

بررسی میزان صدمات سیتوژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان طی زمان‌های مختلف انکوباسیون سلول‌ها با Iudr در مدل کشت اسفروئید از سلول‌های گلیوما به روش کامت

چکیده

زمینه و هدف: ۵-ایدو-۲-دئوکسی‌یوریدین (Iudr)، آنالوگ تیمیدین و به عنوان حساس‌کننده پرتوی سلول‌های سرطان انسانی در *in vitro* و *in vivo* شناخته شده است. مطالعات بر روی اسفروئیدها نشان داده است که افزایش زمان انکوباسیون Iudr سبب افزایش برداشت سلول‌ها می‌شود. هدف از این مطالعه، بررسی میزان صدمات سیتوژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان طی زمان‌های مختلف انکوباسیون سلول‌ها با Iudr در مدل کشت اسفروئید و تعیین زمان لازم انکوباسیون جهت ایجاد بیشترین حساسیت سلولی است.

روش بررسی: در این مطالعه بنیادی - کاربردی، از خط سلولی U87MG با منشاء گلیوما استفاده شد که به صورت اسفروئید با دو قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر کشت داده شد. اسفروئیدها طی زمان‌های یک، دو و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید با غلظت $1 \mu\text{M}$ از Iudr انکوبه شدند. پس از تیمار دارویی و 2Gy پرتودهی با گامای کبالت ^{60}Co (60)، میزان آسیب‌های وارده به DNA سلول به روش کامت قلبی اندازه‌گیری شده، سپس براساس آزمون آماری t-test بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج حاصل از این مطالعه نشان داده است که با افزایش زمان انکوباسیون اسفروئیدها با Iudr، میزان آسیب‌های پرتوی به DNA در هر دو قطر افزایش یافت و میزان آن در اسفروئیدهای به قطر ۳۰۰ میکرومتر بیشتر از ۱۰۰ میکرومتر بوده است. مطالعات نشان داده است که با افزایش زمان انکوباسیون از یک زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید به دو زمان، افزایش معنی‌داری در میزان آسیب‌های وارده به DNA مشاهده می‌شود. در حالی که از دو زمان به سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، آسیب قابل ملاحظه‌ای به DNA وارد نمی‌گردد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده، عملاً انکوباسیون سلول‌ها طی دو زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید نسبت به یک و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، زمان مناسب‌تری جهت ایجاد حساسیت پرتوی است.

کلیدواژه‌ها: ۱- گلیوبلاستوما ۲- اسفروئید ۳- Iudr ۴- کامت

تاریخ دریافت: ۸۵/۱۱/۲۳، تاریخ پذیرش: ۸۶/۶/۲۱

مقدمه

این مولکول‌ها، به دلیل شباهت ساختاری به باز تیمین در زمان سنتز DNA (فاز S) به جای تیمین در مولکول DNA قرار می‌گیرند و حساسیت پرتوی را افزایش می‌دهند.^(۳) مکانیسم بیوشیمیایی حساس‌کننده‌های پرتوی مانند Iudr کاملاً شناخته شده نیست. مطالعات نشان داده است که این عوامل در واکنش با الکترون‌های هیدراته القاء شده توسط

پیریمیدین‌های هالوژن‌دار، حدود ۴۰ سال است که به عنوان حساس‌کننده پرتوی مورد توجه قرار گرفته‌اند و در سرطان‌های مختلف نتایج قابل قبولی در آزمایش‌های کلینیکی از آنها به دست آمده است.^(۱) پیریمیدین‌های هالوژن دار، جهت درمان سلول‌های سرطانی که سرعت تکثیر بالایی دارند به کار می‌روند.^(۲)

(I) دانشیار و PhD فیزیک پزشکی، گروه رادیولوژی، دانشکده پیراپزشکی، تقاطع بزرگراه شهید همت و چمران، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران (*مؤلف مسؤول).

(II) کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی.

(III) استادیار و PhD بیوفیزیک، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران.

آسان است.^(۸) هدف از انجام این تحقیقات، بررسی تأثیر افزایش مدت زمان انکوباسیون اسفروبیدهای سلولهای گلیوبلاستوما با Iudr بر میزان صدمات سیتوژنتیکی ناشی از پرتوهای یونیزان می‌باشد. نتیجه این تحقیق می‌تواند گام موثری در تعیین استراتژی درمان در کاربرد مواد حساس کننده در تومورهای بدخیمی چون گلیوما باشد.

روش بررسی

این مطالعه از نوع بنیادی - کاربردی است. خط سلولی: خط سلولی مورد استفاده در این مطالعه، U87MG با منشأ گلیوما بوده است؛ که در محیط کشت MEM (Gibco BRL) حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ u/ml)، استرپتومایسین (۰/۲۵ μg/ml)، Fungizone (Gibco) (۱ ml/L)، ۱۰٪ سرم جنین گاوی (Gibco BRL) و ۰/۲۲ گرم NaHCO₃ (Merck) کشت داده شده است. کشت تک لایه: جهت کشت تک لایه، سلول‌ها با دانسیته ۱۰^۲ cells/cm² در فلاسک‌های T-25 (Nune) کشت داده شدند. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷°C و ۵٪ CO₂ و اشباع از رطوبت نگهاری شدند. جهت تریپسینه کردن سلول‌ها، از محلول ۰/۲۵٪ تریپسین و ۰/۰۳٪ EDTA در بافر نمکی فسفات استفاده شد.

کشت اسفروبیید و اندازه‌گیری زمان دو برابر شدن حجم آن: جهت کشت اسفروبیید، تعداد ۵×۱۰^۵ سلول در ده میلی‌لیتر محیط کشت MEM حاوی ۱۰٪ FCS بر روی پتری‌های ۱۰۰ mm پوشیده شده با لایه نازکی از آگار ۱٪ کشت داده شدند. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪ CO₂ و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. هر سه روز یک بار نیمی از محیط کشت با محیط تازه جایگزین می‌شد. پس از سه روز، اسفروبیدهای با قطر تقریبی ۵۰ μm به میکروپلیت‌هایی منتقل شدند که کف هر چاهک از میکروپلیت با آگار ۱٪ پوشیده شده است. انتقال به گونه‌ای صورت گرفت که در هر خانه، یک اسفروبیید قرار داده شد. پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷°C با ۵٪ CO₂ و اشباع از رطوبت نگهداری شدند. به مدت ۳۸ روز، به طور متناوب دو قطر عمود بر هم هر اسفروبیید با لنز مدرج اندازه‌گیری می‌شد. حجم هر اسفروبیید طبق رابطه زیر

پرتوهای یونیزان، ایجاد رادیکال‌های آزاد واکنش‌گر اوراسیل و یون‌های هالید می‌کنند.^(۹) نتیجه آن، ایجاد شکست‌های تک رشته‌ای DNA و متعاقب آن شکست‌های دو رشته‌ای است. در صورت عدم ترمیم یا ترمیم ناقص، سبب مرگ سلولی می‌شود.^(۱۰) میزان جایگزینی این دارو در DNA سلول‌های سرطانی و طبیعی، به اختلاف سنتز DNA سلول‌ها بستگی دارد. تمام سلول‌هایی که قدرت تکثیر دارند قادر به دریافت این دارو می‌باشند. لذا، یکی از کاربردهای این مولکول‌ها در تومورهایی است که سلول‌های طبیعی اطراف تومور، قدرت تقسیم کمی داشته باشند.

اسفروبیدهای 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.^(۱۱)

مطالعات نشان داده است که با انکوباسیون اسفروبیدهای با قطر ۲۰۰-۱۰۰ میکرومتر طی یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیید با Iudr نشاندار، حدود ۷۲ درصد از سلول‌ها نشاندار شده‌اند. در حالی که در اسفروبیدهای بزرگ با قطر ۱۰۰۰-۷۰۰ میکرومتر، حدود ۲۸ درصد سلول‌ها پس از این مدت زمان انکوباسیون نشان‌دار شده‌اند.^(۱۲) این مطلب نشان دهنده آن است که با افزایش قطر اسفروبیید، تنوع سیکل سلولی افزایش می‌یابد. از سوی دیگر مطالعات نشان داده است با افزایش زمان انکوباسیون، میزان برداشت Iudr اسفروبیدهای با اندازه‌های مختلف افزایش می‌یابد.

بررسی نسبی میزان مهاجرت DNA، راه ساده‌ای برای اندازه‌گیری میزان شکست‌های DNA در یک سلول می‌باشد. اگر چه روش‌های متفاوتی برای بررسی میزان شکست‌های تک‌رشته‌ای DNA ارائه شده است، ولی چند عامل روش کامت را نسبت به روش‌های دیگر جالب می‌کند.

از جمله مزایای این روش این است که امکان بررسی صدمات در سلول‌ها به صورت تکی وجود دارد و نیاز به باند شدن سلول با عوامل رادیوایزوتوپ نیست. لذا، در هر هسته‌ای اندازه‌گیری امکان‌پذیر است، قادر به آشکار کردن حداقل آسیب DNA می‌باشد، کم‌هزینه است و کاربرد آن

میکرولیتر محیط کشت حاوی 10^4 سلول مخلوط کرده و بر روی ژل آماده شده قبلی ریخته و در سطح لام پخش کرده. اسلایدهای آماده شده به یخچال منتقل شدند و بر روی آن‌ها بافر لیزکننده (۲/۵M NaCl، ۱۰۰mM EDTA، ۱۰۰mM Tris، ۱٪ Triton X-100، HCl) (pH=۷/۵) اضافه گردید و به مدت یک ساعت در یخچال نگهداری شدند.

پس از یک ساعت به اسلاید فوق، محلول دینیچره کننده (۳۰۰mM NaOH، ۱mM EDTA، pH=۱۳) اضافه شد و به مدت نیم ساعت در یخچال نگهداری شدند.

اسلایدها، نهایتاً به آرامی از محلول دینیچره کننده خارج شده و به داخل تانک الکتروفورز حاوی بافر دینیچر کننده قرار منتقل شدند و به مدت ۳۰ دقیقه تحت ولتاژ ۲۳ ولت قرار داده شدند. سپس، جهت خنثی‌سازی محیط بازی، به اسلایدها بافر خنثی‌کننده (۰/۴M Tris-HCl، pH=۷/۵) اضافه شد و به مدت پنج دقیقه در این محیط نگهداری شدند. در نهایت، اسلایدها در سینی مخصوص حاوی $10 \mu\text{g/mL}$ اتیدیم برماید قرار داده شده و به مدت ۱۰ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. برای مشاهده آسیب‌ها از میکروسکوپ فلورسانس دوربین‌دار با فیلتر WG استفاده شد. سپس از نرم‌افزار comet score جهت آنالیز استفاده شد که میزان آسیب DNA سلول را با اندازه‌گیری طول مهاجرت DNA و درصد آنها تعیین می‌کند. سرانجام، نرم‌افزار فوق‌الذکر (tail moment) حاصل ضرب طول دنباله در شدت انتهایی را محاسبه می‌کند. هر چه میزان و شدت این دنباله یا tail بیشتر باشد، نمایانگر آسیب بیشتر DNA سلول می‌باشد.

در این پژوهش به ازاء هر نمونه به طور متوسط ۴۰۰ سلول مورد بررسی قرار گرفت. در کلیه مراحل آزمایش، پس از تبدیل اسفروبیدها به سلول‌های تکی و پیش از انجام آزمون کامت Viability سلول‌ها اندازه‌گیری شد که در تمام مراحل این مقدار بیش از ۹۰٪ بود.

تجزیه و تحلیل آماری: از آزمون t-test، مقادیر P-value نمونه‌ها محاسبه و مقایسه شدند. نمودارها و محاسبات آماری در این پژوهش به کمک نرم‌افزار کامپیوتری ۲۰۰۳ Excel انجام شده است.

$$(۱) V=a \times b^2 \times \pi / 6$$

محاسبه شد: حجم اسفروبیید که در آن a قطر کوچک و b قطر بزرگ اسفروبیید می‌باشد. سپس منحنی حجم بر حسب زمان در مقیاس نیمه لگاریتمی ترسیم گردید.

در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، اسفروبیدها از رابطه زیر پیروی می‌کنند: حجم اسفروبیید $V=V_0 \times c^{kt}$ (۲) که در آن V_0 حجم اولیه اسفروبیدها، V حجم اسفروبیید پس از مدت زمان t و k نمایانگر شیب بخش خطی نمودار است. از روی شیب بخش خطی منحنی، زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیید با استفاده از معادله $VDT=\text{Ln}2/k$ به دست می‌آید.

تیمار دارویی با Iudr: به منظور بررسی اثر حساس کنندگی Iudr در سلول‌های گلیوما در حضور پرتو، به پتری حاوی اسفروبیدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر به ازای هر ده سی‌سی محیط کشت، $100 \mu\text{l}$ دارو با غلظت $100 \mu\text{M}$ اضافه شد (تا غلظت موجود در هر پتری به یک میکرومولار برسد) و به مدت یک، دو و سه بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیید، تیمار شدند.

پرتودهی: در این مطالعه، از دوز ۲ گری پرتو گاما کبالت 60Co (Teriton 760) با $\text{Dose rate}=1/5 \text{ cGy/min}$ جهت پرتودهی استفاده شد. به هیمن منظور پس از گذشت یک، دو و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیید از انکوباسیون اسفروبیدها با داروی Iudr، اسفروبیدها تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند.

بررسی آسیب‌های DNA به روش سنجش کامت در محیط بازی: به منظور بررسی آسیب‌های وارد به DNA سلول‌ها، ابتدا اسفروبیدها را به وسیله محلول تریپسین/EDTA به صورت سلول‌های تکی در آورده و سپس از این سلول‌های تکی جهت بررسی آسیب‌ها استفاده شد.

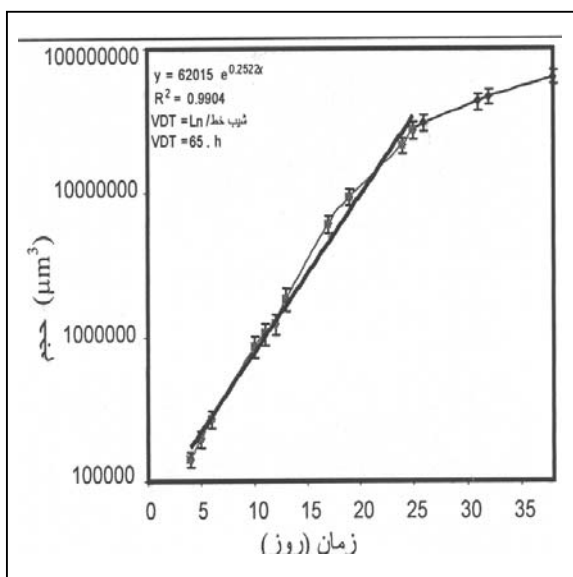
بعد از کد گذاری لام میکروسکوپی، آگارز معمولی (Normal Melting Agarose=NMA) را به شکل ۱٪ تهیه کرده و به طور یکنواخت بر روی لام قرار داده، سپس آگارز با دمای ذوب پایین (Low Melting Agarose=Low) به صورت ۰/۵٪ تهیه شده؛ ۷۵ میکرولیتر از آن را با ۱۰

یافته‌ها

کشت سلول‌های U87MG به صورت تک لایه و رسم منحنی رشد سلولی (Growth Curve): جهت بررسی اثر حساس‌کنندگی Iudr در پرتودرمانی گلیوما، منحنی رشد سلول‌های U87MG در مقیاس نیمه لگاریتمی به صورت تعداد سلول برحسب زمان در طی ۱۰ روز ترسیم شد. در منطقه خطی منحنی یا فاز لگاریتمی، شیب منحنی محاسبه شد. سپس از روی شیب، زمان دو برابر شدن سلول محاسبه شد که معادل 28 ± 0.76 ساعت می‌باشد.

کشت اسفروئید و محاسب زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید: برای بدست آوردن مدت زمان تیمار دارویی Iudr، زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید مطابق روش توضیح داده شده در بخش فوق محاسبه شد. شکل شماره ۱ تصویر اسفروئیدی سلول‌های U87MG به قطر ۳۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد.

به منظور رسم منحنی رشد اسفروئید، میانگین حجم به دست آمده به صورت نیمه لگاریتمی برحسب زمان ترسیم شد. شکل ۲ نمودار رشد اسفروئید را در طی ۳۸ روز نشان می‌دهد. از روی شیب خط قالب شده به فاز لگاریتمی زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید محاسبه شد که معادل 65 ± 0.96 ساعت به دست آمد.



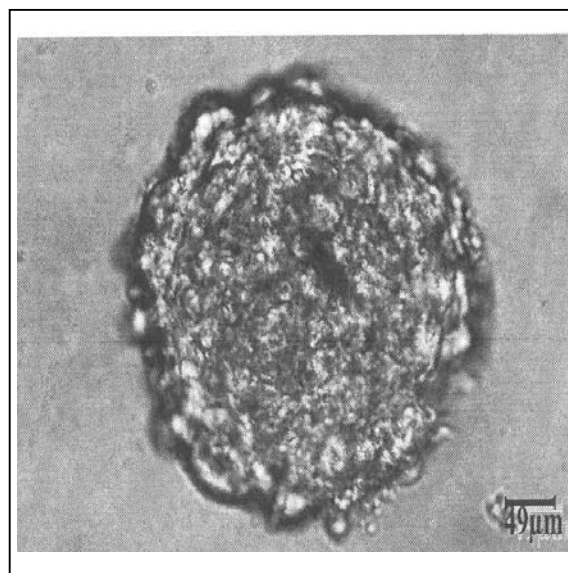
شکل شماره ۲- نمودار رشد حجمی اسفروئیدهای سلول‌های U87MG در محیط کشت MEM حاوی ۱۰ درصد FCS، زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید با استفاده از شیب خط قالب شده به فاز لگاریتمی منحنی (روزهای ۴ تا ۲۵) محاسبه شد. این منحنی میانگین سه بار تکرار آزمایش همچنین مقادیر انحراف معیار (SEM) حاصل سه بار تکرار می‌باشد.

بررسی میزان آسیب وارد شده به DNA اسفروئیدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر به واسطه تیمار دارویی طی یک، دو و سه بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید:

به منظور بررسی آسیب‌های وارد شده به DNA طی یک، دو و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئیدها، اسفروئیدهای با قطر متوسط ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را ۶۵، ۱۳۰ و ۱۹۵ ساعت تحت تیمار با Iudr قرار داده و پس از پرتودهی با ۲Gy پرتو گاما ^{60}Co ، میزان آسیب‌های DNA سلول‌ها توسط روش کامت قلیایی بررسی شد.

اشکال ۳ و ۴ به ترتیب تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلئورسانس حاصل از تست کامت را در اسفروئیدهای قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد که طی سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید تحت تیمار داروی Iudr قرار گرفته‌اند.

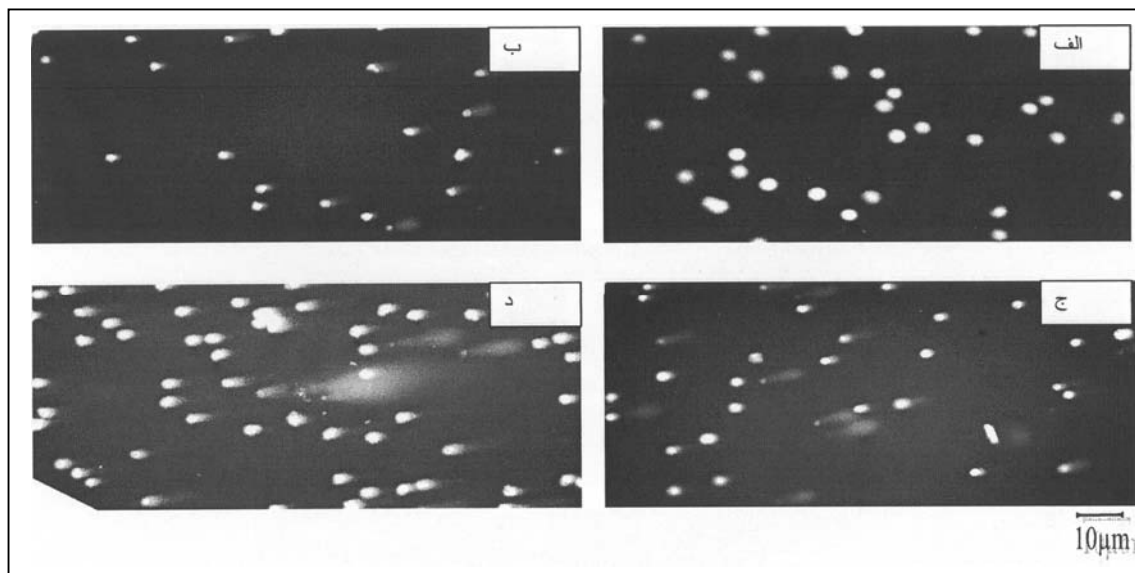
همانطوری که در اشکال شماره ۳ و ۴ مشاهده می‌شود در شکل (الف) که نمونه کنترل می‌باشد آسیبی مشاهده



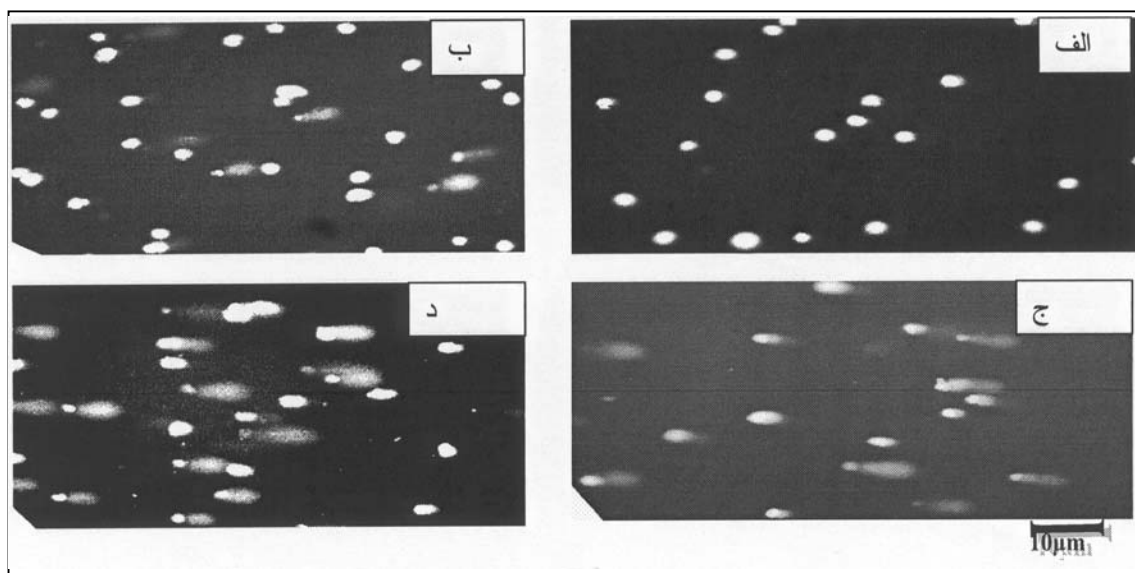
شکل شماره ۱- نمایی از اسفروئید سلول‌های U87MG به قطر ۳۰۰ میکرون با بزرگ‌نمایی ۴۰X

در مقایسه شکل شماره ۳ با شکل شماره ۴ مشاهده می‌شود که با افزایش قطر اسفروئید در نمونه کنترل (شکل الف)، تغییری در میزان آسیب مشاهده نمی‌شود. در حالی که در نمونه‌های انکوبه شده با دارو، پرتو دیده و پرتو دیده به همراه دارو (شکل ب، ج، د) با افزایش قطر اسفروئید از میزان آسیب وارد به DNA کاسته شده است.

نمی‌شود. در صورتی که در شکل (ب) که نمونه تیمار با Iudr می‌باشد، آسیب مشاهده می‌شود. شکل (ج) که نمونه پرتو داده با گاما می‌باشد، آسیب بیشتری را نشان می‌دهد. در شکل (د) که نمونه پرتو داده به همراه Iudr می‌باشد، آسیب بیشتری نسبت به گروه‌های قبلی مشاهده می‌شود.



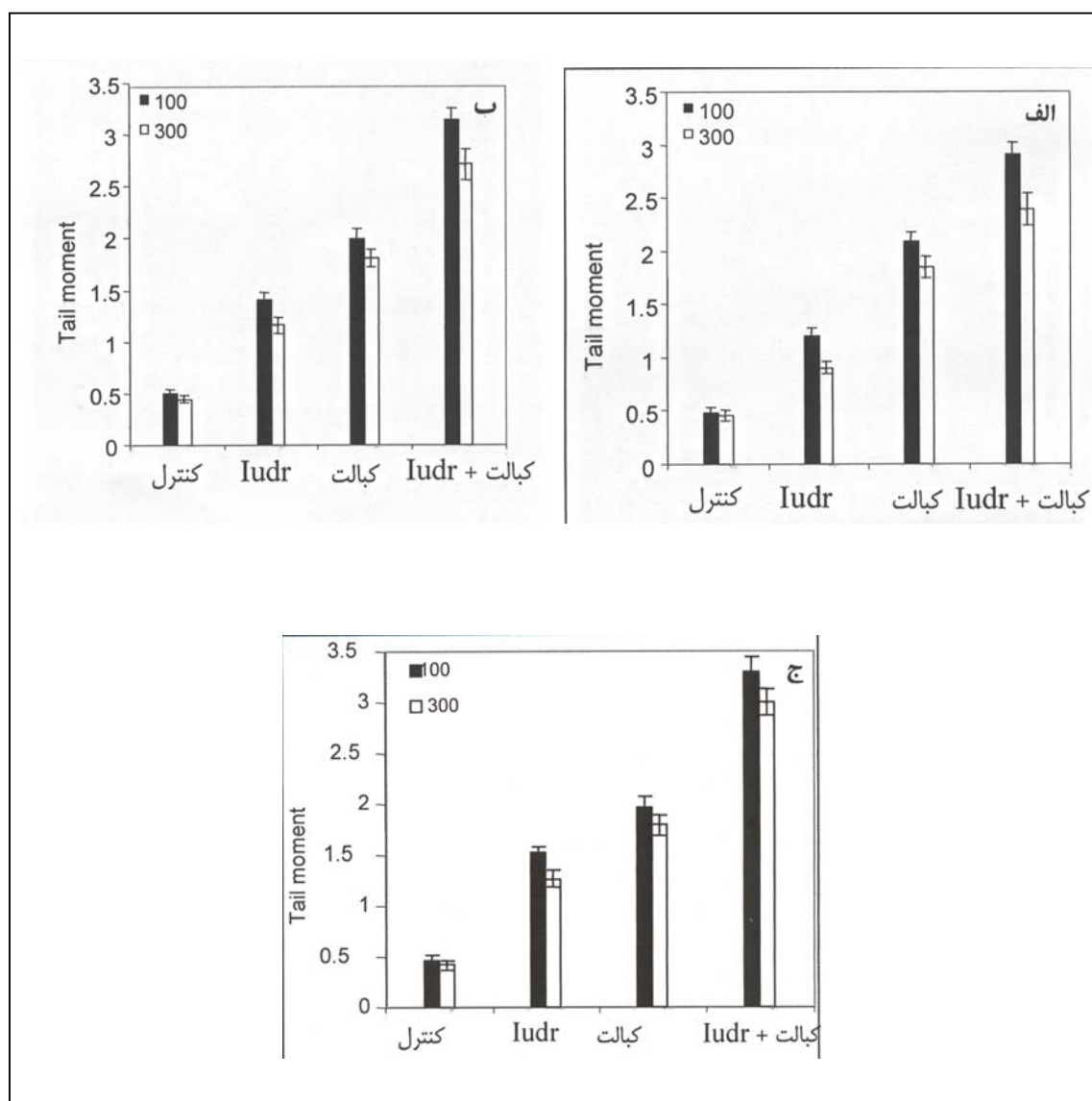
شکل شماره ۳- نمونه تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسانت حاصل از تست کامت از سلول‌های U87MG در مدل کشت اسفروئید با قطر ۱۰۰ میکرومتر که طی یک بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید تحت تیمار با Iudr قرار گرفتند. شکل (الف) نمونه کنترل، شکل (ب) نمونه تیمار با Iudr، شکل (ج) نمونه پرتو دیده و شکل (د) نمونه پرتو دیده به همراه Iudr.



شکل شماره ۴- نمونه تصویر گرفته شده توسط میکروسکوپ فلورسانت حاصل از تست کامت از سلول‌های U87MG در مدل کشت اسفروئید با قطر ۳۰۰ میکرومتر که طی سه بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید تحت تیمار با Iudr قرار گرفتند. شکل (الف) نمونه کنترل، شکل (ب) نمونه تیمار با Iudr، شکل (ج) نمونه پرتو دیده و شکل (د) نمونه پرتو دیده به همراه Iudr.

زمان انکوباسیون دارویی با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از اسفروبیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر است. در گروه پرتو دیده به همراه Iudr در طی یک زمان انکوباسیون اسفروبیدها، میزان آسیب در DNA سلول‌های با قطر ۱۰۰ میکرومتر با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از آسیب‌های وارده در اسفروبیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر است.

مقایسه نتایج تیمار دارویی و پرتو دهی دو گروه اسفروبیید با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر: شکل ۵ مقایسه نتایج حاصل از دو گروه اسفروبیید به قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را طی ۶۵ ساعت (الف)، ۱۳۰ ساعت (ب) و ۱۹۵ ساعت (ج) انکوباسیون با Iudr نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود، در دو گروه از نمونه‌ها یعنی نمونه‌های تیمار شده با Iudr و نمونه‌های پرتو دیده با گاما، میزان آسیب‌های وارده به DNA در اسفروبیدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر طی هر سه



شکل شماره ۵- نمودار مقایسه Tail Moment در اسفروبیدهای با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر مربوط به نمونه‌های کنترل، تیمار شده با Iudr. پرتو دیده و پرتو دیده به همراه Iudr در این نمونه‌ها اسفروبیدهای طی ۶۵ (الف) و ۱۳۰ (ب) و ۱۹۵ (ج) ساعت تحت تاثیر Iudr قرار گرفتند (آزمایشها سه بار تکرار شده‌اند، از انحراف معیار میانگین (SEM) سه بار تکرار استفاده شده است).

بهینه از پرتودرمانی، امروزه شیوه‌های ترکیبی جهت کاهش دوز پرتوی بافت‌های سالم و در عین حال افزایش آسیب‌های تومور، مد نظر اکثر محققین قرار گرفته است. یکی از این عوامل، حساس کننده‌های پرتوی Iudr می‌باشد. این دارو، اختصاصاً توسط سلول‌های در حال تقسیم که در فاز سنتز باشند برداشت می‌شود. لذا، سلول‌های سرطانی و طبیعی هر دو قادر به دریافت این دارو می‌باشند. استفاده از این عوامل دارویی مختص بافت‌های سرطانی می‌باشد که سلول‌های اطراف از قدرت تقسیم کمی برخوردار باشند.

گلیوما، از نظر تئوری بهترین گزینه برای این روش درمانی می‌باشد. یکی از شکست‌های عمده در پرتو درمانی، وجود سلول‌های هایپوکسیک و سلول‌های با زمان چرخه طولانی است، که از دسته سلول‌های مقاوم به پرتو می‌باشند. اسفروئید به عنوان مدل چند سلولی سیستم بافت سرطانی، با دسته سلول‌های غیر همگن، مدل مناسبی برای بررسی این دسته از سلول‌های می‌باشد.^(۹) با توجه به اینکه اکثر عوامل سیتوژنتیک شکست‌های تک رشته‌ای ایجاد می‌کنند لذا تکنیک سنجش کامت قلیایی، که براساس شکست‌های تک رشته‌ای DNA عمل می‌کند، یک روش استاندارد و قابل اطمینان در جهت بررسی مقاومت پرتوی سلول‌های سرطانی می‌باشد.^(۱۰ و ۱۱)

مطالعات در مدل کشت تک لایه نشان داده است که غلظت یک میکرومولار Iudr به همراه تابش پرتو گاما در مدل کشت تک لایه سلول‌های گلیوما، سبب افزایش حساسیت پرتوی سلول‌ها می‌شود. همچنین میزان صدمات سلولی در فاز نمائی بیشتر از فاز ثابت است.^(۱۲) همچنین مطالعات نشان داده است که غلظت یک میکرومولار در اسفروئیدها هم غلظت مناسبی برای ایجاد حساسیت پرتوی است.^(۷)

آزمایش‌های انجام شده بر روی اسفروئیدهایی با قطرهای مختلف نشان داده است که میزان برداشت در اسفروئیدهای با قطر بزرگتر نسبت به اسفروئیدهای با قطر کوچکتر کمتر است.^(۷)

از عوامل کاهش برداشت Iudr در اسفروئیدهای با قطر بزرگتر، وجود ناهمگونی در سلول‌های مناطق مختلف

همچنین در این گروه، میزان آسیب‌های وارد شده به DNA در طی دو و سه زمان دو برابر شدن، در اسفروئیدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر با اختلاف معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از اسفروئیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر است.

نمایش تعداد سلول‌های آسیب دیده با استفاده از روش کامت: پس از انجام روش کامت قلیایی و رنگ آمیزی سلول‌ها، از سلول‌ها عکسبرداری شده (از هر لام حداقل در سه میدان) و tail moment سلول‌ها توسط نرم‌افزار comet score اندازه‌گیری شدند.

به منظور مقایسه میزان آسیب‌های وارد شده به DNA در اثر افزایش زمان انکوباسیون، در گروه پرتو دیده با گاما به همراه Iudr درصد سلول‌هایی که میانگین tail moment آنها از میانگین tail moment گروه پرتو دیده با گاما به تنهایی بیشتر است محاسبه شد.

جدول ۱ نمایشگر نتیجه حاصل از این محاسبات است. همانطوریکه مشاهده می‌شود افزایش زمان تیمار افزایش بیشتر tail moment را در سلول‌های هر دو گروه اسفروئیدی‌های با قطر ۱۰۰ و ۳۰۰ میکرومتر را نشان می‌دهد. از سوی دیگر میزان افزایش tail moment ناشی از افزایش زمان تیمار Iudr، در اسفروئیدهای ۳۰۰ نسبت به اسفروئیدهای ۱۰۰ بیشتر است. این نشان می‌دهد که افزایش زمان تیمار با Iudr در اسفروئیدهای با قطر بیشتر موثرتر است.

جدول شماره ۱- میزان آسیب‌های ناشی از پرتو گاما در حضور Iudr

قطر اسفروئید	زمان انکوباسیون اسفروئید با Iudr و درصد افزایش آسیب		
	۶۵ ساعت	۱۳۰ ساعت	۱۹۵ ساعت
۱۰۰ میکرومتر	٪۶۰	٪۶۶	٪۷۰
۳۰۰ میکرومتر	٪۵۱	٪۶۱	٪۶۸

بحث

پرتو درمانی با تشعشع خارجی، در درمان اکثر سرطان‌ها از اهمیت و جایگاه خاصی برخوردار است. در جهت استفاده

صدمات پرتوی در حضور Iudr در اسفروبیدهای به قطر ۱۰۰ میکرومتر از ۶۰ درصد در طی ۶۵ ساعت به ۷۱ درصد در طی ۱۹۵ ساعت افزایش یافته است.

در اسفروبیدها با قطر ۳۰۰ میکرومتر، به دلیل وجود سلول‌های با چرخه طولانی‌تر نسبت به اسفروبیدهای با قطر ۱۰۰ میکرومتر، با افزایش زمان انکوباسیون این سلول‌ها نیز قادر به برداشت Iudr خواهند شد. به همین دلیل با افزایش زمان انکوباسیون، میزان افزایش آسیب در اسفروبیدهای به قطر ۳۰۰ میکرومتر بیشتر از اسفروبیدهای به قطر ۱۰۰ میکرومتر است. زیرا، اکثر سلول‌ها در اسفروبیدها به قطر ۱۰۰ میکرومتر در طی یک زمان دو برابر شدن، قادر به برداشت Iudr بوده و در نتیجه بیشترین آسیب طی اولین زمان انکوباسیون ایجاد می‌شود.

با توجه به اینکه هدف از به کار بردن حساس کننده‌های پرتوی، افزایش صدمات پرتوی سلول‌های سرطانی و کاهش صدمات به سلول‌های سالم اطراف تومور می‌باشد. همچنین از آنجایی که Iudr به تنهایی سبب ایجاد آسیب به سلول‌ها می‌شود، لذا باید زمان انکوباسیون را تا اندازه‌ای افزایش داد که با حداقل دوز پرتوی ضمن افزایش آسیب به سلول‌های سرطانی، به سلول‌های سالم آسیب نرسد.

نتایج حاصله نشان داده است که افزایش زمان انکوباسیون در هر دو قطر اسفروبیدها مورد مطالعه از یک زمان دو برابر شدن به دو زمان دو برابر شدن، میزان صدمات سلولی را با افزایش معنی‌داری افزایش می‌دهد. در حالی که افزایش زمان انکوباسیون از دو به سه زمان دو برابر شدن، افزایش معنی‌داری را نشان نداده است.

با توجه به اینکه در کلینیک با مجموعه‌ای از سلول‌های سرطانی و طبیعی سروکار داشته و با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان به این نتیجه رسید که بهترین زمانی که می‌توان با تیمار Iudr و حداقل دوز تابشی، حداکثر حساسیت سلولی را ایجاد کرد، زمان ۱۳۰ ساعت (یعنی به اندازه دو بار زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیدها) می‌باشد.

اسفروبیدها است. ناهمگونی در چرخه سلولی به دلیل افزایش قطر اسفروبیدها و کاهش میزان دسترسی سلول‌ها به مواد غذایی و اکسیژن ایجاد می‌شود، که سبب ایجاد دسته سلول‌های با زمان‌های چرخه سلولی طولانی و سلول‌های هایپوکسیک می‌شود.

افزایش زمان چرخه سلولی سبب می‌شود که این دسته از سلول‌ها نتوانند در یک زمان دو برابر شدن حجم اسفروبیدها، Iudr را برداشت نمایند. در صورتی که در اسفروبیدهای با قطر کمتر ناهمگونی سلولی مشاهده نمی‌شود، لذا در زمان‌های اولیه انکوباسیون بیشترین برداشت را دارند.

مطالعات اتورادیوگرافی نشان داده است که در اسفروبیدهای با قطر ۳۰۰ میکرون، ۵۲ درصد از سلول‌ها طی یک زمان دو برابر شدن Iudr را برداشت کرده‌اند.^(۷) در این آزمایش نشان داده شد که پرتو دهی در حضور Iudr طی یک زمان دو برابر شدن، میزان آسیب به DNA را ۵۱ درصد نسبت به زمانی که فقط از پرتو به تنهایی استفاده شده افزایش می‌دهد. همچنین مطالعات قبلی نشان داده است، که به واسطه افزایش زمان انکوباسیون Iudr از یک زمان دو برابر شدن به چهار زمان دو برابر شدن، میزان برداشت Iudr در اسفروبیدهای با قطر بزرگ به میزان ۲۱ درصد افزایش می‌یابد.^(۷) نتایج حاصل از این آزمایش نشان داده است که با افزایش زمان انکوباسیون از یک زمان دو برابر شدن به سه زمان دو برابر شدن در اسفروبیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر، میزان آسیب سلولی از ۵۱ درصد به ۶۸ درصد افزایش یافته است. با مقایسه این دو نتیجه می‌توان گفت که Iudr به همان اندازه‌ای که توسط سلول برداشت شود، باعث افزایش حساسیت پرتوی و آسیب رسانی به DNA سلول می‌شود. از سوی دیگر، نتایج بدست آمده (جدول شماره ۱) نشان داده است که میزان صدمات پرتوی DNA سلول در اسفروبیدهای با قطر ۳۰۰ میکرومتر در حضور Iudr در مقایسه با تابش پرتو گاما، به تنهایی از ۵۱ درصد در طی ۶۵ ساعت انکوباسیون به ۶۸ درصد در طی ۱۹۵ ساعت انکوباسیون افزایش یافته است. در صورتی که میزان

11- Oloumi A, Lam W, Banath JP, Olive PL. Identification of genes differentially expressed in V79 cells grown as multicell spheroids. *Int J Radiat Biol* 2002; 78(6): 483-92.

12- Neshasteh-Riz A, Mairs RJ, Angerson WJ, Stanton PD, Reeves JR, Rampling R, et al. Differential cytotoxicity of ¹²³Iudr, ¹²⁵Iudr, ¹³¹Iudr to human glioma cells in monolayer or spheroid culture: effect of proliferative heterogeneity and radiation cross-fire. *Br J Cancer* 1998, 77(3): 385-93.

نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده نشان داده است که انکوباسیون سلول‌ها طی دو زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، نسبت به یک و سه زمان دو برابر شدن حجم اسفروئید، زمان مناسب‌تری جهت ایجاد حساسیت پرتوی است.

فهرست منابع

1- Schultz CA Metha, MCGinn MP, Robins CJ, Badie HA, Volkman B. Continuous 28-day iododeoxyuridine infusion and hyper fractionated accelerated radiotherapy for malignant glioma: a phase 1 clinical study. *Int J Radiat oncol. Biol. Phys* 2004 Jul; 15; 59(4): 1107-15.

2- Taverna P, Hwang HS, Schupp JE, Radivoyevitch T, Session NN, Reddy G, et al. Inhibition of base excision repair potentiates iododeoxyuridine-induced cytotoxicity and radiosensitization. *Cancer Res* 2003; 63: 838-46.

3- Kalia VK. Optimizing radiation therapy of brain tumours by combination of 5-bromo-2-deoxy-uridine & 2-deoxy-D-glucose. *Indian J Med Res* 1999; 109: 182-7.

4- Yan T, Seo Y, Schupp JE, Zeng X, Desai AB, Kinsella TJ. Methoxyamine potentiates iododeoxyuridine-induced radiosensitization by altering cell cycle kinetics and enhancing senescence. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 893-902.

5- Fornace AJ Jr, Dobson PP, Kinsella TJ. Enhancement of radiation damage in cellular DNA following unifilar substitution with iododeoxyuridine. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 18(4): 873-8.

6- Gene M, Castro Kreder N, Barten-van Rijbroek A, Stalpers LJ, Haveman J. Enhancement of effects of irradiation by gemcitabine in a glioblastome cell line and cell line spheroids. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004; 130: 45-51.

7- Neshasteh riz A, Angerson WJ, Reeves JR, Smith G, Rampling R, Mairs RJ. Incorporation of iododeoxyuridine in multicellular glioma spheroids: electron emitters. *Br J Cancer* 1997; 75(4): 493-9.

8- Olive PL, Banath JP. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006; 1: 23-9.

9- 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.

10- Olive PL, Durand RE. Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry A* 2005 Jul; 66(1): 1-8.

Evaluation of the Extent of Cytogenetic Damage Induced by Ionizing Radiation at Different Intervals of Cell Incubation with Iudr in Spheroid Model of Glioblastoma Cell Line Using Comet Assay

^I
*A. Neshasteh-Riz, PhD

^{II}
N. Bishesari, MSc

^{III}
S. Khoei, PhD

Abstract

Background & Aim: 5-iodo-2-deoxyuridine(Iudr) is a thymidine analog that is known as a radiosensitizer for human cancer cells in in vitro and in vivo studies. The investigations on the spheroid have shown that Iudr uptake of cells increases with the increasing Iudr incubation time. The aim of this study was to evaluate the extent of cytogenetic damage induced by ionizing radiation at different intervals of cell incubation with Iudr using comet assay.

Material and Method: In this basic experimental study, U87MG, a Glioblastoma cell line was cultured as spheroid in two different sizes, 100 and 300 μ m. The spheroids were incubated with Iudr in three different volume doubling times. Then they were irradiated by 2Gy of gamma radiation of cobalt 60. The extent of DNA damage was measured using alkaline comet assay and the data were analyzed by Students' t-test.

Results: The results showed the extent of DNA damage induced by gamma radiation in combination with Iudr was greater in spheroids with 300 μ m of diameter than spheroids with 100 μ m of diameter. Investigations revealed that the DNA damage after two volume doubling times of incubation with Iudr is significantly more than one volume doubling time of incubation in two different sizes of spheroids, but the extent of damage in spheroids with 300 μ m of diameter was larger. However, there is no significant difference between the DNA damage after incubation for two and three volume doubling times.

Conclusion: As it can be seen, two-volume-doubling-time incubation of cells is more suitable than one or three volume doubling times to develop radiation sensitivities.

Key Words: 1) Glioblastoma 2) Spheroid 3) Iudr 4) Comet

^I) Associate Professor of Medical Physics. Radiology Department. Faculty of Paramedical Sciences. Shahid Hemmat Expressway. Shahid Chamran Crossroad. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran. (*Corresponding Author)

^{II}) MS in Medical Physics.

^{III}) Assistant Professor of Biophysics. Department of Medical Physics. Iran University of Medical Sciences and Health Services. Tehran, Iran.