

مقایسه حساسیت سلول‌های سفید خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم نسبت به آسیب‌های ناشی از پرتو گاما با استفاده از آزمون کامت قلیایی

مریم شهیدی (Ph.D.) * حسین مزدآرانی (Ph.D.) ** منیژه مختاری دیزجی (Ph.D.) *

چکیده

سابقه و هدف : تحقیقات قبلی نشان داده اند افزایش حساسیت نسبت به اثرات تخریبی پرتوهای یون‌ساز بر روی کروموزوم‌ها در بسیاری از موارد نمایانگر شرایط استعداد ابتلا به سرطان است. در این تحقیق حساسیت ناشی از پرتو بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم با بررسی آسیب‌های ژنتیکی اولیه القا شده ناشی از تابش پرتوهای گاما در سلول‌های سفید خون افراد بیمار و سالم با استفاده از آزمون کامت قلیایی مورد مقایسه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها : در این تحقیق ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۱ فرد اهدا کننده سالم، مورد مطالعه قرار گرفتند. نمونه‌های رقیق شده خون این افراد، در شرایط *in vitro* تحت تابش دوز ۱ گری پرتوهای گامای ناشی از چشمه کبالت ۶۰، با آهنگ پرتودهی $11/51 \pm 227/48$ Gy/min قرار گرفتند. نمونه‌ها بلافاصله پس از تابش دهی، توسط آزمون کامت قلیایی مورد بررسی قرار گرفتند. کامت‌ها بوسیله طبقه بندی چشمی (پس از اثبات حساسیت و تکرارپذیری) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میزان آسیب DNA در دو گروه شاهد و بیمار تعیین گردید.

یافته‌ها : آسیب‌های پایه در بیماران مبتلا به سرطان پستان حدود ۱/۶ برابر بیشتر از افراد سالم بود ($p=0/03$). آسیب‌های اولیه القا شده در اثر تابش پرتوهای گاما در سلول‌های سفید افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با افراد سالم نداشت. همچنین مشاهده شد که میزان آسیب‌ها در DNA افراد سالم و بیمار قبل و بعد از تابش دهی، تفاوت معنی‌داری را با سن افراد نشان نمی‌دهد.

استنتاج : این تحقیق به منظور بررسی کارآیی آزمون کامت قلیایی، به عنوان یک روش سیتوژنتیکی مناسب برای غربالگری افراد با مخاطره بالا برای ابتلا به سرطان پستان و نیز محافظت پرتویی افراد حساس به اشعه صورت گرفت. نتایج نشان می‌دهند افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آسیب پذیری اولیه با افراد سالم تفاوتی ندارند. این در حالی است که بالاتر بودن سطح آسیب‌های پایه در بیماران می‌تواند نشان دهنده نقص روندهای ترمیمی در بیماران باشد.

واژه‌های کلیدی : سرطان پستان، حساسیت پرتوی، لوکوسیت، آزمون کامت



* گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

** گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

تاریخ تصویب:

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات:

تاریخ دریافت:

مقدمه

تخمین زده می‌شود حدود ۱۰ درصد افراد جامعه به پرتوهای یونساز، حساسیت غیر طبیعی نشان می‌دهند این حساسیت ناشی از وجود ژن‌های حساس به پرتو است که موجب آسیب در مولکول DNA می‌شود. دستیابی به آزمون‌هایی که بتوانند بادقت و در زمان کوتاهی افرادی را که از حساسیت بالاتری نسبت به پرتوها برخوردارند شناسایی کنند، حائز اهمیت است. زیرا از یک سو امکان شناسایی افراد مستعد ابتلا به سرطان را فراهم می‌سازند و از سوی دیگر نقش مهمی در انفرادی نمودن برنامه درمانی افراد براساس خصوصیات بیولوژیکشان ایفا می‌کنند (۱-۵).

عقیده بر این است که حدود ۷۰ درصد تفاوت‌های فردی در حساسیت پرتوی بافت سالم بیماران مربوط به تفاوت‌های ژنتیکی افراد است (۱) و عامل اصلی تعیین‌کننده واکنش بافت سالم به پرتوها، حساسیت ذاتی سلول‌ها می‌باشد (۱-۶). پاسخ سلول‌ها به تابش پرتوهای یونساز وابسته به حضور ژن‌های گوناگونی است که مسئول ترمیم DNA، تنظیم سیکل سلولی و سرکوب تومور می‌باشند (۷). مطالعاتی که بر روی سلول‌های بدن بیماران مبتلا به بیماری‌های ارثی (همراه با نقائص مربوط به ترمیم DNA و سیکل سلولی همراه با حساسیت به پرتو) مانند آتاکسی تلانژکتازیا (ataxia telangiectasia AT) و زیرودرما پیگمنتوزوم (XP Xeroderma Pigmentosum) انجام شده نشان داده‌است ارتباطی بین افزایش حساسیت پرتوی و استعداد ابتلا به سرطان وجود دارد (۲، ۸). نقائص مربوط به ترمیم DNA و/یا ناهنجاری‌های چرخه سلولی با اکثر ژن‌هایی که مستعد کننده ایجاد سرطان هستند همراهند (۲). همچنین احتمال می‌رود درصد قابل توجهی از افراد، حامل ژن‌های گوناگونی باشند که موجب تغییر پاسخ سلول‌ها نسبت به پرتوها می‌شوند (۲). مجموع این مسائل سبب شده است که تحقیقات زیست پرتوی به

سمت اثبات نظریه وجود ارتباط ما بین حساسیت پرتوی و استعداد ابتلا به سرطان سوق پیدا کند.

از آنجا که تغییرات ساختمانی کروموزوم ارتباط مستقیمی با ایجاد سرطان (از طریق فعال شدن انکوژن‌ها و غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور) نشان می‌دهد و از طرف دیگر کلیه عوامل دخیل در ایجاد سرطان در نهایت باعث فعال شدن انکوژن‌ها و غیرفعال شدن ژن‌های سرکوب‌کننده تومور می‌شوند، بنابراین بررسی حساسیت ماده ژنتیکی افراد نسبت به عوامل مختلف سرطان‌زا (ازجمله پرتوهای یونیزان) یک نشانگر بیولوژیک مهم برای ابتلا به سرطان می‌باشد (۳).

به دلیل شیوع بالای سرطان پستان در زنان، طی سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری در این زمینه انجام گرفته است. در کشورهای صنعتی، از هر ده زن یک نفر در دوره‌ای از زندگی خود به این نوع سرطان مبتلا می‌گردد. سرطان پستان از لحاظ علت شناختی، یک بیماری چند علتی بوده و عوامل مختلفی از جمله عوامل محیطی، هورمونی و توارثی در ایجاد آن دخالت دارند. بیشتر موارد (حدود ۸۰ درصد) تک گیر هستند و توسط جهش‌های سوماتیک بوجود می‌آیند، و حدود ۲۰ درصد موارد دارای سابقه خانوادگی شامل ۵ درصد نرخ جهش غالب اتوزومی با نفوذ بالا هستند (۹). تغییرات ژن‌های سرکوبگر تومور BRCA1 و BRCA2 خطر ایجاد سرطان پستان را بالا می‌برند. جهش در ژن BRCA1 تقریباً در ۵۰ درصد خانواده‌های با شیوع بالای سرطان پستان و حداقل در ۸۰ درصد خانواده‌های دارای نرخ بالای سرطان‌های زودرس تخمدان و پستان دیده می‌شود. به طور مشابه، جهش در ژن‌های BRCA2 باعث سرطان پستان زودرس در زنان گردیده و همچنین احتمال ابتلا در مردان را نیز افزایش می‌دهد (۱۰). در کنار دو ژن پر نفوذ BRCA1, BRCA2 که استعداد ابتلا

و اندازه نسبت سر به دم کامت و نیز با درجه بندی کامت می توان آسیب ایجاد شده در DNA را بطور کمی بیان نمود (۱۳، ۱۲).

در این تحقیق آسیب القا شده در مولکول DNA توسط تابش پرتوهای گاما را در سلول های سفید خون محیطی ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۱ فرد سالم، بلافاصله بعد از تابشدهی با استفاده از آزمون کامت بررسی شد. هدف از این تحقیق ارزیابی میزان حساسیت پرتوی سلول های تابش دیده بیماران در مقایسه با سلول های افراد سالم بوده است.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت های ذیل تامین شدند: آگاروز با نقطه ذوب پایینی از شرکت فرمنتاس، سی ناژن ای ران؛ آگاروز معمولی، دیتمیل سولفوکساید، تریتون X-۱۰۰، اتیدیم بروماید، نمک سدیم آن لوریل سارکوزان، کلرید سدیم، هیدروکسید سدیم، تریس بازی، سدیم دو سیل سولفات از شرکت مرک، بهزیست دارو، ایران؛ فسفات بافر سالین (PBS)، دی سدیم-EDTA از شرکت سیگما، سیناژن، ایران.

نمونه گیری

نمونه های بیمار انتخاب شده، شامل ۲۹ زن مبتلا به سرطان پستان بودند که مورد نمونه برداری و یا عمل جراحی ماستکتومی قرار گرفته بودند. از این بیماران قبل از شروع عوامل مداخله گر درمانی (شیمی درمانی- رادیوتراپی) و پس از اخذ رضایت نمونه گیری انجام شد. تعداد نمونه های شاهد ۳۱ نفر انتخاب شد که ۱۰ نفر آنها زن بودند، همچنین به منظور رد نمودن اثر جنسیت و سایر عوامل مداخله گر بر روی آزمایش های انجام

به سرطان پستان را افزایش می دهد، ژن های کم نفوذ زیادی نیز ممکن است در افزایش این استعداد دخیل باشند و نقش ژن های سرکوبگر تومور همچون p53 و نیز ATM که ژن حساس به پرتو می باشد در بروز سرطان پستان تایید شده است (۱۱). لذا انتظار می رود سلول های این افراد نسبت به افراد سالم، حساسیت بیشتری در برابر پرتوهای یونساز نشان دهند.

روش های سیتوژنتیک متداول برای بررسی حساسیت پرتوی شامل آنالیز متافاز، تبادل کروماتیدهای خواهری، تراکم زودرس کروموزوم و سنجش میکرونوکلئ می باشد. روش های مذکور به دلایل پیچیدگی، نیاز به انجام کشت سلولی و گرانی نسبی روش های مناسبی به عنوان آزمون های غربالگر افراد حساس به پرتو در به کارگیری در سطح جامعه و در سطح گسترده نیستند.

در این تحقیق به منظور بررسی آسیب های ایجاد شده در DNA متعاقب تابش دهی از روش کامت "Comet assay" استفاده گردید. این روش یک تکنیک میکروالکتروفورتیک است و به کمک آن می توان آسیب های ایجاد شده در DNA را در تک تک سلول ها به طور مستقیم مشاهده نمود. استفاده از این روش از مزایای متعددی برخوردار است. این روش سریع، آسان، حساس، قابل اعتماد و نسبتاً ارزان است. جهت بررسی آسیب ها با این روش نیازی به کشت سلول ها وجود ندارد و نتایج ظرف مدت چند ساعت پس از نمونه گیری از سلول ها قابل دستیابی است. این روش حساس است و قادر است آسیب های DNA را در نتیجه تابش دوزهای در حد چند cGy آشکار سازد. در این روش سلول هایی که توسط عوامل ژنوتوکسیک آسیب دیده اند، پس از رنگ آمیزی با یک رنگ فلورسانس در میدان میکروسکوپ به صورت یک ستاره دنباله دار با یک سر و یک دم مشاهده می شوند. با اندازه گیری پارامترهایی مانند طول دم کامت، اندازه سر

PBS در دمای 37°C مخلوط شد. این مخلوط روی لام قرار داده شد و بلافاصله روی آن لامل قرار گرفت. لام به مدت ۱۰ دقیقه در یخچال (4°C) قرار داده شد تا آگاروز سفت شود. پس از سفت شدن آگاروز لامل برداشته شد.

آزمون کامت قلیایی

از نسخه قلیایی ارائه شده توسط کالیتز و همکاران (۲۰۰۲) که به طور وسیعی در تحقیقات به کار گرفته می‌شود، استفاده شد (۱۳). لام‌ها به مدت یک ساعت در محلول لیزیس قلیایی با $\text{pH}=10$ ، حاوی $2/5 \text{ mM}$ کلرید سدیم، 100 mM EDTA ، 10 mM تریس، 1 درصد سدیم لوریل سارکوزان و 1 درصد تریتون 100 X قرار گرفتند. پس از مرحله لیزیس، لام‌ها به مدت 40 دقیقه در یک تانک الکتروفورز افقی (SEU-7305، پایا پژوهش، ایران) در محلول تازه قلیایی با $\text{pH} > 13$ حاوی 1 mM EDTA و 1 M NaOH قرار گرفتند تا پیچش رشته‌های DNA از یکدیگر باز شود. پس از آن عمل الکتروفورز به مدت 30 دقیقه در شرایط 0.7 volt/cm انجام شد. پس از الکتروفورز عمل خنثی سازی با سه بار شست و شوی لام‌ها در بافر خنثی ساز (محلول تریس با $\text{pH}=7.5$) هر بار به مدت 5 دقیقه انجام گرفت. پس از خنثی سازی، لام‌ها به مدت 5 دقیقه در اتانل قرار داده شدند و پس از آن در مجاورت هوا خشک شدند. تمامی مراحل پروتکل آزمون کامت قلیایی در دمای 4°C انجام گرفت.

رنگ آمیزی و بررسی میکروسکوپی

لام‌ها با $50 \mu\text{L}$ محلول اتیدی-م بروماید با غلظت $20 \mu\text{g/mL}$ رنگ آمیزی شدند و پس از قرار

شده و همچنین مساوی بودن شرایط اقتصادی، فرهنگی، بهداشتی و تغذیه‌ای، از ۲۱ مرد که اغلب آنان همسران بیماران مبتلا به سرطان پستان بودند نیز نمونه خون تهیه شد (۴۳). عمل نمونه‌گیری از افراد سالم نیز پس از کسب موافقت از آنها انجام گردید.

نمونه‌های خون محیطی پس از جمع‌آوری، در ظروف استریل حاوی ماده ضد انعقاد دی‌سدیم-EDTA ریخته می‌شد. در هریک از قسمت‌های آزمون مقدار $7/5 \mu\text{L}$ از خون در میکروتیوب‌های با حجم $1/5 \text{ mL}$ که حاوی 1 mL PBS بودند، ریخته می‌شد.

تابش دهی نمونه‌ها

تابش دهی با استفاده از چشمه کبالت 60 (تراترون 780E ، کانادا) واقع در بیمارستان امام خمینی تهران انجام شد. نمونه‌های خون حاصل از افراد پس از رقیق شدن در PBS، به طور *in vitro*، بر روی یخ در فاصله 60 سانتی‌متری از چشمه تابش، پرتو دهی شدند. تابش دهی با نرخ تابش $277/48 \pm 11/51 \text{ cGy/min}$ انجام شد و نمونه‌ها تحت تابش دوز کلی 1 Gy قرار گرفتند.

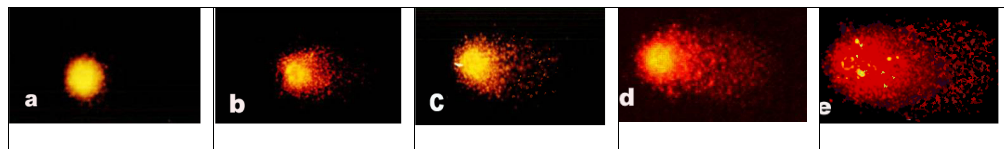
آماده سازی لام

به منظور آماده کردن لام‌ها، ابتدا لام‌ها پیش پوشش داده شدند. بدین منظور لام‌ها در یک بشر 50 mL حاوی آگاروز معمولی مذاب با غلظت 1 درصد در آب فروبرده و پس از خارج نمودن، پشت آنها به کمک دستمال تمیز و در فر گرم خشک شدند.

نمونه‌های خون پس از تابش دهی روی یخ به آزمایشگاه حمل شدند. با استفاده از سانتریفوژ یخچال دار، سلول‌ها ته نشین شدند. مایع بالای ته نشست سلولی دور ریخته شد و ته نشست سلولی با $100 \mu\text{L}$ آگاروز با نقطه ذوب پایین با غلظت 0.75 درصد در

عنوان نوع صفر (سلول‌های فاقد مهاجرت DNA) در نظر گرفته شدند و کامت‌های فاقد سر و یا دارای سر کوچک و دم پراکنده و دراز در نوع چهار (سلول‌های بسیار آسیب دیده) قرار گرفتند. کامت‌های دارای خصوصیات حد واسطه در انواع ۱، ۲ و ۳ قرار گرفتند (شکل شماره ۱). در هنگام بررسی با میکروسکپ هر کدام از کامت‌های دیده شده با یکی از این تصاویر شبیه‌سازی گردیده و بدین ترتیب اعداد صفر تا چهار به هر کدام از کامت‌ها نسبت داده شد.

دادن لامل بر روی آنها، با میکروسکوپ اپی فلورسنت (Nikon E 800) با محدوده طول موج ۵۱۶-۵۴۶ نانومتر و همچنین فیلتر Barrier با طول موج ۵۹۰ نانومتر و با بزرگ‌نمایی ۲۰۰ برابر مورد مشاهده قرار گرفتند. ارزیابی نتایج به صورت چشمی و مقایسه‌ای انجام گرفت. آسیب‌ها بر اساس ظاهر کامت‌ها، با در نظر گرفتن میزان مهاجرت DNA، مطابق معیارهای ارائه شده در مقالات مرجع (۱۵، ۱۴) به ۵ دسته (نوع صفر تا چهار) دسته بندی گردیدند. کامت‌های دارای سر درخشان و فاقد دم به



شکل شماره ۱: انواع کامت‌ها با درجات مختلف مشاهده شده در نمونه‌های مورد بررسی (a) نوع صفر، (b) نوع یک، (c) نوع دو، (d) نوع سه، (e) نوع چهار

اعداد ۰ تا ۴: ضرایب ثابت مربوط به هر یک از کامت‌های صفر تا چهار
 Σ : مجموع کامت‌های شمارش شده، شامل نوع صفر

آسیب‌های اولیه پایه DNA در نمونه‌های تابش ندیده (DD0) نیز با بررسی نمودن ۱۰۰ سلول از دو لام تهیه شده در هر یک از شرایط آزمایشی در هر فرد مانند آنچه در بالا ذکر شد، محاسبه گردید و آسیب خالص حاصل از تابش‌گیری به صورت تفاضل آسیب پایه از آسیب القا شده محاسبه گردید

$$\text{آسیب خالص} = DD - DD_0$$

آسیب‌های DNA (DD) ناشی از تابش، با بررسی نمودن ۱۰۰ سلول از دو لام تهیه شده در هر یک از شرایط آزمایشی در هر فرد و انتساب هر یک از اعداد از صفر تا چهار کمی شد و توسط معادله زیر محاسبه گردید. و بدین ترتیب آسیب کلی ارائه شده در هر فرد به صورت محدوده‌ای از ۰ تا ۴۰۰ ارزیابی گردید که به عنوان شاخص کلی میزان آسیب موجود در DNA گزارش گردید (۱۰).

$$DD = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / (\Sigma / 100)$$

که در این معادله:

DD: آسیب DNA

$n_0 - n_4$: تعداد کامت‌های از نوع ۰ تا ۴

روش‌های آماری

آسیب اولیه القا شده در DNA بعد از تابش آگری پرتوهای گاما (DD)، آسیب پای‌ه (DD₀) و نی‌ز آسیب خالص اولیه القا شده در DNA پس از

یافته‌ها

در تحقیق حاضر القای آسیب در DNA، به عنوان شاخصی از حساسیت پرتوی در سلول‌های سفید نمونه خون افراد، توسط نسخه قلبایی آزمون کامت مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام آزمون‌های حساسیت پرتوی لازم بود دوز تابشی انتخاب گردد که هنگام قرار گرفتن سلول‌ها در مقابل آن پاسخ متوسطی در سلول‌ها مشاهده گردد. بدین ترتیب چنانچه فردی حساس به پرتو باشد، آسیب بیش‌تری در سلول‌های وی ایجاد می‌گردد و این آسیب قابل مشاهده خواهد بود. طی آزمایش‌های مقدماتی انجام شده که به منظور یافتن شرایط مناسب آزمایشی انجام یافته بود، مشاهده گردید که در دوز یک گری در سلول‌ها آسیب متوسطی القا می‌شود. در بررسی‌های میکروسکوپی نیز در اثر تابش یک گری، انواع کامت‌ها مشاهده می‌گردید و همچنین اکثریت کامت‌ها از نوع دو بودند. بدین جهت دوز یک گری به منظور انجام آزمون‌های حساسیت پرتوی در مراحل بعدی آزمون انتخاب گردید.

نتایج حاصل از بررسی آسیب‌های پایه و القا شده در DNA زنان و مردان گروه شاهد

از نمونه‌های خون جمعا ۳۱ فرد سالم شامل ۱۰ زن و ۲۱ مرد به عنوان گروه شاهد استفاده گردد. در این تحقیق سه پارامتر مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت: الف- آسیب پایه یا زمینه موجود در DNA در سلول‌های تابش ندیده (DD₀)، ب- آسیب القا شده در DNA در

کسر نمودن آسیب پایه (DD-DD₀)، بین بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم، با استفاده از روش t-test مقایسه گردیدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت.

اثر تابش ۱ Gy پرتوهای گاما (DD₁) و ج- آسیب خالص القا شده در DNA در اثر تابش ۱ Gy پرتوهای گاما پس از کسر آسیب زمینه (DD₁-DD₀).

مقایسه میانگین آسیب DNA در میان زنان و مردان گروه شاهد در هر سه حالت قبل از پرتو دهی (DD₀)، پس از پرتو دهی (DD₁) و پس از پرتو دهی پس از کسر آسیب زمینه (DD₁-DD₀) نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری میان گروه‌های زن و مرد شاهد وجود ندارد (p=۰/۱۱) و بنابراین میانگین آسیب، در کل مردان و زنان شاهد، به منظور مقایسه با گروه بیمار در نظر گرفته شد.

مقایسه نتایج آسیب‌های زمینه و القا شده در گروه شاهد و بیماران مبتلا به سرطان پستان

در این تحقیق از نمونه خون ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان که تحت شیمی درمانی و پرتو درمانی قرار نگرفته بودند، استفاده گردید و آسیب‌های زمینه موجود (DD₀)، آسیب القا شده پس از تابش ۱ Gy پرتوهای گاما (DD₁) و آسیب خالص القا شده پس از کسر آسیب زمینه (DD₁-DD₀) در DNA سلول‌های سفید خون آنها مورد بررسی قرار گرفت و با نتایج گروه شاهد مقایسه شد (جدول شماره ۱).

مقایسه میانگین آسیب زمینه در افراد سالم و بیمار نشان داد که آسیب زمینه در بیماران مبتلا به سرطان پستان حدود ۱/۷ برابر میانگین آسیب زمینه در افراد سالم بود و بررسی‌های آماری نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار

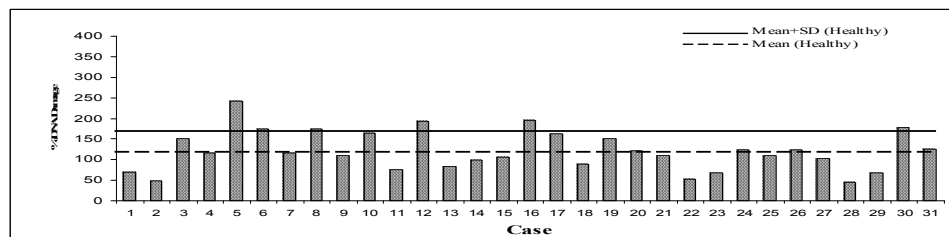
جدول شماره ۱: میانگین و انحراف معیار آسیب در گروه بیمار و شاهد، قبل و بعد از تابش یک گری پرتو به همراه مقادیر تصحیح شده (با کسر آسیب زمینه)

نمونه	جنسیت	تعداد	DD ₀ Mean ±SD	P	DD ₁ Mean ±SD	P	DD ₁ -DD ₀ Mean ±SD	P
شاهد	زن	۱۰	۳۴/۵±۴۴/۶۸	۰/۱۱	۱۵۳/۹±۵۹/۹۷	۰/۲۸	۱۱۹/۴±۳۵/۲۲	۰/۷۳
	مرد	۲۱	۶۸/۰۹±۵۷/۱۴		۱۸۱/۶۷±۶۸/۰		۱۱۳/۵۷±۴۷/۴۵	
بی‌حار	کل	۳۱	۵۷/۲۶±۵۵/۰۵	۰/۰۳	۱۷۲/۷±۶۵/۸۸	۰/۰۵	۱۱۵/۴۵±۴۳/۳۷	۰/۹۷
	زن	۲۹	۹۱/۲۷±۶۷/۱۴۶		۲۰۶/۲۷±۶۷/۵۵		۱۱۵/۰±۶۱/۵۳	

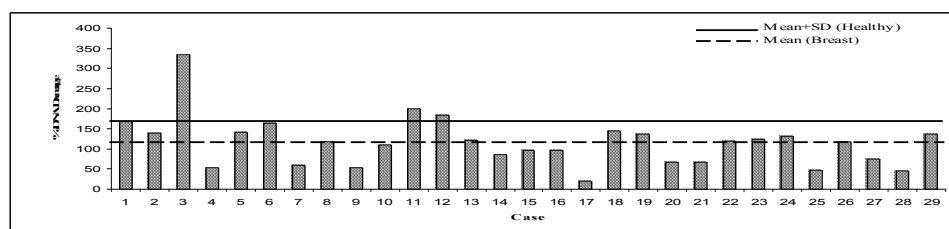
بین آسیب خالص القا شده در گروه‌های شاهد و بیمار متعاقب تابش یک گری پرتوهای گاما نبود ($p=۰/۹۷$). نتایج نشان می‌دهند با در نظر گرفتن آسیب‌های خالص اولیه القا شده در DNA به عنوان شاخص حساسیت پرتوی و مقایسه آن بین افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان، تفاوتی بین حساسیت پرتوی افراد سالم و بیمار وجود ندارد. نمودارهای شماره ۲ و ۳ به ترتیب نمودار آسیب خالص القا شده در DNA افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم را در مقایسه با مقادیر میانگین هر یک از گروه‌ها و میانگین به علاوه یک انحراف معیار افراد سالم نشان می‌دهد، اگر افرادی را که میزان آسیب‌هایشان از "میانگین به علاوه انحراف معیار" افراد سالم بیشتر باشد "حساس به اشعه" در نظر بگیریم، ۱۲ درصد از بیماران (۳ نفر از ۲۹ نفر) و ۱۸ درصد از گروه شاهد (۶ نفر از ۳۱ نفر) حساسیت پرتوی بالاتر از معمول داشته‌اند (نمودارهای شماره ۲ و ۳).

بین میانگین آسیب زمینه موجود در DNA در افراد بی‌حار و سالم بود ($p=۰/۰۳$). پس از تابش یک گری پرتوهای گاما، مقدار متوسط آسیب اولیه القا شده هم در افراد سالم و هم در بیماران نسبت به حالت قبل از پرتو دهی، به طور مشخص افزایش یافت. بررسی‌های آماری نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار بین آسیب‌های اولیه القا شده و آسیب زمینه موجود در DNA در افراد سالم و نیز در بیماران بود ($p=۰/۰۰۰$).

مقایسه آسیب اولیه القا شده (DD_1) در گروه‌های شاهد و بیمار نشانگر وجود اختلاف معنی‌دار نمی‌باشد ($p=۰/۰۵۶$). برای حذف آثار احتمالی ناشی از سن و سایر عوامل مداخله‌گر بر روی نتایج آسیب DNA پس از پرتو دهی، در هر فرد میزان آسیب زمینه از مقادیر آسیب اولیه القا شده کسر گردید و بدین ترتیب مقادیر خالص آسیب القا شده در DNA محاسبه گردید و سپس نتایج حاصل مورد بررسی آماری مجدد قرار گرفت. بررسی‌های آماری نشانگر اختلاف معنی‌داری



نمودار شماره ۲: تغییرات آسیب‌های القا شده در DNA سلول‌های خونی افراد سالم، پس از تابش ۱ Gy پرتوی گاما، در مقایسه با مقادیر میانگین و میانگین به علاوه انحراف معیار، آشکار شده توسط آزمون کامت قلبایی. خطوط نقطه‌چین میانگین گروه و خطوط ممتد میانگین به علاوه یک انحراف معیار (SD + Mean) افراد سالم را نشان می‌دهد.



نمودار شماره ۳: تغییرات آسیب‌های القا شده در DNA سلول‌های خونی بیماران مبتلا به سرطان پستان پس از تابش ۱ Gy پرتوی گاما، در مقایسه با مقادیر میانگین و میانگین به علاوه انحراف معیار، آشکار شده توسط آزمون کامت قلبایی. خطوط نقطه‌چین میانگین گروه و خطوط ممتد میانگین به علاوه یک انحراف معیار (SD + Mean) افراد سالم را نشان می‌دهد.

و در بیماران مبتلا به سرطان پستان، قبل از پرتودهی (DD₀)، پس از پرتودهی (DD₁) و پس از پرتودهی تصحیح شده (DD₁-DD₀) از لحاظ آماری معنی‌دار نیست.

در نمودار شماره ۴ رابطه بین آسیب القا شده در DNA و سن نمونه‌های بیمار و شاهد پس از ۱ گری پرتودهی و کسر آسیب زمینه مشاهده می‌گردد.

بحث

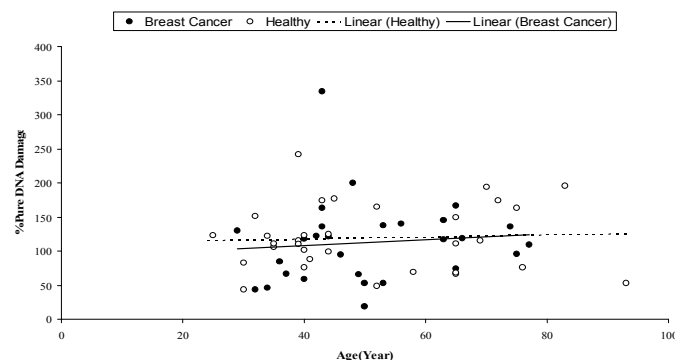
سرطان پستان از شایع‌ترین بدخیمی‌ها در زنان می‌باشد و شایع‌ترین علت مرگ ناشی از سرطان در زنان ۴۰-۵۴ ساله است (۹). از شروع بدخیمی در پستان تا وقتی که بتوان آنرا به کمک ماموگرافی و یا لمس فیزیکی آشکار نمود، زمان طولانی خواهد گذشت. بنابراین اغلب سرطان‌های پستان قبل از این که به مرحله تشخیص برسند، منتشر شده‌اند. در حال حاضر روشی

مقدار آسیب زمینه (DD₀)، هم در بیماران مبتلا به سرطان پستان و هم در افراد سالم از تغییرات گسترده‌ای برخوردار است. بررسی‌های آماری نشان می‌دهند چنانچه افراد بیمار و سالم به دو گروه سنی کم‌تر و بیش‌تر از ۵۰ سال مجزا شوند و سپس مقادیر آسیب، قبل از پرتودهی (DD₀)، پس از پرتودهی (DD₁) و پس از پرتودهی تصحیح شده (DD₁-DD₀) مورد مقایسه قرار گیرند، در افراد کم‌تر از ۵۰ سال مقادیر آسیب زمینه و القا شده در بیماران مبتلا به سرطان پستان بیش از افراد سالم است و با افزایش سن، مقدار آسیب زمینه (DD₀) و القا شده (DD₁) در بیماران و افراد سالم با یکدیگر مشابه می‌گردد. آنالیز همبستگی بین میزان آسیب و سن افراد شاهد و بیمار در سه حالت قبل از پرتودهی، پس از پرتودهی و پس از پرتودهی تصحیح شده (کسر آسیب زمینه) انجام شد. افزایش آسیب به ازای سن در نمونه‌های شاهد

یافتن روش‌های غربالگری با تهاجم کم‌تر که قادر به شناسایی افراد مستعد به سرطان باشد، از اهمیت خاصی برخوردار است.

در سال‌های اخیر تحقیقات وسیعی در رابطه با یافتن روش‌های مناسب غربالگری و شناسایی افراد مستعد به سرطان صورت گرفته است و مقالات بسیار زیادی در

برای تشخیص قبل از بروز سرطان پستان وجود ندارد و تنها روش متداول برای آشکار نمودن سرطان پستان قبل از بروز علائم بالینی و غربالگری عموم جامعه برای یافتن افراد مشکوک به بیماری، ماموگرافی است (۱۶). این روش علاوه بر محدودیت‌های تشخیصی با پرتو تابانی به زنان همراه می‌باشد و خود ممکن است باعث بالابردن خطر ابتلاء به سرطان در افراد مستعد گردد (۱۷). بنابراین



نمودار شماره ۴: رابطه آسیب القاشده در DNA و سن نمونه‌های بیمار و شاهد پس از ۱ گری پرتو دهی و کسر آسیب زمینه

سلول‌های سفید خون محیطی ۲۹ بیمار مبتلا به سرطان پستان و ۳۱ فرد سالم، با انجام آزمون کامت قلیایی بلافاصله بعد از تابش دهی مورد بررسی گرفت. این تحقیق با هدف یافتن شاخص مناسب به منظور شناسایی افراد حساس به پرتو صورت گرفت و نهایتاً کارآیی نسخه قلیایی آزمون کامت- هنگامی که به منظور آشکارسازی آسیب‌های اولیه القا شده در اثر تابش پرتوهای یون‌ساز به کار برده می‌شود- در شناسایی افراد حساس به پرتو مورد بررسی قرار گرفت. علت انتخاب "آسیب‌پذیری اولیه سلول‌ها" به عنوان شاخصی از حساسیت پرتوی وجود نظرات متفاوتی بود که در مورد علت حساسیت پرتوی افراد حساس به پرتو وجود دارد، مطالعات گوناگونی در این زمینه صورت گرفته و نتایج در برخی موارد مبتنی بر ایجاد آسیب‌های اولیه بیش‌تری متعاقب تابش‌گیری در

این باره انتشار یافته است. برای مثال در تحقیقی که در آن لئوسیت‌های بیماران مبتلا به سرطان پستان و نیز افراد سالم در فاز G2 سیکل سلولی تحت تابش پرتوهای یون‌ساز قرار گرفته‌اند پس از بررسی آسیب‌های کروموزومی مشخص گردید ۴۲ درصد بیماران مبتلا به سرطان پستان دارای حساسیت پرتوی بالایی می‌باشند. این نسبت در افراد سالم برابر با ۶ درصد بوده است (۳ تا ۵). افزایش حساسیت پرتوی همچنین در وابستگان خونی بیماران مبتلا به سرطان پستان نیز مشاهده شده است (۱، ۱۱) و احتمال داده می‌شود که درصد بالایی از بیماران مبتلا به سرطان پستان حامل ژن‌های کم نفوذی باشند که باعث بالابردن استعداد ابتلاء به سرطان پستان می‌گردد (۳ تا ۵).

در این تحقیق حساسیت پرتوی افراد، با بررسی آسیب‌های اولیه القا شده توسط تابش پرتوهای گاما در

افراد حساس به پرتو و عدم وجود تفاوت از لحاظ توانایی ترمیم آسیب‌ها، بین این افراد و افراد سالم است (۱۸). اما بررسی‌هایی نیز وجود دارند که نشان داده اند که ممکن است روند ترمیم در سلول‌های افراد حساس به پرتو و سالم از یکدیگر متفاوت باشند (۱۹، ۲۰).

سطح آسیب‌های پایه، پیش از پرتودهی به نمونه‌ها، در DNA سلول‌های سفید خون بیماران مبتلا به سرطان پستان بیش از افراد سالم (۱/۷ برابر) بوده است (جدول شماره ۱). این مسأله با تحقیقات قبلی که در آنها از روش‌های بررسی شکست‌های کروموزومی و میکرونوکلئی استفاده شده بود، هماهنگی دارد (۳ تا ۵). نتایج به دست آمده در این تحقیق در زمینه آسیب پایه، با تحقیقاتی که بر روی آسیب‌های DNA در سلول‌های خونی بیماران مبتلا به سرطان پستان توسط آزمون کامت انجام شده است (۲۱ تا ۲۳) کاملاً هماهنگی دارد. از جمله اسمیت و همکاران (۲۰۰۳) در تحقیق خود تفاوت مشابهی (بین ۱/۷۵ - ۱/۵ برابر) بین آسیب پایه موجود در DNA افراد مبتلا به سرطان پستان و افراد سالم گزارش نموده اند که با نتایج این تحقیق کاملاً هماهنگی دارد (۲۳).

در گروه‌های شاهد و بیمار، در بررسی همبستگی بین میزان آسیب پایه در DNA و سن افراد، ارتباط معنی‌داری بین سن و افزایش آسیب DNA مشاهده نشد. تحقیقات قبلی انجام شده توسط آزمون کامت در سلول‌های کلیه موش، آزمون آپوتوز در اسپرم انسان، آنالیز شکست‌های کروموزومی و میکرونوکلئی بیانگر افزایش آسیب پایه با افزایش سن افراد بوده‌اند (۲۴، ۲۵). در حالی که تحقیقاتی نیز با استفاده از آزمون کامت در زمینه حساسیت پرتوی افراد مبتلا به سرطان صورت گرفته‌اند که ارتباط و همبستگی بین افزایش آسیب DNA و سن افراد را نشان نداده‌اند (۲۰).

بررسی‌ها نشان داده‌اند وجود آسیب‌های پایه در DNA انعکاس دهنده بیشتر قرار گرفتن در معرض عوامل

کارسینوژن و نیز نقص در ترمیم است (۲۶، ۲۷). سطوح بالای اضافات^۱ DNA و آسیب‌های اکسیداتیو بازاها در سلول‌های تومور و بافت‌های اطراف تومور در بیماران مبتلا به سرطان پستان در مقایسه با افراد سالم گزارش شده است (۲۶). این یافته‌های نشان می‌دهند که تجمع آسیب در DNA ممکن است در سرطان‌زایی پستان نقش داشته باشد و ناپایداری DNA و بالاتر بودن سطح آسیب پایه در یک فرد می‌تواند نقش تعیین کننده‌ای در استعداد ابتلا به سرطان و نیز ایجاد سرطان پستان داشته باشد (۳ تا ۵، ۲۱).

در این تحقیق، آسیب پایه مشاهده شده در بیماران جوان مبتلا به سرطان پستان بیش از افراد جوان سالم است و با افزایش سن چنان‌که مشاهده می‌گردد مقدار آسیب پایه در بیماران و افراد سالم تا حدودی با یکدیگر مشابه می‌گردد به نحوی که خط برازش برای آسیب DNA افراد بیمار و سالم در سنین بالا تلاقی می‌کنند. تحقیقاتی که در مورد بیماران مبتلا به سرطان پستان ارثی در مقایسه با سرطان‌های پستان تک‌گه انجام شده نشان می‌دهد که سرطان‌های پستان ارثی، بیماران را در سنین کم‌تر مبتلا می‌سازند (۲۷). بالا تر بودن آسیب زمینه تجمع یافته در DNA در بیماران جوان‌تر، حاکی از ناپایداری DNA و عدم توانایی لازم در ترمیم آسیب‌ها به هنگام مواجه شدن با عوامل آسیب رساننده به DNA در بی‌ماران جوان‌تر است و می‌تواند اشاره‌ای به قوی‌تر بودن جنبه‌های ژنتیکی ابتلا به سرطان پستان در زنان جوان داشته باشد.

هنگام بررسی تأثیر سن افراد در میزان آسیب القا شده و نیز آسیب خالص القا شده در DNA بررسی‌های آماری نشان دهنده اختلاف معنی دار و وجود همبستگی بین آسیب‌های القا شده و خالص DNA و سن افراد نبودند. این می‌تواند بدین معنا باشد که آسیب‌پذیری

1. DNA adducts

که در DNA ایجاد شده‌اند و سلول پس از گذر از مراحل ترمیم موفق به تعمیر آنها نشده است. مولر و همکاران در تحقیقات خود در مورد بررسی روند ترمیم آسیب‌های القا شده در DNA بیماران مبتلا به سرطان و افراد سالم، افرادی را حساس به پرتو دانسته‌اند که شیب نزولی منحنی تغییرات آسیب باقیمانده در DNA با افزایش زمان ترمیم، کم‌تر از شیب میانگین باشد (۱۹،۲۰). البته مطالعات زیادی لازم است تا بتوان این آستانه را با درستی بیشتری تعیین نمود.

به‌طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق مبین آن است که افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آسیب‌پذیری اولیه با افراد سالم تفاوتی ندارند. این در حالی است که بالاتر بودن سطح آسیب‌های پایه در بیماران می‌تواند نشان دهنده نقص در روندهای ترمیمی در بیماران باشد.

سپاسگزارى

این تحقیق با حمایت مالی امور پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از همکاری جناب آقای دکتر فرهاد سمیعی، سرکار خانم موسوی نیا و کارکنان بخش معراج انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی تهران، سرکارخانم تیز مغز و کارکنان بخش پرستارمانی بیمارستان امام خمینی تهران که با کمک‌های خود انجام تحقیق حاضر را میسر نمودند، قدردانی و تشکر می‌شود.

اولیه و القاء آسیب در DNA سلول‌های سفید افراد با گذر زمان تغییر چندانی نمی‌کند.

نتایج نشان می‌دهند با انتخاب آسیب‌های خالص اولیه القا شده در DNA به عنوان شاخص حساسیت پرتوی و مقایسه آن بین افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان، تفاوتی بین حساسیت پرتوی افراد سالم و بیمار مشاهده نمی‌شود و افراد مبتلا به سرطان پستان از لحاظ آسیب‌پذیری اولیه با افراد سالم تفاوتی ندارند. در این بررسی افرادی حساس به اشعه در نظر گرفته شدند که میزان آسیب‌هایشان از "میانگین به علاوه انحراف معیار" همان گروه بالاتر باشد. با چینی معیاری ۱۲ درصد از بیماران (۳ نفر از ۲۹ نفر) و ۱۸ درصد از گروه شاهد (۶ نفر از ۳۱ نفر) حساسیت پرتوی بالاتر از معمول داشته‌اند (شکل‌های شماره ۳ و ۴). البته تعیین تعداد افراد با حساسیت پرتویی بالا به مقدار زیادی به محدوده طبیعی تعریف شده برای پاسخ به پرتو (cut-off)، بستگی دارد.

Scott و همکاران در سال ۱۹۹۸، در تحقیقات خود در مورد حساسیت پرتوی بیماران مبتلا به سرطان پستان با آزمون آنالیز متافاز، با در نظر گرفتن محدوده بالاتر از میانگین به علاوه دو انحراف معیار به عنوان ناحیه با حساسیت پرتویی بالا، ۳۰ درصد از بیماران را حساس به اشعه گزارش نموده‌اند. همین گروه در تحقیق خود با روش میکرونوکلئ ۱۹۹۹، ۲۵ درصد از بیماران را حساس به اشعه گزارش کرده‌اند (۳، ۴). قابل ذکر است آزمون‌های آنالیز متافاز و میکرونوکلئ آسیب‌هایی را نشان می‌دهند

فهرست منابع

1. Fertil B, Malaise E.P. Inherent cellular radiosensitivity as a basic concept for human tumor radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*, 1981; 7: 621-629.
2. Fearon E.R. Human cancer syndromes clues to the origin and nature of cancer. *Science*, 1997; 278(5348): 1043-1056.
3. Scott D, Barber J.B. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? *Br.J. Cancer*, 1998; 77(4): 614-620.
4. Scott D, Barber J.B.P. Increased chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients: a comparison of two assays. *Int. J. Radiat. Biol*, 1999; 75(7): 1-10.
5. Scott D, Spreadborough A. Genetic predisposition to breast cancer. *Lancet*, 1994; 344: 1444.
6. Deschavanne P.J, Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiation. Oncology Biol. Phys*, 1996; 34(1): 251-266.
7. McKay M, Peters L, Genetic determination of radiation response. *Int.J.Radiat.Biol*, 1997; 72(2): 225-229.
8. Parshad R, Stanford K.K. Radiation induced breaks and deficient DNA repair in cancer predisposition. *Clinical*
- Reviews in Oncology/Hematology*, 2001; 37: 87-96.
9. Robbins S.L, Cotran R.S, Kumar V. *Basic Pathology*, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2002/2006.
10. Nascimento P.A, Da Silva M.A, Oliveira E.M, Suzuki M.F, Okazaki K. Evaluation of radioinduced damage and repair capacity in blood lymphocytes of breast cancer patients. *Braz. Med. Biol. Res*, 2001; 34(2): 165-76.
11. Teare M.D, Wallace S.A. Cancer experience in the relatives of an unselected series of breast cancer patients. *Br. J.Cancer*, 1994; 10: 102-111.
12. Rojas E, Lopez M.C, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications, *Journal of Chromatography B*, 1999; 722: 225-254.
13. A. Collins, THE COMET ASSAY modified for detection of oxidized bases with the use of bacterial repair endonucleases, *Comet assay interest group website* (2002), <http://cometassay.com/>.
14. Kobayashi H, Sugiyama Ch, Morikawa Y, Hayashi M, Sofuni T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun*, 1995; 3(2): 103-115.
15. Visvardis E-E, Tassiou AM. & Piperakis SM. Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and

- cryopreserved lymphocytes exposed to H_2O_2 and γ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutation Research*, 1997; 383: 71-80.
16. J R C Sainsbury, T J Anderson, D A L Morgan. ABC of breast diseases. *Breast cancer* 2000 Sep; 321(23): 745.
 17. Chakraberly R, Sankavarayanan K, Cancer Predisposition, radiosensitivity and the risk of radiation induced cancers. *Radial. Res*, 1995; 143: 293-301.
 18. Mozdarani H, Bryant P. Kinetics of chromatid aberrations in G2 ataxia-telangiectasia cells exposed to x-rays and ara A. *Int. J. Radiat. Biol*, 1989; 55(1): 71-84.
 19. Muller W.U, Bauch T. Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Biol*, 1994; 65(3): 315-9.
 20. Muller W.U, Bauch T. Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. *Radiat Environ Biophys*, 2001; 40(1): 83-9.
 21. Rajeswari N, Ahuja Y.R, Malini U, Chandrashekar S, Balakrishna N, Rao K.V. Risk assessment in first degree female relatives of breast cancer patients using the alkaline Comet assay. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 557-561.
 22. Udumudi A, Jaiswal M, Rajeswari N, Desai N, Jain S, Balakrishna N, et al. Risk assessment in cervical dysplasia patients by single cell gel electrophoresis: a study of DNA damage and repair. *Mutat. Res*, 1998; 412: 195-205.
 23. Smith T.R, Miller M.S, Lohman K.K, Douglas Case L, Hu1 J.J. DNA damage and breast cancer risk, *Carcinogenesis*, 2003; 24(5): 883-889.
 24. Singh N.P, Muller C.H, Berger R.E. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm, *FERTILITY AND STERILITY*_ 2003 Dec; 80(6): 83-9.
 25. Singh N.P, Ogburn C.E, Wolf N.S, Van Belle G, Martin G.M. DNA double-strand breaks in mouse kidney cells with age, *Biogerontology* 2001; 2: 261-270.
 26. Grossman L, Matanoski G, Farmer E, Hedayati M, Ray S, Trock B, et al. DNA repair as a susceptibility factor in chronic diseases in human populations. In Dizdaroglu, M. and Karakaya, A.E. (eds) *Advances in DNA Damage and Repair*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999; pp: 149-167.
 27. Altaha R, Read E, Abraham J. Breast and ovarian cancer genetics and prevention. *W V Med J*. 2003 Sep-Oct; 99(5): 187-91.