

بررسی میزان حساس‌کنندگی پرتوی Iudr در مدل کشت اسفروئید از سلولهای گلیوما به روش comet

چکیده

زمینه و هدف: آزمایشات مختلف *in vitro* و *in vivo* نشان داده‌اند که استفاده از حساس‌کننده‌های پرتوی در پرتودرمانی، ابزار مفیدی در درمان سرطان گلیوما است. بسیاری از دودمان‌های سلولی تحت شرایط خاص تجمع یافته و با رشد، ساختارهای چندسلولی به نام اسفروئید (spheroid) تشکیل می‌دهند. این اسفروئیدها از ابعاد مختلف، شبیه تومورهای *in vivo* می‌باشند. بنابراین مطالعه خصوصیات رشد و رفتار اسفروئیدها، نقش مهمی در درک رفتار تومورها در شرایط مختلف آزمایشگاهی دارد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین نقش Iudr (Iododeoxyuridine) در حساس‌کنندگی پرتوی در اسفروئیدهای سلولهای گلیوما می‌باشد.

روش بررسی: این مطالعه پژوهشی از نوع آزمایشگاهی بوده و مقایسه نتایج توسط آزمون آماری T Test انجام شد. در این مطالعه از آزمون comet assay جهت مقایسه آسیب‌های ایجاد شده در DNA سلولهای U87MG از دودمان سلولی گلیوما استفاده شد. آزمایشات، روی اسفروئیدها در دو قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر انجام شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از بررسی اثر تشعشع در اسفروئیدها در حضور و عدم حضور Iudr در هر دو قطر اسفروئید نشان می‌دهد که حضور Iudr به همراه پرتو، باعث افزایش *tail moment* و در نتیجه افزایش آسیب سلولی می‌شود، بویژه در اسفروئیدهای ۳۰۰ میکرون در ۵۰٪ سلولها آسیب بیش‌تری در حضور Iudr مشاهده شده است. این نشان می‌دهد که حضور Iudr در غلظت اشباع، باعث افزایش حساس‌کنندگی پرتوی در اسفروئیدها می‌شود.

نتیجه‌گیری: مقایسه *tail moment* در اسفروئیدهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر نشان می‌دهد که در اسفروئیدهای ۳۰۰ میکرومتر، آسیب سلولی کمتر بوده است که می‌تواند به دلیل وجود سولهای G_0 و یا سلولهایی با چرخه طولانی باشد که Iudr کمتری دریافت کرده‌اند. همچنین براساس نتایج حاضر، برداشت کم Iudr نیز می‌تواند باعث افزایش حساسیت پرتوی سلول شود. جهت مؤثرتر واقع شدن این روش درمانی، می‌توان زمان انکوباسیون با Iudr را افزایش داد تا سلولهای G_0 وارد چرخه شده و زمان بیش‌تری در اختیار سلولهای با چرخه طولانی‌تر قرار گیرد و یا از موادی که مانع ترمیم آسیب می‌شوند، استفاده نمود.

کلیدواژه‌ها: ۱- حساس‌کنندگی پرتوی ۲- گلیوما ۳- اسفروئید ۴- Iudr ۵- Comet

تاریخ دریافت: ۸۵/۷/۵، تاریخ پذیرش: ۸۵/۱۰/۲۰

مقدمه

گلیوما بیش از ۴۰٪ بدخیمی‌های سیستم اعصاب مرکزی را شامل می‌شود و تشخیص آن نیز بسیار مشکل است.^(۱) اگر چه گلیوما به نقاط دور دست متاستاز نمی‌دهد، ولی به دلیل حساسیت مکان تومور، جراحی کامل در موارد زیادی

(I) دانشیار رادیوبیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول).
(II) کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.
(III) استادیار بیوفیزیک، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی ایران، تهران، ایران.

درمانی در سلولهای تومور واقعی می‌باشند.^(۱۳) سنجش کامت (Comet assay) و ژل الکتروفورز در ابعاد میکرو (Microgel electrophoresis=MGE)، ابتدا در سال ۱۹۸۴ توسط Ostling & Johanson که تحت شرایط خنثی، آزمایش خود را انجام دادند، معرفی شد؛ در این روش فقط شکست‌های دو رشته‌ای قابل بررسی بودند.^(۱۴) این روش بعدها توسط Singh و همکارانش در سال ۱۹۸۸ و سپس Olive و همکاران در سال ۱۹۹۰ تکمیل شد. در روش Singh و همکارانش، شکست‌های تک رشته‌ای و آسیب‌های بازی نیز قابل بررسی بودند.^(۱۵ و ۱۶) جهت برآورد آسیب‌های تک رشته‌ای در DNA، روش سنجش کامت در محیط بازی، یک روش بسیار حساس و دقیق است و به آسانی میزان آسیب القاء شده توسط پرتو را آشکار می‌کند.^(۱۷ و ۱۸) برتری اصلی این روش بر سایر روشها، اندازه‌گیری میزان شکست‌ها در سطح سلول منفرد است.^(۱۹)

بنابراین در مرحله اول، هدف از انجام این مطالعه بررسی میزان حساس‌کنندگی سلولهای U87MG در مدل کشت اسفروئید نسبت به پرتو توسط داروی Iudr است و در مرحله بعد، هدف، بررسی نقش سلولهای هیپوکسیک و سلولهای خارج از چرخه در میزان حساس‌کنندگی Iudr می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه، پژوهشی و از نوع آزمایشگاهی بوده و خط سلولی مورد استفاده در این مطالعه، U87MG با منشأ گلیوما بوده است. مراحل کار به شکل زیر انجام شده است: از محیط کشت MEM (Minimum essential medium) (Gibco BRL) حاوی ۱۰۰ واحد پنی‌سیلین استرپتومایسین در هر میلی‌لیتر (Penicilline streptomycine)، Fungizone، (۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) (Gibco) و ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco BRL) و ۰/۲۲ گرم بی‌کربنات سدیم (Merck)(NaHCO₃) جهت کشت سلولی استفاده شده است. جهت کشت اسفروئید، ابتدا سلولها به شکل تک لایه کشت داده شدند. جهت کشت تک لایه ابتدا سلولها با دانسیته ۱۰^۴

امکانپذیر نمی‌باشد. همچنین گلیوما نسبت به شیمی درمانی نیز مقاوم است. علی‌رغم گزارشاتی مبنی بر مؤثر بودن روش پرتودرمانی خارجی^(۲)، این روش به دلیل آسیب به سلولهای سالم، محدودیت دارد؛ در نتیجه روش درمانی جدیدی در پرتودرمانی سرطان گلیوما مورد نیاز است.

از پرمی‌دین‌های هالوژن‌دار، از قبیل Iudr و Budr (Bromodeoxyuridine)، به همراه پرتودرمانی برای افزایش آسیب رسیده به سلول استفاده می‌شود. Iudr یک آنالوگ تیمین بوده و از دهه ۱۹۶۰ تا کنون به عنوان حساس‌کننده پرتوی شناخته شده است.^(۳ و ۴) Iudr در مولکول DNA جایگزین تیمین می‌شود. ورود Iudr به DNA، شرط اصلی در حساس‌کنندگی پرتوی است و میزان این حساس‌کنندگی وابسته به میزان جایگزینی Iudr در DNA است.^(۵) از آنجایی که شعاع و اندروالسی گروه متیل و ید مشابه است، این جایگزینی سبب می‌شود که Iudr به طور برجسته‌ای همانند تیمین رفتار نماید و در فاز سنتز وارد DNA گردد.^(۶)

گلیوما به عنوان بهترین انتخاب برای استفاده کلینیکی Iudr می‌باشد چرا که اطراف سلولهای سرطانی را سلولهای عصبی سالم که قدرت تقسیم ندارند، در بر گرفته‌اند، در نتیجه برداشت دارو تنها توسط سلولهای سرطانی که از قدرت تقسیم بالایی برخوردارند، انجام می‌گردد.^(۷-۹) حضور Iudr در پرتودرمانی باعث القاء شکست‌های تکررشته‌ای در DNA می‌گردد.^(۱۰ و ۱۱) از آنجا که Iudr تنها وارد DNA سلولهایی می‌شود که در فاز سنتز هستند، محدودیت اصلی در استفاده از این دارو، وجود سلولهای توموری است که قدرت تقسیم ندارند و در فاز G₀ هستند^(۱۲) که برای رفع این محدودیت، می‌توان زمان تیمار دارویی را افزایش داد تا با وارد چرخه شدن سلولهای G₀ و در اختیار قرار گرفتن زمان بیش‌تر برای سلولهای با چرخه طولانی، برداشت Iudr افزایش یابد.

اسفروئیدهای توموری چند سلولی، شباهت بسیار زیادی به تومور in vivo دارند و مدل بسیار مناسبی برای مطالعه نفوذ و جذب داروهای مختلف و بررسی اثرات عوامل مختلف

سلول در هر سانتی‌متر مربع در فلاسک‌های (Nunc)T-25 کشت داده شدند، سپس سلولها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ و اشباع از رطوبت، نگهداری شدند. جهت تریپسینه کردن سلولها، از محلول ۰/۲۵٪ trypsin و ۰/۰۳٪ EDTA (Ethylenediaminetetraacetic) در بافر نمکی فسفات استفاده شد. در این آزمایش، کشت اسفروئید به روش liquid overlay انجام شد. برای این منظور، ابتدا سلولهای کشت تک لایه، تریپسینه شدند، پس از شمارش و تعیین تعداد سلولهای زنده، تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت MEM حاوی FCS (Fetal calf serum) ۱۰٪ بر روی پتری‌های ۱۰۰ میلی‌متر پوشیده شده با لایه نازکی از آگار ۱٪ کشت داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. ۲ بار در هفته نیمی از محیط کشت، با محیط تازه جایگزین شد. پس از ۳ روز، اسفروئیدهای با قطر تقریبی ۵۰ میکرومتر به میکروپلیت‌هایی منتقل شدند که کف هر چاهک از میکروپلیت با آگار ۱٪ پوشیده شده بود. انتقال به گونه‌ای صورت گرفت که در هر خانه یک اسفروئید قرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO₂ و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. به مدت یک ماه، هر ۴-۲ روز، دو قطر عمود بر هم در هر اسفروئید با لنز مندرج اندازه‌گیری می‌شد. حجم هر اسفروئید طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$V = a \times b^2 \times \pi / 6 \quad (1)$$

که در آن، a ، قطر کوچک و b ، قطر بزرگ اسفروئید می‌باشد. سپس منحنی حجم بر حسب زمان در مقیاس نیمه لگاریتمی ترسیم گردید. با رسم این منحنی نیز همانند منحنی رشد سلولی، سه منطقه دیده می‌شود که شرح آنها قبلاً آمده است. در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، اسفروئیدها از رابطه زیر پیروی می‌کنند:

$$V = V_0 \times e^{kt} \quad (2)$$

که در آن، V_0 ، حجم اولیه اسفروئیدها، V ، حجم اسفروئید پس از مدت زمان t و k ، نمایانگر شیب بخش خطی نمودار است. از روی شیب بخش خطی منحنی، زمان دو برابر شدن

حجم اسفروئید بدست می‌آید.

جهت پرتودهی به سلولها، پرتو گامای کبالت ۶۰ با میزان دوز ۱۰۵ گری در دقیقه به میزان ۲ گری به اسفروئیدهای سلولهای گلیوما داده شد.

روش سنجش کامت در محیط بازی مورد استفاده در این مطالعه، روش تعدیل شده توسط Singh و همکاران در سال ۱۹۸۸ می‌باشد.^(۱۵) در این روش ابتدا لام میکروسکوپ با لایه نازکی از آگارز معمولی ۱٪ پوشیده شد. تقریباً ۱۰^۴ سلول در ۱۰۰ میکرولیتر آگارز با دمای معمولی ۰/۵٪ حل شد و بر روی لام آماده شده قبلی، ریخته و در سطح لام پخش شد تا منعقد شد.

اسلایدهای آماده شده به یخچال منتقل شدند و بر روی آنها بافر لیزکننده (۲/۵ مولار کلرید سدیم، ۱۰۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HCl، ۱٪ تریتون X-100، pH=۷/۵) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در یخچال نگهداری شدند. پس از یک ساعت به اسلایدهای فوق، محلول دینیچرکننده (۳۰۰ میلی‌مولار NaOH، ۱ میلی‌مولار EDTA، pH=۱۳) اضافه شد و به مدت نیم ساعت در یخچال نگهداری شدند. این ماده باعث باز شدن رشته‌های DNA می‌شود و آسیب‌های بازی DNA را آشکار می‌سازد. اسلایدها، نهایتاً به آرامی از محلول دینیچرکننده، خارج شده و در کنار هم در داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر دینیچرکننده، قرار داده شدند و به مدت ۳۰ دقیقه تحت ولتاژ ۲۳ ولت قرار گرفتند. پس از پایان الکتروفورز، جهت خنثی سازی محیط بازی، به اسلایدها بافر خنثی کننده (۰/۴ مولار Tris-HCl، pH=۷/۵) اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه در این محیط نگهداری شدند. در نهایت اسلایدها در سینی مخصوص حاوی ۱۰ میکروگرم اتیدیم برماید در هر میلی‌متر قرار داده و رنگ‌آمیزی شدند. برای مشاهده آسیب‌ها از میکروسکوپ فلورسانس دوربین‌دار با فیلتر WG (Wide green) استفاده شد. از نرم‌افزار comet score جهت آنالیز استفاده شد که میزان آسیب به DNA در سلول را با اندازه‌گیری طول جابجایی (مهاجرت) DNA و درصد آنها تعیین می‌کند. سرانجام این نرم‌افزار، tail moment (حاصل ضرب طول

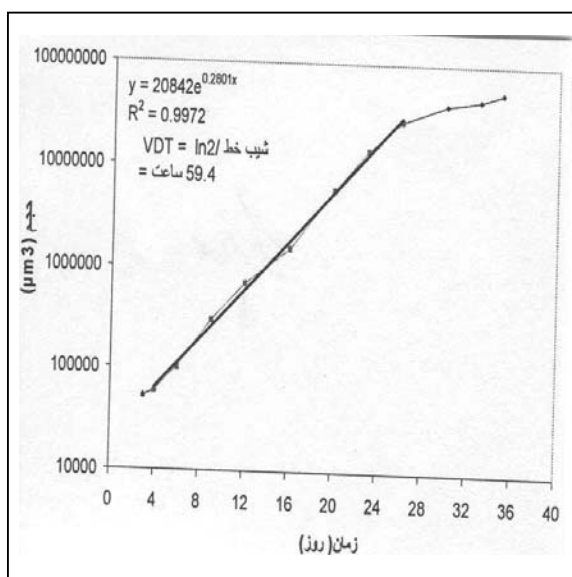
زمان ترسیم شد. نمودار شماره ۱، منحنی رشد اسفروئیدی سلولهای U87MG را نشان می‌دهد. ۳ منطقه در منحنی بدست آمده قابل تشخیص است:

۱- فاز تأخیری

۲- فاز لگاریتمی

۳- فاز پلاتو

در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، با استفاده از رابطه ۲ زمان دو برابر شدن حجم اسفروئیدها با استفاده از شیب فاز لگاریتمی محاسبه شد که معادل ۵۹/۴ ساعت بدست آمد.



نمودار شماره ۱- منحنی رشد اسفروئیدهای سلولهای U87MG در محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FCS، در روزهای مختلف دو قطر عمود بر هم اسفروئیدها به طور مرتب با لنز مدرج اندازه‌گیری شده و حجم هر اسفروئید طبق رابطه ۱ محاسبه گردید. جهت تعیین VDT، خطی به قسمت نمایی منحنی fit شده (خط مشکی پررنگ) و از روی شیب خط، VDT محاسبه گردید (آزمایشات سه بار تکرار شدند و از انحراف معیار میانگین (SEM) استفاده شد).

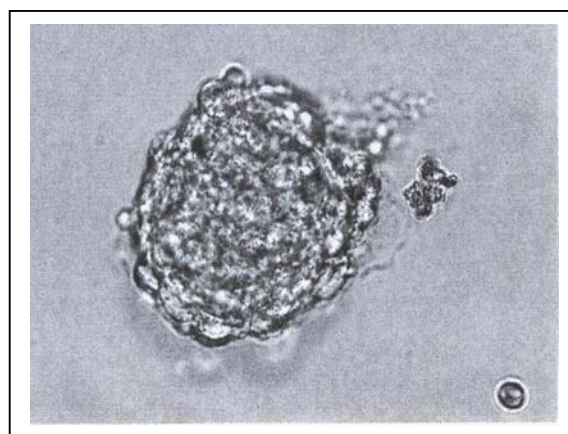
جهت تعیین اثر حساس‌کنندگی Iudr در اسفروئیدهای سلولهای گلیوما، شکست‌های تک رشته‌ای DNA با روش Comet اندازه‌گیری شدند. برای این منظور اسفروئیدهای سلول U87MG به مدت یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید (۵۹/۴ ساعت)، تحت تیمار دارویی با Iudr قرار

دنباله در شدت انتهایی) را محاسبه می‌کند. هر چه میزان و شدت این دنباله یا tail بیشتر باشد، نمایانگر آسیب بیشتر DNA سلول می‌باشد.

به کمک آزمون T Test، مقادیر P value ($P \leq 0.001$) نمونه‌ها محاسبه و مقایسه شد. نمودارها و محاسبات آماری در این مطالعه به کمک نرم‌افزار کامپیوتری Excel 2003 انجام شده است.

یافته‌ها

سلولهای U87MG به شکل تک لایه کشت داده شدند و زمان دو برابر شدن جمعیت سلولی برابر ۳۰ ساعت بدست آمد. سلولهای U87MG می‌توانند در کشت liquid overlay تشکیل اسفروئید دهند. شکل شماره ۱ اسفروئید حاصل از این سلولها را با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان می‌دهد.

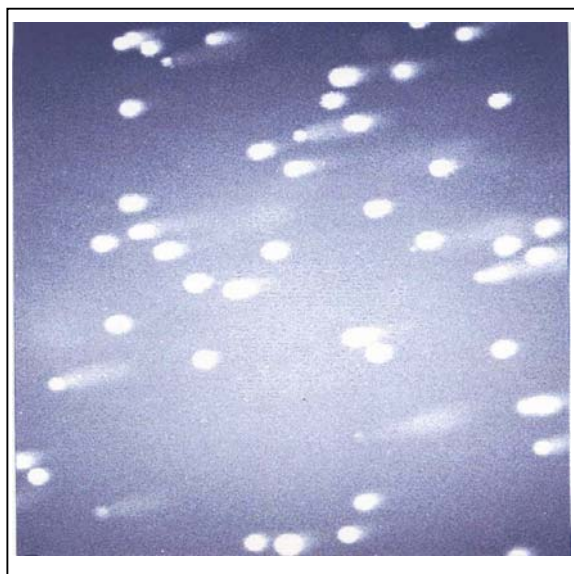


شکل شماره ۱- تصویر اسفروئید سلولهای U87MG (بزرگنمایی ۴۰×)

جهت تعیین مدت زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، منحنی رشد حجم اسفروئیدی بر حسب زمان طی یک ماه رسم شد. برای این کار پس از کشت اسفروئید و انتقال آنها به پلیت‌های ۲۴ خانه‌ای، قطرهای عمود بر هم اسفروئیدها هر ۲-۴ روز طی ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند. حجم اسفروئیدها طبق رابطه ۱ محاسبه شده و منحنی رشد اسفروئیدها در مقیاس نیمه لگاریتمی به صورت حجم اسفروئیدها بر حسب

Tail Moment ها، تعیین و اندازه‌گیری شدند. جهت بررسی اثر سلولهای هیپوکسیک، آزمایشات در دو قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر انجام شدند. شکل‌های ۲(الف-د) و ۳(الف-د) تصویر سلولهای حاصل از اسفرویدهای تیمار شده و کنترل را در گروه‌های مختلف با قطرهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر نشان می‌دهند.

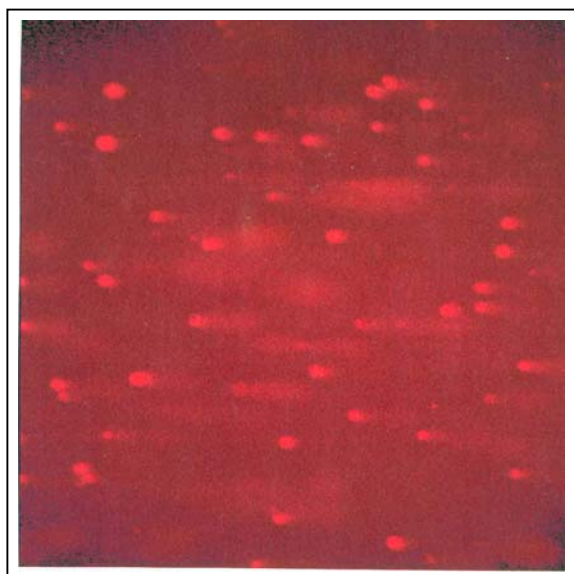
گرفتند. پس از تیمار دارویی، اسفرویدها پرتو دهی شدند، سپس تریپسینه شده و به سلولهای منفرد تبدیل شدند و پس از افزودن بافرهای لیزکننده و دینیچرکننده، تحت الکتروفورز قلیایی قرار داده شدند و در پایان پس از رنگ‌آمیزی، از سلولها عکسبرداری شد. عکس‌های گرفته شده توسط نرم‌افزار Comet Score بررسی شدند و میزان



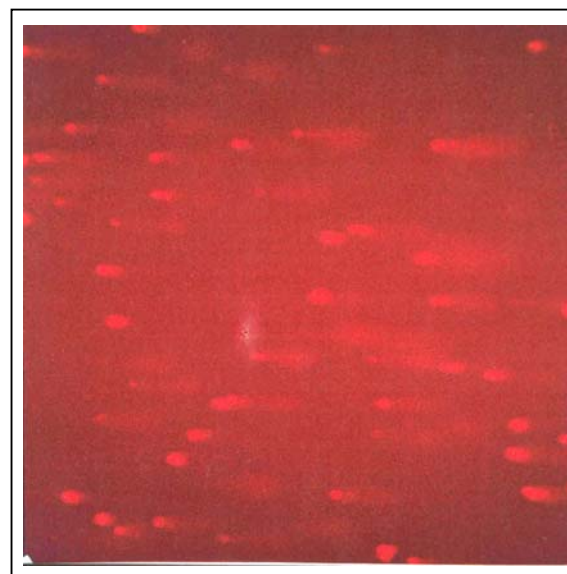
ب



الف

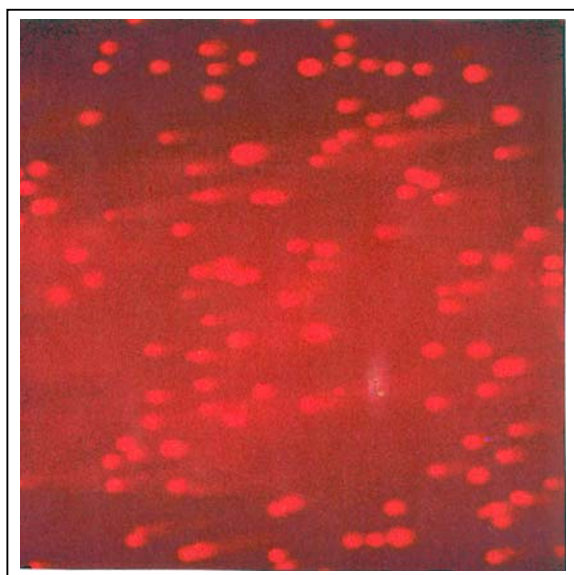


د

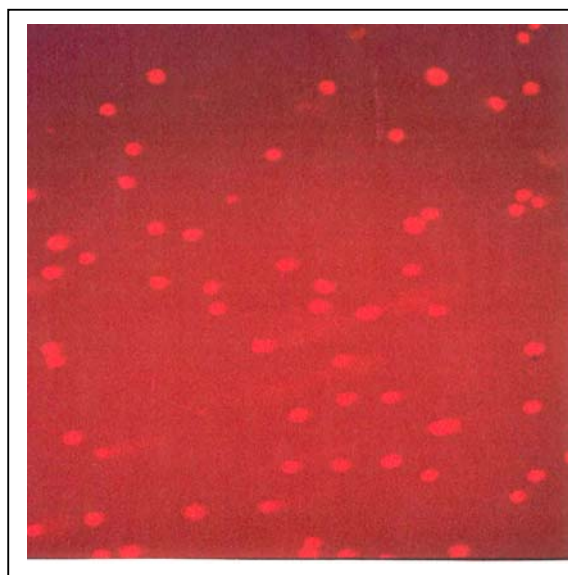


ج

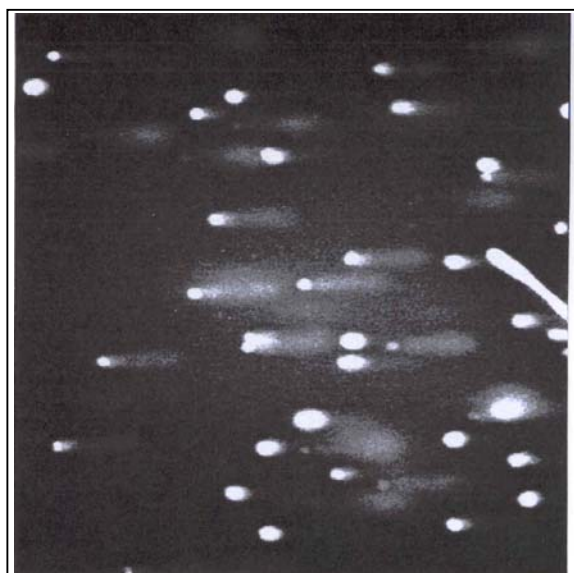
شکل شماره ۲- الف: سلولهای حاصل از اسفرویدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر - کنترل، ب: سلولهای حاصل از اسفرویدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر - تیمار شده با Iudr، ج: سلولهای حاصل از اسفرویدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر - تابش دیده با ^{60}Co ، د: سلولهای حاصل از اسفرویدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر - تابش دیده با ^{60}Co به همراه تیمار با Iudr



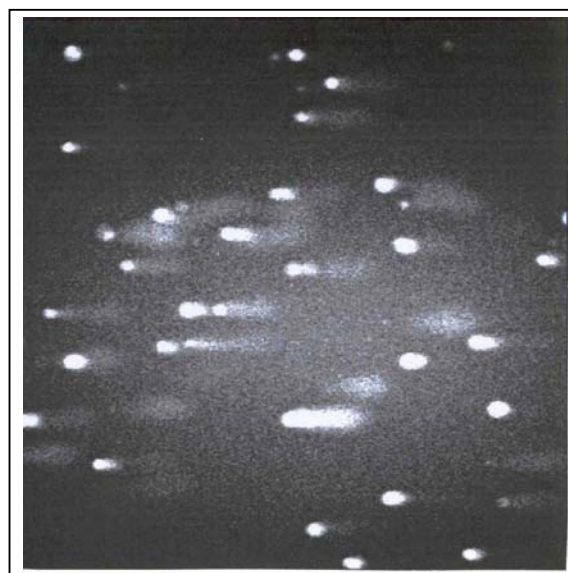
ب



الف



د



ج

شکل شماره ۳- الف: سلولهای حاصل از اسفروئیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر - کنترل، ب: سلولهای حاصل از اسفروئیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر - تیمار شده با Iudr، ج: سلولهای حاصل از اسفروئیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر - تابش دیده با ^{60}Co ، د: سلولهای حاصل از اسفروئیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر - تابش دیده با ^{60}Co به همراه تیمار با Iudr

حضور Iudr با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر از گروه تابش دیده به تنهایی است ($P < 0.001$). همان‌طور که مشاهده می‌شود، میزان Tail Momentها در تمام نمونه‌های قطر ۱۰۰ میکرومتر، بیش‌تر از ۳۰۰ میکرومتر بوده است، بویژه آنچه که مهم است میزان Tail Moment در گروه تابش دیده با

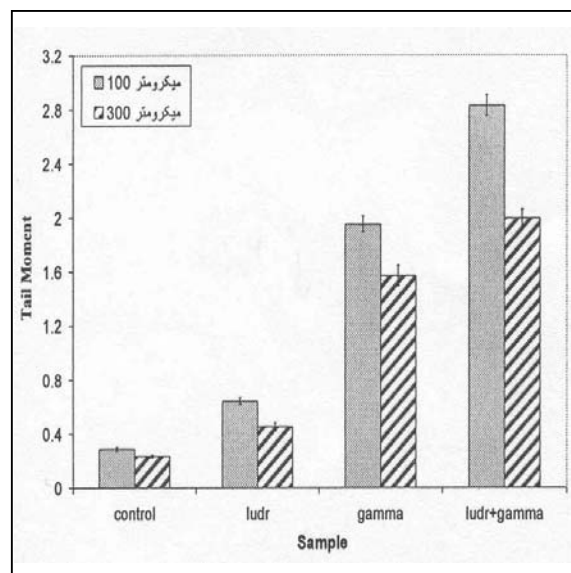
نتایج حاصل از آنالیز عکس‌های اشکال شماره ۲ و ۳ در نمودار شماره ۲ بخوبی قابل مشاهده است. این نمودار، Tail Moment اسفروئیدهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را در چهار گروه مختلف نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که میزان Tail Moment اسفروئیدهای تابش دیده در

مقایسه با کشت‌های دیگر، سلولها در کشت سه بعدی به مراتب شباهت بیشتری به وضعیت *in vivo* دارند.^(۲۱) همچنین نشان داده شده است که کشت اسفروئید، مقاومت پرتوی و گرمایی بیشتری نسبت به تک لایه از خود نشان می‌دهد.^(۲۲ و ۲۳) محدودیت در انتقال جرم در کشت سه بعدی، حالت هتروژنی برای سلولها ایجاد می‌کند که شبیه به فنوتیپ‌های متعددی است که در توده سرطانی مشاهده می‌شود.^(۲۴)

هر چند روش معمول پرتودرمانی همچنان در درمان سرطان گلیوما مورد استفاده قرار می‌گیرد، ولی اختصاصی نبودن این روش درمانی برای سلولهای سرطانی، به عنوان محدودیت بزرگی در استفاده از این روش درمانی می‌باشد.^(۲۵) از روشهای جدید درمان سرطان، پرتودرمانی هدفمند است که در این روش، دارو را در ابعاد مولکولی و به طور اختصاصی وارد تومور می‌کنند که باعث افزایش حساسیت سلولهای سرطانی به پرتو می‌شود.^(۲۶) یکی از روشهای مورد استفاده در پرتودرمانی هدفمند، استفاده از پرمیدین‌های هالوژندار می‌باشد.^(۲۷) یکی از مهم‌ترین هالوپرمیدین‌ها، Iudr می‌باشد که با ورود آن به سلول، در مولکول DNA، جایگزین تیمین می‌شود و عملکرد هسته را تغییر می‌دهد.^(۲) از آنجا که Iudr در DNA سلولهایی وارد می‌شود که در فاز سنتز هستند، حضور سلولهایی که در فاز G₀ قرار دارند و تقسیم نمی‌شوند، یکی از محدودیت‌های عمده در استفاده از این دارو در تومور هدف است.^(۱۲)

نتایج بدست آمده با غلظت‌های متفاوت Iudr، نشان دهنده یک نسبت معکوس بین سلولهای در چرخه سلولی و قطر اسفروئید است.^(۲۸) مطالعات اتورادیوگرافی نشان داده‌اند که میزان برداشت Iudr در سلولهای اسفروئیدهای با قطرهای مختلف فرق می‌کند.^(۲۸) یعنی بعضی از سلولها، برداشت بسیار کم و برخی دیگر، برداشت بسیار زیادی از Iudr را نشان داده‌اند. این مطالعه نشان می‌دهد که در اسفروئیدهای ۳۰۰ میکرون، ۵۲٪ سلولها، Iudr را برداشت کرده‌اند، ولی نشان نمی‌دهد که آیا افزایش صدمات سولی در سلولهایی که Iudr کمتری برداشت کرده‌اند نیز مشاهده خواهد شد؟ همان

Iudr در دو سری فوق است. در اسفروئیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر، وجود سلولهای هیپوکسیک و سلولهای G₀ موجب کاهش حساسیت پرتوی سلولها و در نتیجه کاهش آسیب‌رسانی به سلولها شده است. همچنین در اسفروئیدهای ۳۰۰ میکرومتر به ۵۰٪ سلولها، آسیب بیشتری در حضور Iudr وارد شده است.



نمودار شماره ۲- نمودار مقایسه Tail Momentها در اسفروئیدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر - مقایسه tail momentها نشان می‌دهد که اثر پرتو در حضور Iudr در هر دو قطر اسفروئید افزایش داشته است. همانطور که بوضوح دیده می‌شود در همه نمونه‌ها، tail moment در ۱۰۰ میکرومتر بیش‌تر از ۳۰۰ میکرومتر می‌باشد (آزمایشات سه بار تکرار شدند).

بحث

هدف از این مطالعه تعیین نقش حساس‌کنندگی پرتوی Iudr در اسفروئیدهای سلولهای گلیوما، همچنین تعیین اثر ناهمگونی در تقسیم سلولی در این حساس‌کنندگی بوده است. در این مطالعه بررسی روی سلولهای U87MG از رده سلولی گلیوما کشت داده شده به شکل اسفروئید، انجام شده است. اسفروئیدهای چندسلولی، سطح متوسطی از پیچیدگی موجود بین سلولهایی که به صورت تک لایه در شرایط *in vitro* رشد می‌کنند و تومورهای موجود در جانوران و انسان را دارا می‌باشند.^(۲۰) ثابت شده است که در

سلولهای خارج از چرخه سلولی یا G_0 ، همچنین وجود سلولهایی با چرخه سلولی طولانی‌تر در اسفروویدهای ۳۰۰ میکرومتر باشد که دارو را دریافت نکرده‌اند و یا کمتر دریافت کرده‌اند، در نتیجه نسبت به پرتو، کمتر حساس شده و کمتر تحت تأثیر پرتو یونساز قرار گرفته‌اند که منجر به کاهش آسیب به سلولها و در نتیجه مرگ سلولی کمتر شده است.

محدودیت اصلی در مطالعه حاضر، وجود سلولهای هیپوکسیک یا سلولهایی است که در فاز G_0 بوده و در نتیجه دارو را برداشت نکرده و یا کمتر برداشت کردند. محدودیت دیگر این روش، وجود اثر ترمیم در سلولها می‌باشد که در دقایق اولیه تابش‌گیری و ایجاد آسیب اتفاق می‌افتد. محدودیت دیگر این روش در کاربردهای کلینیکی انتقال دقیق دارو به محل تومور می‌باشد. جهت مؤثرتر واقع شدن این روش درمانی، باید روش دقیقی طراحی شود تا بر محدودیت‌های ناهمگونی تقسیم سلولی، حضور سلولها در فاز G_0 و سلولهای دارای چرخه طولانی غلبه نموده و به طریقی آنها را وارد چرخه سلولی نماید. پیشنهاد می‌شود که در این روش، مدت زمان تیمار دارویی با Iudr افزایش داده شود، زیرا با افزایش زمان تیمار دارویی، برداشت Iudr، هم در اسفروویدهای کوچک و هم در اسفروویدهای بزرگ، افزایش می‌یابد که به دلیل ورود Iudr به سلولهای دارای قابلیت تقسیم کمتر می‌باشد.^(۲۸) پیشنهاد دیگر جهت بررسی افزایش اثر کشندگی پرتو گاما در حضور Iudr، تعیین اثر ترمیم در اسفروویدها است. از آنجا که حضور Iudr باعث افزایش شکست‌های تک رشته‌ای و آسیب بازی در DNA می‌شود و بخشی از این آسیب نیز به روشهای مختلفی، ترمیم می‌گردد، می‌توان از یک ماده که مانع ترمیم این شکستگی‌ها می‌شود، استفاده کرد و اثر حساس‌کنندگی بیش‌تری را مشاهده نمود.

بررسی روشهای مختلف انتقال دارو به طور موضعی به درون بافت تومور، همچنین بررسی اثر تقطیع دوز و تعیین بهترین زمان تابش دوز دوم نیز به عنوان تحقیقات بعدی توصیه می‌شود.

طور که در نمودار شماره ۲ بخوبی مشاهده می‌شود، میزان صدمات وارده توسط پرتو به سلول در اسفروویدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر در حضور Iudr افزایش یافته است، این میزان به گونه‌ای است که به ۵۰٪ سلولها در حضور Iudr، آسیب بیش‌تری وارد شده است. این نتیجه در مقایسه با برداشت ۵۲ درصدی Iudr نشان می‌دهد که علی‌رغم برداشت کمتر Iudr در اسفروویدهای ۳۰۰ میکرومتر که می‌تواند به دلیل وجود سلولهای G_0 و خارج از چرخه سلولی و همچنین وجود سلولهایی با چرخه طولانی باشد، این برداشت کم نیز منجر به حساسیت‌زایی پرتوی در سلول شده است.

در مقایسه با شکست‌های دو رشته‌ای، شکست‌های تک‌رشته‌ای ناشی از پرتوهای یونساز غیرمستقیم در DNA بسیار بیش‌تر است.^(۲۹) جهت برآورد آسیب‌های تک رشته‌ای در DNA، روش سنجش کامت در محیط بازی، یک روش بسیار حساس و دقیق است و به آسانی میزان آسیب القاء شده توسط پرتو را آشکار می‌کند.^(۱۷ و ۱۸)

طبق نتایج این مطالعه، همان‌طور که در نمودار شماره ۲ دیده می‌شود، میزان tail moment در اسفروویدهای تابش دیده در حضور Iudr، با اختلاف معنی‌داری، بیش‌تر از اسفروویدهای تابش دیده بدون حضور Iudr است. این مطلب نیز نشان دهنده این است که در اسفروویدها نیز در صورت وجود غلظت اشباع Iudr، این ماده باعث افزایش حساسیت سلولی و در نتیجه افزایش کشتار سلولی می‌شود.

درصد سلولهایی که Iudr را برداشت کرده‌اند، بعد از یک بار، زمان دو برابر شدن حجمی، برای اسفروویدهای کوچک بیش‌تر از اسفروویدهای بزرگ است.^(۲۸) همچنین جذب Iudr در عمق اسفرووید در سلولهای گلیوما و سرطان پستان، کمتر از لایه‌های سطحی می‌باشد.^(۳۰) براساس نتایج حاصل از بررسی حاضر (نمودار شماره ۲)، میزان tail moment اسفروویدهای ۳۰۰ میکرومتر در مقایسه با حالت ۱۰۰ میکرومتر به طور معنی‌داری کاهش داشته است که در تأیید نتایج قبلی می‌باشد. این اختلاف می‌تواند به خاطر حضور

Lester SG, Fulton DS. 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; 36(5): 1163-7.

11- Epstein AH, Lebovics RS, Goffman T, Teague D, Fuetsch ES, Glatstein E, et al. Treatment of locally advanced cancer of the head and neck with 5'-iododeoxyuridine and hyperfractionated radiation therapy: measurement of cell labeling and thymidine replacement. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86(23): 1775-80.

12- O'Donoghue JA, Wheldon TE. Targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Phys Med Biol* 1996; 41(10): 1973-92.

13- Mairs RJ, Angerson W, Gaze MN, Murray T, Babich JW, Reid R, et al. The distribution of alternative agents for targeted radiotherapy within human neuroblastoma spheroids. *Br J Cancer* 1991; 63(3): 404-9.

14- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123(1): 291-8.

15- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988; 175(1): 184-91.

16- Olive PL, Banath JP, Durand RE. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990; 122(1): 86-94.

17- Singh NP, Stephens RE, Schneider EL. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. *Int J Radiat Biol* 1994; 66(1): 23-8.

18- Singh NP. A rapid method for the preparation of single-cell suspensions from solid tissues. *Cytometry* 1998; 31(3): 229-32.

19- Olive PL, Judit P Banath. Multicell spheroid response to drug predicted with the comet assay. *Cancer Research* 1997; 57: 5528-33.

20- Spaulding GF, Jessup JM, Goodwin TJ. Advances in cellular construction. *J Cell Biochem* 1993; 51(3): 249-51.

21- Sutherland AE, Calarco PG, Damsky CH. Expression and function of cell surface extracellular matrix receptors in mouse blastocyst attachment and outgrowth. *J Cell Biol* 1988; 106(4): 1331-48.

22- Sminia P, Acker H, Eikesdal HP, Kaaijk P, Enger P, Slotman B, et al. Oxygenation and response to irradiation of

نتیجه‌گیری

در اسفروئیدها نیز همانند کشت تک لایه در صورت وجود غلظت اشباع Iudr، این ماده باعث افزایش حساسیت سلولی و در نتیجه افزایش کشتار سلولی می‌شود. هر چقدر میزان جذب Iudr در تومور افزایش یابد، همین میزان جذب Iudr باعث افزایش حساس‌کنندگی پرتوی و در نتیجه افزایش صدمات سلولی می‌شود.

فهرست منابع

1- MacDonald DR. Low-grade gliomas, mixed gliomas, and oligodendrogliomas. *Semin Oncol* 1994; 21: 236-48.

2- Leibel SA, Scott CB, Loeffler JS. Contemporary approaches to the treatment of malignant gliomas with radiation therapy. *Semin Oncol* 1994; 21(2): 198-219.

3- Kinsella TJ. Approach to the radiosensitization of human tumors. *Cancer J Sci Am* 1996; 2(4): 184.

4- McGinn CJ, Shewach DS, Lawrence TS. Radiosensitizing nucleosides. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88(17): 1193-203.

5- 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.

6- Commerford SL. Biological stability of 5-iodo-2'-deoxyuridine labeled with iodine-125 after its incorporation into the deoxyribonucleic acid of the mouse. *Nature* 1965; 206(987): 949-50.

7- Kassis AI, Van den Abbeele AD, Wen PY, Baranowska-kortylewicz J, Aaronson RA, DeSisto WC, et al. Specific uptake of the auger electron-emitting thymidine analogue 5-[123I/125I]iodo-2'-deoxyuridine in rat brain tumors: diagnostic and therapeutic implications in humans. *Cancer Res* 1990; 50(16): 5199-203.

8- Kassis AI, Tumeh SS, Wen PY, Baranowska-Kortylewicz J, Van den Abbeele AD, Zimmerman RE, et al. Intratumoral administration of 5-[123I]iodo-2'-deoxyuridine in a patient with a brain tumor. *J Nucl Med* 1996; 37(4Suppl): 19S-22S.

9- Kassis AI, Wen PY, Van den Abbeele AD, Baranowska-Kortylewicz J, Makrigiorgos GM, Metz KR, et al. 5-[125I]iodo-2'-deoxyuridine in the radiotherapy of brain tumors in rats. *J Nucl Med* 1998; 39(7): 1148-54.

10- Urtasun RC, Kinsella TJ, Farnan N, DelRowe JD,

organotypic multicellular spheroids of human glioma. *Anticancer Res* 2003; 23(2B): 1461-6.

23- Desoize B, Jardillier J. Multicellular resistance: A paradigm for clinical resistance? *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 36(2-3): 193-207.

24- Monastyrskaya K, Babiychuk EB, Schittny JC, Rescher U, Gerke V, Mannherz HG, et al. The expression level of three raft-associated molecules in cultivated vascular cells are dependent on culture conditions. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60(12): 2702-9.

25- Zalutsky MR. Targeted radiotherapy of brain tumors. *Br J Cancer* 2004; 90(8): 1469-73.

26- Hopkins K, Chandler C, Eatough J, Moss T, Kemshead JT. Direct injection of ⁹⁰Y MoAbs into glioma tumor resection cavities leads to limited diffusion of the radioimmunoconjugates into normal brain parenchyma: A model to estimate absorbed radiation dose. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998; 40(4): 835-44.

27- Sullivan FJ, Herscher LL, Cook JA, Smith J, Steinberg SM, Epstein AH, 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; 30(3): 583-90.

28- Neshasteh-Riz A, Angerson WJ, Reeves JR, Smith G, Rampling R, Mairs RJ. Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: implications for DNA-targeted radiotherapy using Auger electron emitters. *Br J Cancer* 1997; 75(4): 493-9.

29- Ward JF. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1988; 35: 95-125.

30- Olea N, Villalobos M, Ruiz de Almodovar JM, Pedraza V. MCF-7 breast cancer cells grown as multicellular spheroids in vitro: effect of 17 beta-estradiol. *Int J Cancer* 1992; 50(1): 112-7.

Evaluation of Iudr Radiosensitization in Multicellular Glioma Spheroids by Comet Assay

^I
*A. Neshasteriz, PhD

^{II}
A.A. Parach, MSc

^{III}
S. Khoei, PhD

Abstract

Background & Aim: In vitro experiments and in vivo studies have revealed that radiosensitizers in radiation therapy may serve as powerful tools in the treatment of glioma cancers. Many cell lines, under some specific conditions will aggregate and grow to form multicellular structures called spheroid. These spheroids resemble in vivo tumor models in several aspects. Therefore studying growth characteristics and behavior of spheroids is beneficial in understanding the behavior of tumors under various experimental conditions. The aim of the current study was to determine the role of Iudr (Iododeoxyuridine) in sensitizing glioma cell line spheroids to radiation.

Material and Methods: This study is an experimental research and T-test was used to compare the results. In this study we compared the DNA induced damages in U87MG cell line using alkaline comet assay method. Experiments were performed with two different sizes of spheroids (100 μ m and 300 μ m).

Results: Our results showed the effect of radiation on both diameters of spheres in the presence and absence of Iudr. According to radiation in the presence of Iudr increased the tail moment and thus increased cellular damage. Iudr, in saturation concentration increases the cells radiosensitivity. Specifically in 300 μ m spheroids, in the presence of Iudr, cell damage was increased to 50%.

Conclusion: Comparison of tail moments in spheroids with 100 and 300 μ m diameter showed that cell damages in larger spheroids (300 μ m) are lesser than smaller ones (100 μ m). It may be because of existence of G₀ cells and cells with longer cycles, in which Iudr is incorporated to a lesser extent into them. Also, our results showed that minimum presence of Iudr increased the cells radiosensitivity. Therefore in order to increase the efficacy of this modality of treatment we can increase the incubation time of Iudr, increasing the cell population in the cell cycle. In addition cells with longer cycles have more time to incorporate Iudr, or we can use agents that inhibit repairing.

Key Words: 1) Radiosensitization 2) Glioma 3) Spheroid 4) Iudr 5) Comet

^I) Associate Professor of Radiation Biology, Faculty of Paramedical sciences, Hemmat and Chamran highway crossing, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran. (*Corresponding Author)

^{II}) MSc in Medical Physics, Faculty of Paramedical sciences, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.

^{III}) Assistant Professor of Biophysics, Faculty of Paramedical sciences, Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.