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

*دکتر علی نشاسته‌ریز I
علی‌اصغر پرچ II
دکتر سمیده خویی III

چکیده

زمینه و هدف: آزمایشات مختلف in vitro و in vivo نشان داده‌اند که استفاده از حساس کننده‌های 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 اسفروییید(spheroid) تشکیل می‌دهند. این اسفروییدها از ابعاد مختلف، شبیه تومورهای in vivo می‌باشند. بنابراین مطالعه خصوصیات رشد و رفتار اسفروییدها، نقش مهمی در درک رفتار تومورها در شرایط مختلف آزمایشگاهی دارد. هدف از انجام این مطالعه، تعیین نقش Iudr(Iododeoxyuridine) در حساس کنندگی پرتوی در اسفروییدهای 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 اسفروییدها در دو قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر انجام شد.

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

نتیجه‌گیری: مقایسه tail momentها در اسفروییدهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر نشان می دهد که در اسفروییدهای 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 – حساس کنندگی پرتوی ۲ – گلیوما ۳ – اسفروییید ۴ – Iudr ۵ – Comet

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

مقدمه

گلیوما بیش از ٤٠٪ 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 ـ درمانی ایران، تهران، ایران(*مؤلف مسؤول).
II) کارشناس ارشد فیزیک‌پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.
III) استادیار بیوفیزیک، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران، تهران، ایران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

امکانپذیر نمی‌باشد. همچنین گلیوما نسبت به شیمی درمانی نیز مقاوم است. علی رغم 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 پریمیدین‌های 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 حساس کننده پرتوی شناخته شده است.[۳و ٤] Iudr در مولکول DNA جایگزین تیمین می‌شود. ورود Iudr به DNA، شرط اصلی در حساس کنندگی پرتوی است و میزان این حساس‌کنندگی وابسته به میزان جایگزینی Iudr در DNA است.[٥] از آنجایی که شعاع واندروالسی 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.[٦]

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 تک‌رشته‌ای در DNA می‌گردد.[۱۰و 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 G_0 هستند[۱۲] که برای رفع این محدودیت، می‌توان زمان تیمار دارویی را افزایش داد تا با وارد چرخه شدن سلولهای G_0 و در اختیار قرار گرفتن زمان بیش‌تر برای سلولهای با چرخه طولانی، برداشت Iudr افزایش یابد.

اسفروییدهای 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 درمانی در سلولهای تومور واقعی می‌باشند.[۱۳] سنجش کامت(Comet assay) و ژل الکتروفورز در ابعاد میکرو (Microgel electrophoresis=MGE)، ابتدا در سال ۱۹۸٤ توسط Ostling & Johanson که تحت شرایط خنثی، آزمایش خود را انجام دادند، معرفی شد؛ در این روش فقط شکست‌های دو رشته‌ای قابل بررسی بودند.[۱٤] این روش بعدها توسط Singh و همکارانش در سال ۱۹۸۸ و سپس توسط Olive و همکاران در سال ۱۹۹۰ تکمیل شد. در روش Singh و همکارانش، شکست‌های تک رشته‌ای و آسیب‌های بازی نیز قابل بررسی بودند.[۱۵و ۱٦] 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.[۱۷و 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 حساس کنندگی سلولهای U87MG در مدل کشت اسفروییید نسبت به پرتو توسط داروی Iudr است و در مرحله بعد، هدف، بررسی نقش سلولهای هیپوکسیک و سلولهای خارج از چرخه در میزان حساس کنندگی Iudr می‌باشد.

روش بررسی

این مطالعه، پژوهشی و از نوع آزمایشگاهی بوده و خط سلولی مورد استفاده در این مطالعه، U87MG با منشا 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 streptomyecine)، Fungizone (۰/۲۵ میکروگرم در میلی‌لیتر) (Gibco) و ۱۰٪ سرم جنین گاوی(Gibco BRL) و ۰/۲۲ گرم بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$)(Merck) جهت کشت سلولی استفاده شده است.

جهت کشت اسفروییید، ابتدا سلولها به شکل تک لایه کشت داده شدند. جهت کشت تک لایه ابتدا سلولها با دانسیته 10^4

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

سلول در هر سانتی‌متر مربع در فلاسک‌های T-25(Nunc) کشت داده شدند، سپس سلولها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 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 اسفروییید 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 5×10^5 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٪ CO_2 و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. ۲ بار در هفته نیمی از محیط کشت، با محیط تازه جایگزین شد. پس از ۳ روز، اسفروییدهای 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 اسفروییید قرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۵٪ CO_2 و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. به مدت یک ماه، هر ٤-۲ روز، دو قطر عمود بر هم در هر اسفروییید با لنز مندرج اندازه‌گیری می‌شد. حجم هر اسفروییید طبق رابطه زیر محاسبه شد:

$$V= a\times b^2\times\pi/6 \quad (۱)$$ (حجم اسفروییید)

که در آن، a، قطر کوچک و b، قطر بزرگ اسفروییید 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، اسفروییدها از رابطه زیر پیروی می‌کنند:

$$V= V_0\times e^{kt} \quad (۲)$$ (حجم اسفروییید)

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

جهت پرتودهی به سلولها، پرتو گامای کبالت ٦۰ با میزان دوز ۱۰۵ گری در دقیقه به میزان ۲ گری به اسفروییدهای 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 10^4 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 لیز کننده (۲/۵ مولار کلرید سدیم، ۱۰۰ میلی‌مولار EDTA، ۱۰ میلی‌مولار Tris-HC1، 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 دینیچر کننده(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 دینیچر کننده، خارج شده و در کنار هم در داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر دینیچر کننده، 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(۰/٤ 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 فیلترWG(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

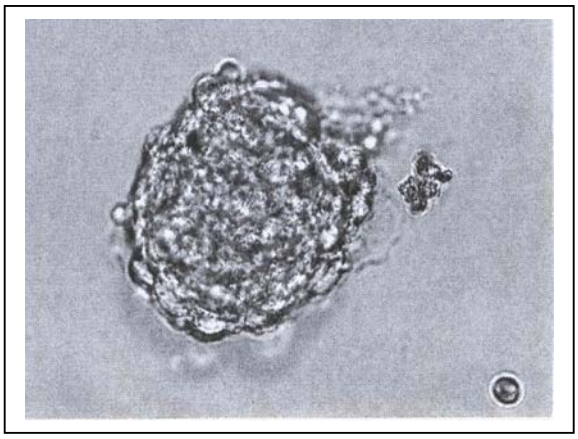
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

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<=۰/۰۰۱) 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 اسفروییید دهند. شکل شماره ۱ اسفروییید حاصل از این سلولها را با استفاده از میکروسکوپ معکوس نشان می‌دهد.



شکل شماره ۱- تصویر اسفروییید سلولهای U87MG (بزرگنمایی ٤٠×)

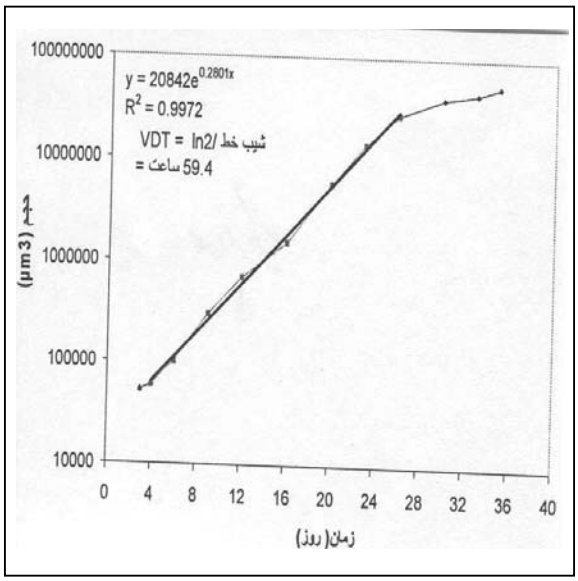
جهت تعیین مدت زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید، منحنی رشد حجم اسفروییدی بر حسب زمان طی یک ماه رسم شد. برای این کار پس از کشت اسفروییید و انتقال آنها به پلیت‌های ٢٤ خانه‌ای، قطرهای عمود بر هم اسفروییدها هر ٤-٢ روز طی ۳۰ روز اندازه‌گیری شدند. حجم اسفروییدها طبق رابطه ۱ محاسبه شده و منحنی رشد اسفروییدها در مقیاس نیمه لگاریتمی به صورت حجم اسفروییدها بر حسب زمان ترسیم شد. نمودار شماره ۱، منحنی رشد اسفروییدی 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 اسفروییدها با استفاده از شیب فاز لگاریتمی محاسبه شد که معادل ٥٩/٤ ساعت بدست آمد.

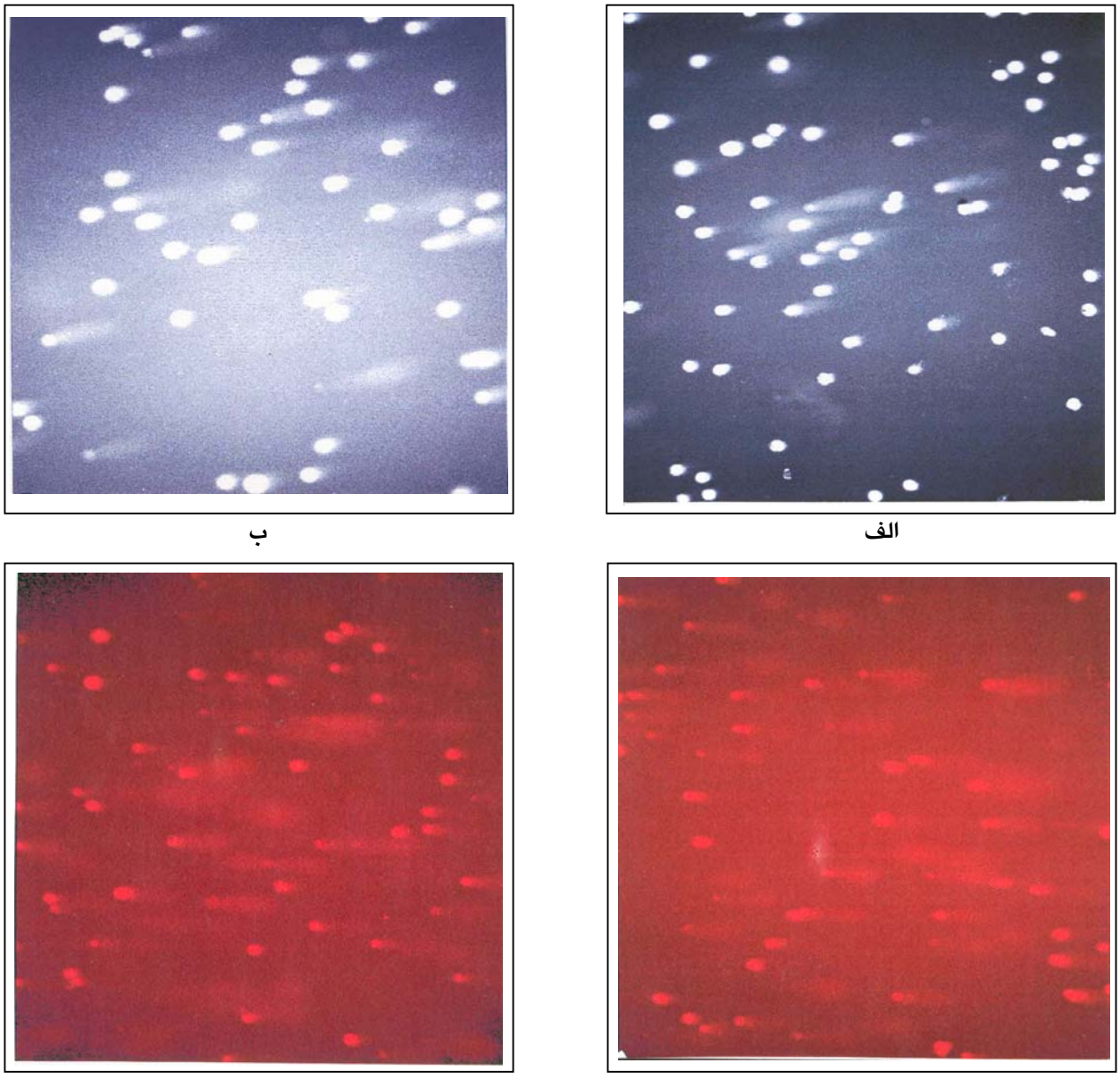


نمودار شماره ۱- منحنی رشد اسفروییدهای سلولهای U87MG در محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪FCS. در روزهای مختلف دو قطر عمود بر هم اسفروییدها به طور مرتب با لنز مدرج اندازه‌گیری شده و حجم هر اسفروییید طبق رابطه ۱ محاسبه گردید. جهت تعیین VDT، خطی به قسمت نمایی منحنی fit شده(خط مشکی پررنگ) و از روی شیب خط، VDT محاسبه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

جهت تعیین اثر حساس کنندگی Iudr در اسفروییدهای سلولهای گلیوما، شکست‌های تک رشته‌ای DNA با روش Comet اندازه‌گیری شدند. برای این منظور اسفروییدهای سلول U87MG به مدت یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروییید(٥٩/٤ ساعت)، تحت تیمار دارویی با Iudr قرار

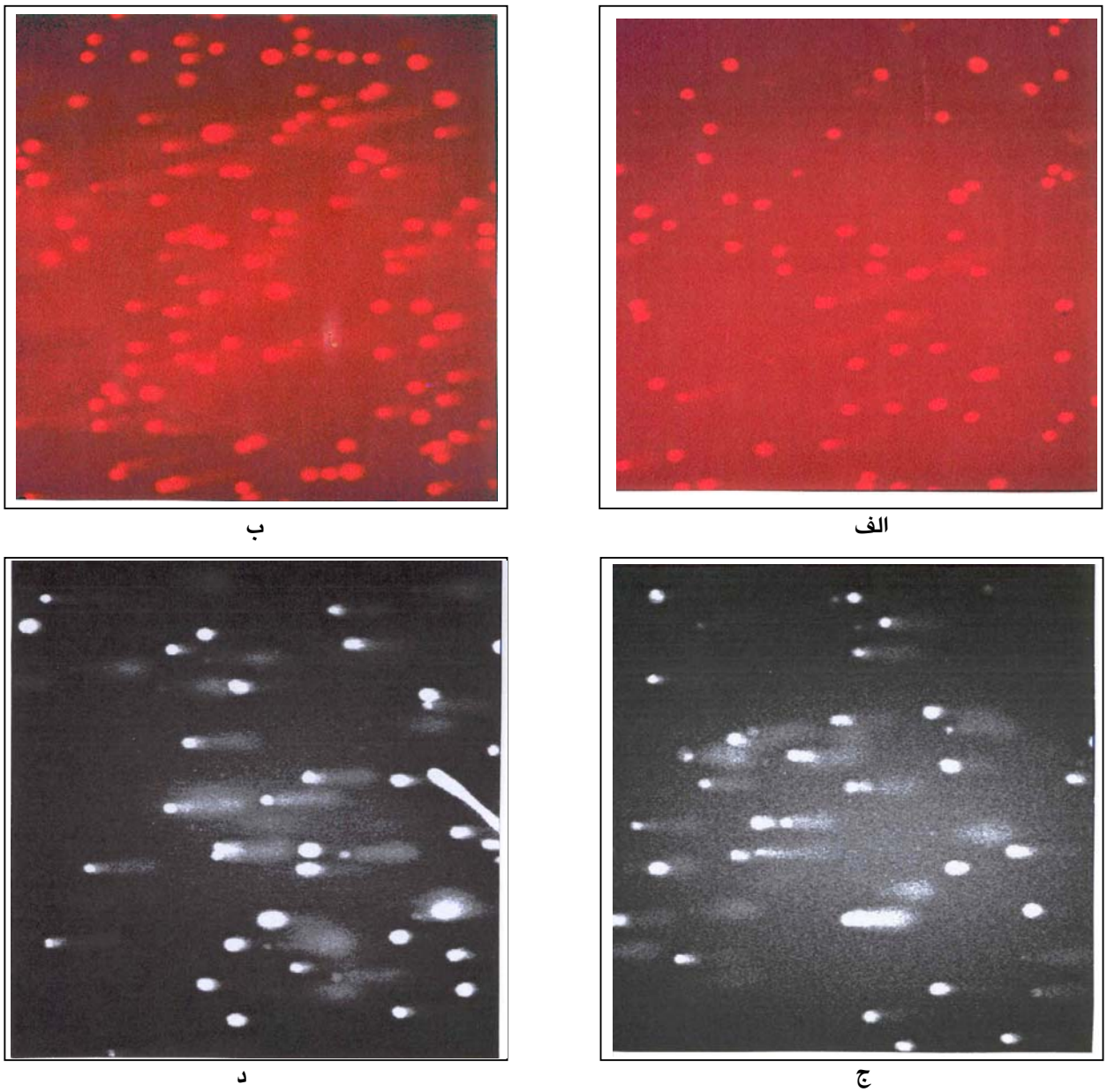
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

گرفتند. پس از تیمار دارویی، اسفروییدها پرتودهی شدند، سپس تریپسینه شده و به سلولهای منفرد تبدیل شدند و پس از افزودن بافرهای لیز کننده و دینیچر کننده، 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 Tail Momentها، تعیین و اندازه گیری 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 اسفروییدهای تیمار شده و کنترل را در گروه‌های مختلف با قطرهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر نشان می‌دهند.



شکل شماره ۲- الف: سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر ـ کنترل، **ب:** سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر ـ تیمار شده با Iudr، **ج:** سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر ـ تابش دیده با ۶۰Co، **د:** سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر ـ تابش دیده با ۶۰ Co به همراه تیمار با Iudr

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

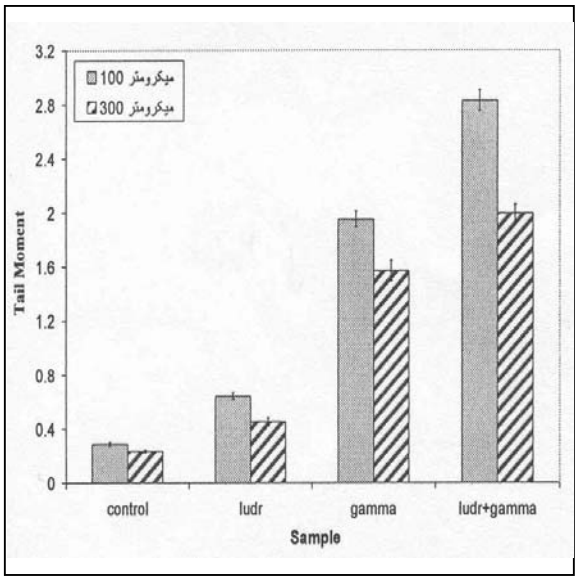


شکل شماره ۳- الف: سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر ـ کنترل، **ب:** سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر ـ تیمار شده با Iudr، **ج:** سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر ـ تابش دیده با ۶۰Co، **د:** سلولهای حاصل از اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر ـ تابش دیده با ۶۰ Co به همراه تیمار با Iudr

نتایج حاصل از آنالیز عکس‌های اشکال شماره ۲ و ۳ در نمودار شماره ۲ بخوبی قابل مشاهده است. این نمودار، Tail Moment اسفروییدهای ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را در چهار گروه مختلف نشان می‌دهد. نتایج نشان می‌دهد که میزان Tail Moment اسفروییدهای تابش دیده در حضور Iudr با اختلاف معنی‌داری بیش‌تر از گروه تابش دیده به تنهایی است($P<0/001$). همان طور 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

Iudr در دو سری فوق است. در اسفروییدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر، وجود سلولهای هیپوکسیک و سلولهای G_0 موجب کاهش حساسیت پرتوی سلولها و در نتیجه کاهش آسیب‌رسانی به سلولها شده است. همچنین در اسفروییدهای ۳۰۰ میکرومتر به ۵۰٪ سلولها، آسیب بیش‌تری در حضور Iudr وارد شده است.



نمودار شماره ۲- نمودار مقایسه Tail Momentها در اسفروییدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر ـ مقایسه tail momentها نشان می‌دهد که اثر پرتو در حضور Iudr در هر دو قطر اسفروییدی 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 اسفروییدهای سلولهای گلیوما، همچنین تعیین اثر ناهمگونی در تقسیم سلولی در این حساس کنندگی بوده است. در این مطالعه بررسی روی سلولهای U87MG از رده سلولی گلیوما کشت داده شده به شکل اسفروییدی، انجام شده است. اسفروییدهای 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 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 اسفروییدی، مقاومت پرتوی و گرمایی بیش‌تری نسبت به تک لایه از خود نشان می‌دهد.[۲۲و 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 پریمیدین‌های هالوژندار می‌باشد.[۲۷] یکی از مهم‌ترین هالوپریمیدین‌ها، Iudr می‌باشد که با ورود آن به سلول، در مولکول DNA، جایگزین تیمین می‌شود و عملکرد هسته را تغییر می‌دهد.[۳] از آنجا که Iudr در DNA سلولهایی وارد می‌شود که در فاز سنتز هستند، حضور سلولهایی که در فاز G_0 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 اسفروییدی است.[۲۸] مطالعات اتورادیوگرافی نشان داده‌اند که میزان برداشت Iudr در سلولهای اسفروییدهای 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 اسفروییدهای 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

طور که در نمودار شماره ۲ بخوبی مشاهده می‌شود، میزان صدمات وارده توسط پرتو به سلول در اسفرواییدهای 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 اسفرواییدهای 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.[۱۷و ۱۸]

طبق نتایج این مطالعه، همان طور که در نمودار شماره ۲ دیده می‌شود، میزان tail moment در اسفرواییدهای تابش دیده در حضور Iudr، با اختلاف معنی‌داری، بیش‌تر از اسفرواییدهای تابش دیده بدون حضور Iudr است. این مطلب نیز نشان دهنده این است که در اسفرواییدها 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 اسفرواییدهای کوچک بیش‌تر از اسفرواییدهای بزرگ است.[۲۸] همچنین جذب Iudr در عمق اسفروییید در سلولهای گلیوما و سرطان پستان، کمتر از لایه‌های سطحی می‌باشد.[۳۰] براساس نتایج حاصل از بررسی حاضر(نمودار شماره ۲)، میزان tail moment در اسفرواییدهای 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 سلولهای خارج از چرخه سلولی یا G_0، همچنین وجود سلولهایی با چرخه سلولی طولانی‌تر در اسفرواییدهای 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 اسفرواییدهای کوچک و هم در اسفرواییدهای 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 اسفرواییدها 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

نتیجه‌گیری

در اسفروییدها 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 افـزایش یابـد، همـین میزان جذب Iudr باعث افزایش حساس کننـدگی پرتـوی 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, 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

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 Biiol 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]

Evaluation of Iudr Radiosensitization in Multicellular Glioma Spheroids by Comet Assay

***A. Neshasteriz, PhD** [I] **A.A. Parach, MSc** [II] **S. Khoei, PhD** [III]

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. Thses 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(100µm and 300 µm).

Results: Our results showed the effect of radiation on both diameters of spheres in the presence and absence of Iudr. Accordiology 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 300µm spheroids, in the presence of Iudr, cell damage was increased to 50%.

Conclusion: Comparison of tail moments in spheroids with 100 and 300µm diameter showed that cell damages in larger spheroids(300µm) are lesser than smaller ones(100µm). It may be because of existence of G_0 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 inorder to increase the efficacy of this modality of treatmnt 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.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-15]