ای را نشان می‌دهد.

عمق به cm	۰/۵	۱/۷	۲/۹	۴/۱	۵/۳
شمارش اول	۴۵۰	۷۴۴	۷۰۰	۶۰۸	۵۹۰
شمارش دوم	۵۴۶	۸۴۶	۷۸۴	۵۹۶	۴۳۲
شمارش سوم	۵۱۶	۶۷۸	۶۳۲	۵۲۲	۶۰۴
شمارش چهارم	۵۷۶	۹۱۰	۶۵۶	۵۹۸	۵۲۸
میانگین	۵۲۲	۷۹۴	۶۹۳	۵۸۱	۵۳۸

میانگین و خطای استاندارد فراوانی میکرونوکلئ‌ی حاصل از شمارش ۱۰۰۰ سلول دو هسته‌ای در عمق‌های مختلف در شکل (۱) ملاحظه می‌شود. محاسبات آماری نشان داد که p-value مربوط به ارتباط اعماق ۰،۵ و ۱،۷ سانتی‌متر و همچنین اعماق ۱،۷ و ۵،۳ کمتر از ۰،۰۰۱ است و p-value عمق ۱،۷ نسبت به عمق ۴،۱ سانتی‌متر

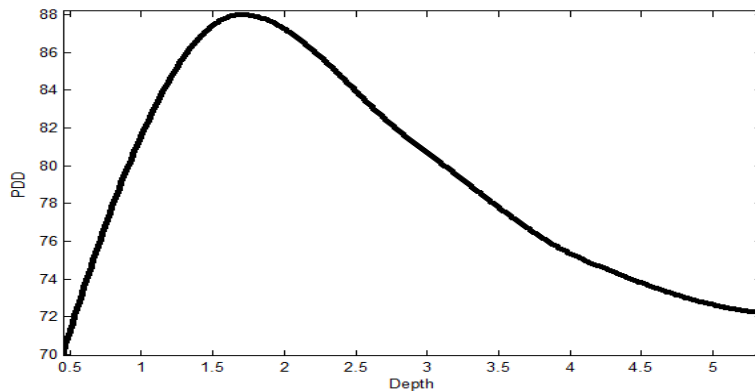


کمتر از ۰,۱ است. عمق ۲,۹ نسبت به عمق ۴,۱ و نیز عمق ۲,۹ به ۵,۳ سانتی متر دارای  $p\text{-value} < 0,05$  است. در کل مقایسه گروه‌های سلولی واقع در پنج عمق، اختلاف معنی داری ( $P < 0,05$ ) را در شمارش میکرونوکلی نشان می‌دهد.



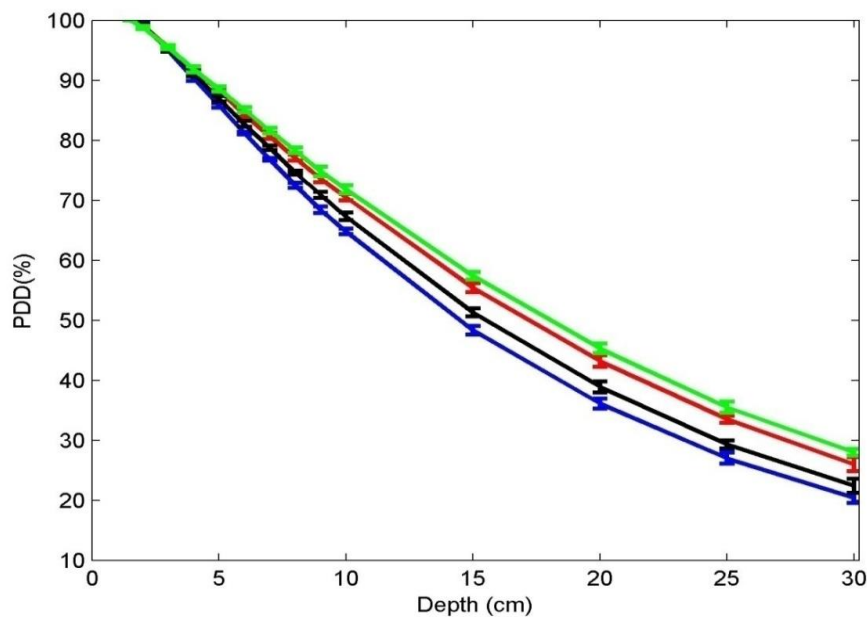
شکل (۱): تعداد میکرونوکلی در هر هزار سلول دو هسته‌ای بر حسب عمق به سانتی متر، (خطای استاندارد به صورت Error bar در شکل نشان داده شده است).

در مطالعه دیگری فراوانی میکرونوکلی را در لنفوسیت‌های ۵ فرد سالم بعد از پرتودهی با دزهای ۰,۳ تا ۵ گری به دست آورده اند [۱۲] که منحنی PDD بر حسب عمق در کار ما بر اساس این مطالعه رسم شده است (شکل ۲) ولی این مطالعه در انرژی ۲۵۰ keV انجام شده درحالیکه انرژی مورد استفاده در کار ما ۶ MeV می‌باشد.



شکل (۲): تغییرات PDD بر حسب عمق با استفاده از روش میکرونوکلی

تاثیر انرژی بر روی فراوانی میکرونوکلی بوسیله گروه حاضر در حال بررسی می‌باشد و در پژوهش‌های آتی در صورت لزوم تصحیحات مربوط به این پارامتر لحاظ خواهد شد. مطالعات قبلی تغییرات PDD را بر حسب عمق با استفاده از اتاقک یونش مانند شکل ۳ گزارش داده‌اند [۱۳].



شکل (۳): تغییرات PDD برحسب عمق ذر انرژی ۶ Mev، مربوط به ۸ بار اندازه‌گیری در چین با اتاقک یونش است. منحنی سبز مربوط به اندازه میدان ۳۰cm×۳۰cm، منحنی قرمز مربوط به اندازه میدان ۲۰cm×۲۰cm، منحنی مشکی مربوط به اندازه میدان ۱۰cm×۱۰cm و منحنی آبی مربوط به اندازه میدان ۶cm×۶cm است. در کار ما با وجودیکه اندازه میدان ۲۰cm×۲۰cm بود ولی چون قطر ظرف کمتر از ۲۰ cm بود PDD مانند یک میدان کوچکتر عمل می‌کرد.

درصد اختلاف PDD های محاسبه شده با دو روش میکرونوکلی و اتاقک یونش در اندازه میدان‌های مختلف در جدول (۲) نشان داده شده است.

جدول (۲): درصد اختلاف PDD های محاسبه شده با دو روش میکرونوکلی و اتاقک یونش در اندازه میدان‌های مختلف

اندازه میدان (cm <sup>2</sup> )	۳۰×۳۰	۲۰×۲۰	۱۰×۱۰	۶×۶	عمق (cm)
۱/۷	۱۱/۶	۱۱/۷	۱۱/۷	۱۱/۸	۱/۷
۲/۹	۱۵/۲	۱۵/۲	۱۵/۰	۱۴/۸	۲/۹
۴/۱	۱۷/۹	۱۷/۸	۱۷/۲	۱۶/۶	۴/۱
۵/۳	۱۷/۴	۱۷/۱	۱۵/۶	۱۴/۴	۵/۳

#### ۴- نتیجه‌گیری:

در این پژوهش کاربرد دزیمتری بیولوژیکی برای اندازه‌گیری PDD مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده تطابق خوبی با آنچه پیش از این برای PDD حاصل از سیستمی مشابه گزارش شده بود، داشتند. با توجه



به نتایج بدست آمده در این پژوهش می توان چنین نتیجه گرفت که دزیمتری بیولوژیکی پتانسیل کاربرد در اندازه گیری PDD را دارا می باشد. این ابزار با توجه به ماهیت خود نزدیکی بیشتری به بافت های طبیعی از دیدگاه پاسخ به پرتو دارد. هرچند بررسی های بیشتری در جهت اصلاح رزولوشن فضایی و دز رزولوشن این روش برای پژوهش های آتی پیشنهاد می شود.

#### مراجع:

۱. Bender, M.A., Chromosome aberrations in irradiated human subjects, Annals of the New York Academy of Sciences, ۱۱۴(۱): p. ۲۴۹-۲۵۱, ۱۹۶۴.
۲. Gad., S., Radiation dosimetry :instrumentation and method, second ed., Department of Nuclear and Biomedical Engineering Ben Gurion university: Beer sheva, Israel, ۲۰۰۱.
۳. Fenech, M. and A.A. Morley, Measurement of micronuclei in lymphocytes. Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, ۱۴۷(۱): p. ۲۹-۳۶, ۱۹۸۵.
۴. Fenech, M., Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, ۶۰۰(۱): p. ۵۸-۶۶, ۲۰۰۶.
۵. Thierens, H., et al., Micronucleus induction in peripheral blood lymphocytes of patients under radiotherapy treatment for cervical cancer or Hodgkin's disease. International journal of radiation biology, ۶۷(۵): p. ۵۲۹-۵۳۹, ۱۹۹۵.
۶. Thierens, H., A. Vral, and L. De Ridder, A cytogenetic study of radiological workers: effect of age, smoking and radiation burden on the micronucleus frequency, Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects, ۳۶۰(۲): p. ۷۵-۸۲, ۱۹۹۶.
۷. Verhaegen, F. and A. Vral, Sensitivity of micronucleus induction in human lymphocytes to low-LET radiation qualities: RBE and correlation of RBE and LET, Radiation research, ۱۳۹(۲): p. ۲۰۸-۲۱۳, ۱۹۹۴.
۸. Wuttke, K., W.-U. Müller, and C. Streffer, The sensitivity of the in vitro cytokinesis-blocked micronucleus assay in lymphocytes for different and combined radiation qualities, Strahlentherapie und Onkologie, ۱۷۴(۵): p. ۲۶۲-۲۶۸, ۱۹۹۸.
۹. Gersey, B., et al., Micronuclei induction in human fibroblasts exposed in vitro to Los Alamos high-energy neutrons. Advances in Space Research, ۴۰(۱۱): p. ۱۷۵۴-۱۷۵, ۲۰۰۷.
۱۰. Vral, A., M. Fenech, and H. Thierens, The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure, Mutagenesis, ۲۶(۱): p. ۱۱-۱۷, ۲۰۱۱.
۱۱. Khan FM, The physics of radiation therapy. third ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, ۲۰۰۳.
۱۲. Streffer, C., et al., Micronuclei-biological indicator for retrospective dosimetry after exposure to ionizing radiation, Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, (۱)۴۰۴ :p. ۱۰۱-۱۰, ۱۹۹۸.
۱۳. Cho, S. and G. Ibbott, Reference photon dosimetry data: A preliminary study of in-air off-axis factor, percentage depth dose, and output factor of the Siemens Primus linear accelerator, Journal of Applied Clinical Medical Physics,(۴) :p: ۳۰۰-۳۰۶, ۲۰۰۳.