تأثیر دُزهای مختلف پرتوگاما و زمان انکوباسیون بعد از تابش بر القای آپوپتوز در سلولهای کارسینوم پستان انسان

نوروز دلیرژ M.Sc.☆★، سید محمد مؤذنی Ph.D.☆، فاضل شکری Ph.D.★
محمد علی شکرگزار Ph.D.★، مرتضی عطری M.D.★

☆ دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

★ دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه ایمنی شناسی

★انستیتو پاستور ایران، بانک سلولی ایران

★ دانشگاه علوم پزشکی تهران، بیمارستان امام خمینی، انستیتو کانسر

♦آدرس مکاتبه: تهران، صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی

چکیده

* **هدف:** مطالعه تأثیر دُزهای مختلف تابش گاما و زمان انکوباسیون بعد از تابش بر القاء آپوپتوز در ردهٔ سلولی کارسینوم پستان (Invasive ductal carcinoma)(T-47D)

* **مواد و روشها:** ردهٔ سلولی T-47D در فلاسک T25کشت داده شده بعد از رسیدن به مرحلهٔ رشد لگاریتمی و شمارش سلولهای موجود در هر فلاسک تحت تابش پرتوگاما با دُزهای ۴، ۸، ۱۲ و ۱۶گری قرارگرفت. از داروی اتوپوزاید بعنوان شاهد مثبت القاء آپوپتوز و سلولهایی که تحت هیچگونه تیماری قرار نگرفته بودند بعنوان شاهد منفی استفاده شد. ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از پرتودهی، سلولها برداشت و بعد از شمارش تعداد آنها، با رنگ H042/PI برای بررسی میکروسکپی و یا رنگ AO/PI برای انجام فلوسیتومتری رنگ‌آمیزی شدند. درصد سلولهای زنده، آپوپتوتیک و مرده با استفاده از دو روش مذکور تعیین و با توجه به تعدادکل سلولهای موجود در هر فلاسک تعداد این نوع سلولها نیز مشخص شد. این آزمایش چندین بار تکرار شده، نتایج آن بصورت میانگین ± انحراف معیار گزارش گردید.

* **یافته‌ها:** تابش گاما بصورت وابسته به دُز و زمان باعث کاهش رشد سلولهای T-47D می‌گردد. که این کاهش با کندی تکثیر آنها تا ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی مشخص گشته و بعد از این زمان علائم مرگ مشاهده می‌شد. درصد القاء آپوپتوز تا دُز ۸Gy افزایش یافته، پس از آن با افزایش دُز کاهش نشان می‌دهد. این روند تا ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی ادامه یافته سپس رو به کاهش می‌گذارد. بنابراین بالاترین میزان آپوپتوز با دُز ۸Gy و بعد از ۴۸ ساعت حاصل می‌شود. درصد سلولهای زنده و مرده نیز بصورت وابسته به دُز و زمان به ترتیب کاهش و افزایش می‌یابد.

* **نتیجه‌گیری:** تابش اشعه گاما باعث القاء آپوپتوز در سلولهای T-47D می‌گردد و میزان آن با دُز پرتو رابطه دارد. این رابطه خطی نبوده در دُزهای بالاتر معکوس می‌گردد. بر عکس، رابطهٔ درصد سلول زنده و مرده (مراحل انتهائی آپوپتوز و نکروز شده) با دُز پرتو خطی بوده با افزایش دُز بترتیب کاهش و افزایش پیدا می‌کند.

گل واژگان: کارسینوم پستان، آپوپتوز، تابش گاما

مقدمه

مرگ سلول به دو شکل متمایز ریخت شناختی و بیوشیمیایی یعنی نکروز و آپوپتوز صورت می‌گیرد (۱، ۲). نکروز را که زمانی تصور می‌شد شکل عمومی مرگ سلولی است، امروزه نتیجه آشفتگی در محیط ظریف اطراف سلول می‌دانند، در صورتی که آپوپتوز معمولاً تحت شرایط فیزیولوژیک اتفاق می‌افتد که در آن مرگ سلول با برنامه ریزی شده بوده و یا در پاسخ به تحریکات ملایم آسیب شناختی و پایین‌تر از حد مرگ آور به وقوع می‌پیوندد.

آپوپتوز در اغلب موارد بعنوان ساز و کار خودکشی سلول در نظر گرفته می‌شود زیرا بسیاری از سیستمهای سلول در حال مرگ از طریق سنتز RNA، پروتئین و پروتئین کینازها در این امر مشارکت می‌کنند (۳). علاقه به مطالعه این نوع از مرگ سلول از آنجا ناشی می‌شود که نقش مهمی در ایجاد بافتها و اندامهای جنینی (۴)، تنظیم سیستم ایمنی (۵) و یا مرگ طبیعی سلولهای تمایز یافته دارد (۶). در سرطان‌شناسی علاقه به آپوپتوز از آنجا ناشی می‌شود که در اغلب موارد پرتوهای یون ساز و داروهای ضد سرطان در واکنش با اهداف داخل سلولی خود این نوع از مرگ سلولی را باعث می‌شوند و کارائی بسیاری از این داروها با توانایی آنها در القاء آپوپتوز ارتباط دارد (۷)، از طرفی از آنجایی که به هم خوردن فرآیند آپوپتوز می‌تواند باعث بروز بدخیمی در برخی تومورها گردد، این پدیده کانون توجه سرطان شناسان قرار گرفته است (۸، ۹).

مطالعات سیستمیک آپوپتوز بعد از پرتو دهی در سلولهای بدخیم عمدتاً به تومورهای موش (۱۰) و سلولهای لوسمی انسانی (۱۱) محدود شده است. از میان ۶ رده سارکومای انسانی که تاکنون مورد آزمایش قرار گرفته‌اند، آپوپتوز ناشی از پرتوهای یون ساز در دو رده از آنها اتفاق افتاده است. در یک مطالعه دیگر نیز پرتودهی ۱۴ رده از سلولهای گلیومای انسانی تغییرات آپوپتوتیک قابل ملاحظه‌ای در پی نداشته است(۱۲)، از طرفی آسیب ناشی از پرتوها بعنوان عامل قدرتمندی برای القای آپوپتوز در تعدادی از انواع سلولها بویژه تیموسیتها شناخته شده است (۱۳). سلولهای کارسینوم به تأثیرات پرتوهای یون ساز مقاوم ترند و مطالعه‌ای که اخیراً با استفاده از دُز بالای پرتوگاما (۱۲Gy <) انجام گرفته نشان می‌دهد این مقدار پرتو مرگ قابل ملاحظه‌ای را در برخی (ولی نه همه) رده‌های سلولی کارسینوم ایجاد می‌نماید (۱۴).

بر اساس وقایعی که طی فرآیند آپوپتوز اتفاق می‌افتد روشهای متعددی جهت شناسایی آپوپتوز مبتنی بر بررسی ریخت شناختی سلول (۱۵)، فعالیت اندامکهای سلولی (۱۶) و نفوذپذیری غشاء (۱۵، ۱۷) بکار رفته است (۱۸). از بررسی توسط میکروسکوپ الکترونی، میکروسکوپ نوری، آنالیز قطعات DNA یا استفاده از الکتروفورز در ژل و سنجش کمی DNA (۱۷)، روشهای نشاندار کردن DNA در محل (۱۹)، آنالیز کروماتین هسته بوسیلهٔ رنگهای فلورسانسی که DNA را رنگ می‌کنند و فلوسیتومتری (۱۸) بعنوان برخی از این روشها نام برد. در این میان مطالعه با میکروسکوپ الکترونی بعنوان روش استاندارد طلائی مطرح می‌باشد. یکی از روشهای متداول تشخیص آپوپتوز رنگ‌آمیزی سلولها بویژه هستهٔ آنها با رنگهای فلورسانس و مشاهده میکروسکوپی آنهاست، از جمله دی‌استات فلورسئین، آکریدین نارنجی، اریتروزین B، اتیدیوم بروماید، هوخست ۳۳۳۴۲ و پروپیدیوم یداید از جملهٔ مهمترین این رنگها هستند (۱۸، ۲۰، ۲۱).

روش دیگری که اخیراً بطور گسترده‌ای برای تشخیص آپوپتوز و نیز تمایز سلولهای زنده، آپوپتوتیک و مرده مورد استفاده قرار گرفته، روش فلوسیتومتری می‌باشد. در این روش با استفاده از رنگ‌آمیزی DNAی سلول و یا آنتی‌ژنهای سطحی آن بوسیله مواد فلورسانس میزان القاء آپوپتوز و مراحل مختلف این فرآیند مورد بررسی قرار می‌گیرد (۱۵، ۲۲).

روشن شدن سازوکارهای دقیق القاء و مهار آپوپتوز و شناسائی مکانیزمهای مداخله‌گر می‌تواند در طراحی و به کارگیری روشهای جلوگیری از ناهنجاریهای مادرزادی، نقصهای ایمنی و درمان سرطان راه‌گشا باشد. همانگونه که پیشتر گفته شد، مطالعات مختلف نشان داده است که پرتوهای یونساز نه تنها باعث القاء آپوپتوز می‌شوند بلکه نحوه اثرگذاری پرتو در ارتباط با القاء آپوپتوز، به نوع پرتو (گاما، UV، X و غیره) دُز آن، نوع سلول، مدت زمان پرتودهی و زمان انکوباسیون بعد از آن بستگی دارد (۲۶-۲۳). لذا به نظر می‌رسد بایستی تأثیر پرتوهای یون ساز بر القاء آپوپتوز در مورد سلولهای مختلف به صورت مجزا آزمایش شود. در این مطالعه تأثیر تابش اشعه گاما در القاء آپوپتوز در رده سلولی کارسینوم پستان (T-47D) بررسی شده است. بدین ترتیب که با تابش دُزهای مختلف و دوره انکوباسیون متفاوت بعد از پرتودهی میزان تأثیر تابش گاما در القاء آپوپتوز و نیز اثرات دُز و زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی مشخص گشت. به منظور تعیین درصد و تعداد سلولهای زنده، آپوپتوتیک و مرده نیز از دو روش رنگ‌آمیزی با PI/HO42 و مشاهده میکروسکپی و نیز رنگ‌آمیزی با PI/AO و استفاده از دستگاه فلوسیتومتری بهره گرفته شده است.

مواد و روشها

* الف) کشت سلول

رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه (T-47D) از کارسینوم مجرای پستان انسان (Invasive ductal carcinoma) حاصل شد. این رده از بانک سلولی انیستیتو پاستور ایران (NCBI) تهیه گردید. سلول در فلاسک T25 (شرکت NUNC - دانمارک)، و در محیط کشت DMEM (شرکت Gibco - آلمان)، که حاوی ۱۰درصد FCS (شرکت Seromed - اسکاتلند)، ۱۰۰U/ml پنی سیلین و ۱۰۰µg/ml استرپتومایسین (شرکت Sigma - آمریکا)، در انکوباتور ۳۷°c، حاوی ۵درصدCO2 و ۹۰درصد رطوبت کشت شد. در شروع کشت در هر فلاسک 5×10^5 سلول ریخته شده و زمانیکه رشد سلولها به مرحلهٔ لگاریتمی رسید جهت پرتودهی و انجام آزمایشات بعدی مورد استفاده قرار گرفت. سلولهای موجود در هر فلاسک و میزان زنده بودن آنها (Viability)، در زمان پرتودهی و هنگام مطالعه میکروسکوپی و انجام فلوسیتومتری شمارش و تعیین گردید.

* ب) پرتودهی گاما

پرتودهی زمانی انجام گرفت که رشد سلولها در مرحلهٔ لگاریتمی

قرار داشت. برای پرتودهی از منبع ^{60}Co(AECL) - کانادا) و گاماسل ۲۲۰ (شرکت Nordin - کانادا)، موجود در مرکز تابش گامای سازمان انرژی اتمی ایران استفاده شد. نرخ دُز[1] مورد استفاده ۰/۲۱۳۷ Gy/S[2] و میزان دُز انتقال[3] ۰/۸۴۸Gy بود. پرتودهی به صورت یکنواخت و در دمای اتاق انجام گرفت. سلولها در ۴ گروه و به ترتیب ۴Gy، ۸Gy، ۱۲Gy، ۱۶Gy پرتو دریافت کردند، زمان پرتودهی به ترتیب ۱۵، ۳۳، ۵۲ و ۷۰ ثانیه بود و هر گروه نیز در سه نوبت به ترتیب ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از پرتودهی مورد بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری قرار گرفتند. به این ترتیب در مجموع ۱۲ گروه آزمایشی وجود داشت. برای هر گروه نیز سلولهایی که پرتودهی نشده بودند و سلولهایی که ۴۰μg/ml داروی اتوپو زاید (Vp16) (شرکت Sigma - آمریکا) دریافت کرده بودند، به ترتیب به عنوان شاهد منفی و شاهد مثبت مورد استفاده قرار گرفت. این آزمایشات حداقل در ۵ نوبت تکرار شده نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه گردید.

* ج) مطالعه میکروسکوپی

فلاسکهای حاوی سلولهای شاهد منفی و مثبت و فلاسکهایی که در دُزهای مختلف پرتودهی شده بودند بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در انکوباتور ۳۷°c، ۹۰درصد رطوبت و ۵درصد CO2 با استفاده از روش Meijer (۲۷) باکمی تغییرات به وسیله رنگهای HO42 و PI (هر دو از شرکت Sigma - آمریکا) رنگ‌آمیزی گردید. به طور خلاصه سلولهای تک لایه‌ای داخل فلاسک با استفاده از تریپسین (۰/۲۵ درصد) (شرکت Seromed - آمریکا)، به صورت سوسپانسیون در آمده بعد از دو بار شستشو با PBS سوسپانسیونی حاوی cells/ml 2×10^6 تهیه گردید (در بعضی موارد نیز رنگ‌آمیزی بدون جداکردن سلولها از ته فلاسک و در محل انجام‌گرفته بعد از اتمام رنگ‌آمیزی لام موجود در ته فلاسک جدا و مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفت) (در این موارد از فلاسکهای مخصوص شرکت NUNC - دانمارک استفاده شد) به سوسپانسیون سلولی حاصل 5μg/ml رنگ HO42 اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°c انکوبه شد. سپس دو بار با PBS شستشو شده. رنگ PI با غلظت 1μg/ml اضافه و به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°c انکوبه شد. بعد از اتمام انکوباسیون، سلولها بلافاصله با میکروسکوپ فلورسانس (زایس Axioskop45-1487 - آلمان) با لامپ جیوه و فیلترهای UV، آبی و سبز مورد مشاهده قرار گرفتند. از هر نمونه حداقل ۲۰۰ سلول شمارش شده بر اساس معیارهایی که در جدول ۱ آمده است طبقه بندی گردید

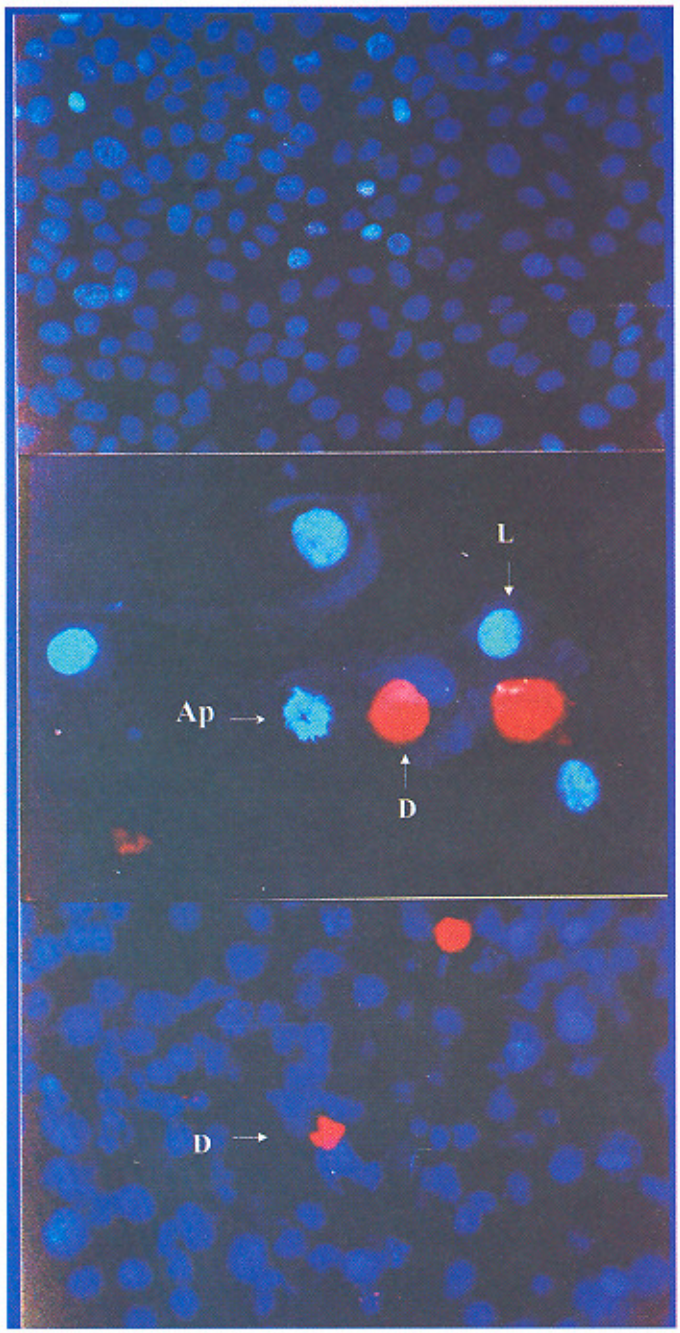
* د) آنالیز فلوسیتومتری

با استفاده از تریپسین (۰/۲۵ درصد) (شرکت Sigma - آمریکا) سلولهای چسبیده به فلاسک به صورت سوسپانسیون در آمده دو بار با بافر FACS(PBS، BSA (۰/۱ درصد) EDTA (۵ mM)، سدیم آزاید (۰/۱ درصد) شسته شدند. این سلولها با استفاده از روش Liegler (۲۸) با بعضی تغییرات رنگ‌آمیزی شده و به وسیلهٔ دستگاه فلوسیتومتر مورد بررسی قرار گرفتند. به طور خلاصه سلولها ابتدا با رنگ AO (شرکت Sigma - آمریکا) (۰/۱μM) به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷°c انکوبه و رنگ‌آمیزی گردیدند. سپس با رنگ PI (شرکت Sigma - آمریکا) (۱/۵μM) به مدت ۵ دقیقه در ۳۷°c انکوبه (۲۷) و بلافاصله با دستگاه فلوسیتومتر آنالیز شدند. دستگاه مورد استفاده، FACS Calibor (شرکت Becton-Dickinson - آمریکا) با یک لیزر آرگون بود و هر دو رنگ با طول موج (488nm) تحریک می‌شدند؛ ولی نور منتشر شده از PI و AO به ترتیب با فیلترهای ۵۲۵/۲۰ nm (FL1) و ۵۷۵/۲۶nm (FL2) جمع‌آوری گردید. روی هم افتادگی طول موج رنگها با استفاده از نمونه‌های شاهد رنگ‌آمیزی نشده و آنهایی که فقط با یک رنگ، رنگ‌آمیزی شده بودند، تعیین گردید. برای استخراج و تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار Cell Quest استفاده شده تعداد ۱۰۰۰۰ سلول شمارش و جمعیتهای حاصل به شرحی که در جدول ۲ آمده است طبقه بندی گردید. لازم به ذکر است که با تعیین آستانه مناسب برای Forward Scatter(FSC) زوائد سلولی حذف و در محاسبه منظور نگردید (۲۸).

یافته‌ها

در این مطالعه به منظور بررسی اثرات تابش اشعه گاما و انکوباسیون بعد از آن در القاء آپوپتوز، سلولهای ردهٔ T-47D که از کارسینوم سرطان پستان مشتق شده‌اند، در فلاسک‌های T25 کشت داده شده (5×10^5 سلول در هر فلاسک) و در مرحلهٔ لگاریتمی رشد که ۸۰- ۶۰درصد از سطح فلاسک با سلول پر شده بود تحت تابش پرتو گاما (°CO[6]) قرار گرفتند. دُز پرتو تابیده شده ۴Gy، ۸Gy، ۱۲Gy و ۱۶Gy بود. از سلولهائی که تحت تأثیر داروی توپوزاید قرار گرفته بودند و آنهایی که تحت هیچ نوع تیماری قرار نداشتند به ترتیب به عنوان شاهد منفی و مثبت استفاده گردید. به هنگام شروع کشت، پرتودهی و نیز موقع بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری تعداد سلولهای موجود در هر فلاسک شمارش گردید (جدول ۳). بعد از پرتودهی، سلولها به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در ۳۷°c انکوبه شده و به دو روش مطالعه میکروسکوپی و فلوسیتومتری درصد و تعداد سلولهای زنده (L)، آپوپتوتیک (Ap) و مرده (D) تعیین گردید. به منظور مطالعهٔ تغییرات ریخت شناختی مرتبط با آپوپتوز به وسیلهٔ میکروسکوپ فلورسانس از رنگ‌آمیزی با رنگهای HO42 و PI استفاده گردید. HO42 یک رنگ حیاتی و فلورسانت است که نور آبی (۴۶۱ nm) از خود ساطع می‌کند و با این رنگ هستهٔ سلولهای طبیعی آبی کمرنگ و مات، هستهٔ سلولهایی که در مراحل اولیهٔ آپوپتوز قرار دارند به رنگ آبی روشن و درخشان و به صورت تکه تکه و متراکم مشاهده می‌گردد. رنگ فلورسانت PI نیز، نور قرمز (617nm) از خود ساطع می‌کند. با این رنگ هستهٔ سلولهایی که در مراحل نهایی آپوپتوز قرار دارند به رنگ قرمز، تکه‌تکه و متراکم دیده می‌شود. در حالی که، هستهٔ سلولهای نکروتیک متورم و به رنگ قرمز مشاهده می‌گردد (شکل ۱).

1. Dose Rate
2. Gy: Gray, 1Gray= 100 RAd
3. Transit dose



شکل ۱: رده سلولی کارسینوم پستان (T-47D) که تحت تأثیر تابش پرتو گاما دچار آپوپتوز شده و بوسیله رنگهای HO42 و PI رنگ آمیزی شده، است. با این نوع رنگ‌آمیزی سه نوع سلول قابل تشخیص می‌باشند: سلولهای زنده که هسته آنها به رنگ آبی مات دیده می‌شود (L)، سلولهای آپوپتوتیکی که در مراحل اولیه آپوپتوز قرار دارند و هسته آنها آبی روشن و تکه تکه دیده می‌شود (Ap) و سلولهای مرده (در نتیجه آپوپتوز) که هسته آنها به رنگ قرمز تکه تکه و متراکم دیده می‌شود (D). بزرگنمایی ۱۰۰ برابر (a)، ۶۳۰ برابر (b) و ۲۰۰ برابر (c)

به منظور بررسی آپوپتوز با دستگاه فلوسیتومتری از دو رنگ PI و AO استفاده شد. هر دوی این رنگها با یک لیزر با طول موج ۴۸۸nmتحریک و به ترتیب رنگهای سبز (۵۲۵/۲۰nm) و قرمز (۶۱۷nm) ساطع می‌کنند که در محورهای FL-1(AO) و FL-2(PI) دریافت شدند. بعد از تنظیم ولتاژ، اصلاح روی هم افتادگی طول موجها و حذف نور حاصل از فلورسانس سلولهای شاهد، سلولهائی که تحت تابش گاما قرار گرفته و با رنگهای مذکور رنگ شده بودند، سه جمعیت مجزا تشکیل می‌دادند که شامل سلولهای زنده ($AO^{hi}PI^{lo}$) آپوپتوتیک ($AO^{lo}PI^{lo}$) و مرده ($AO^{lo}PI^{hi}$) بودند (شکل ۲).

این زیر جمعیتها بسته به دُز پرتو و مدت زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی، درصدهای متفاوتی از کل جمعیت سلولی را تشکیل می‌دادند (شکل ۴).

جدول ۱: ویژگیهای ریخت شناختی سلولهای آپوپتوتیک، زنده و مرده، بعد از رنگ‌آمیزی با HO42 و PI

نوع سلول	ویژگیهای ریخت شناختی HO42-PI
طبیعی	هسته سلول به رنگ آبی کم رنگ و مات غشاء سلول نفوذناپذیر نسبت به رنگ PI
آپوپتوتیک نهائی	هسته سلول به رنگ آبی روشن و درخشان، تکه تکه و متراکم غشاء سلول نفوذناپذیر نسبت به رنگ PI
نکروتیک	هسته سلول به رنگ قرمز و متورم غشاء سلول نفوذپذیر نسبت به رنگ PI

PI: پروپیدیوم یداد، HO42: هوخست ۳۳۳۴۲

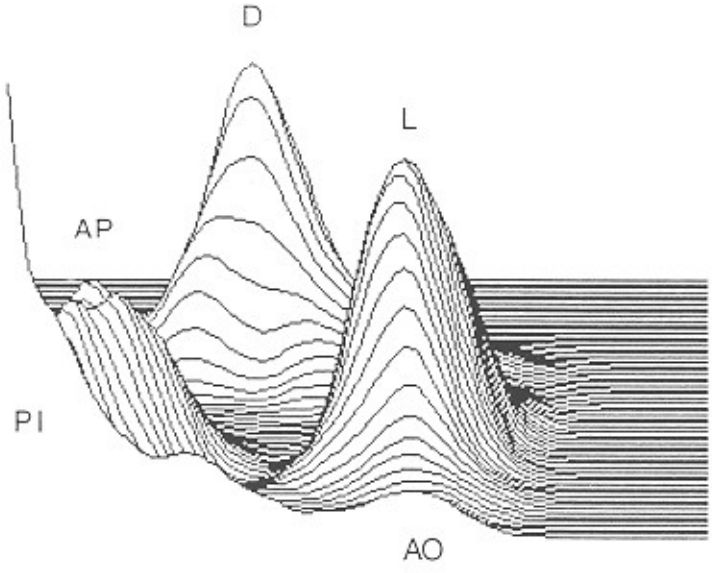
نتایج حاصل، نشان داد که با افزایش دُز پرتو تعداد سلولهای موجود در فلاسک در مقایسه با نمونهٔ شاهد کاهش یافته و شیب این کاهش با گذشت زمان بیشتر می‌شود. پرتودهی باعث محدود شدن رشد سلولها شده، این تأثیر با افزایش دُز پرتو نمایان‌تر می‌شود. بطوری که در دُزهای ۸Gy-۴ تعداد سلولها بسته به شدت دُز تا ۴۸ ساعت افزایش نسبی داشته بعد از آن کاهش می‌یابد در صورتی که در دُزهای ۱۲Gy و ۱۶Gy با گذشت زمان صرفاً کاهش تعداد سلولها مشاهده می‌شود (شکل ۴a). درصد سلولهای آپوپتوتیک نیز به دُز پرتو و زمان انکوباسیون بعد از آن بستگی داشت به طوری که با افزایش دُز تا ۸Gy درصد سلولهای آپوپتیک افزایش و در دُزهای بالاتر رو به کاهش می‌گذاشت.

جدول ۲: جمعیتهای سلولی حاصل از بررسی فلوسیتومتری T-47D بعد از تابش پرتو گاما و رنگ‌آمیزی با AO و PI

PI	AO	نوع سلول
پائین	بالا	زنده
پائین	پائین	آپوپتوتیک اولیه
بالا	پائین	آپوپتوتیک نهائی و نکروتیک

PI: پروپیدیوم یداد، AO: آکریدین نارنجی

این فرآیند تا ۴۸ ساعت بعد از تابش پرتو ادامه یافته و بعد از آن به جز در نمونه هایی که تحت تأثیر ۴Gy پرتو گاما بودند، در سایر دُزها کاهش نشان دادند. در مورد اخیر روند افزایش درصد سلولهای آپوپتیک تا ۷۲ ساعت بعد نیز ادامه یافت. در مجموع بالاترین درصد سلولهای آپوپتیک در دُز ۸Gy و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون حاصل شد. این یافته با مشاهدهٔ میکروسکوپی تعداد زیادی اجسام آپوپتیک با اندازهٔ حدودی ۶μM-۴ نیز تائید شد (شکل ۴b). درصد سلولهای زنده با افزایش دُز پرتو کاهش و شدت این کاهش بعد از ۲۴ ساعت بیشتر شد (شکل ۴c).

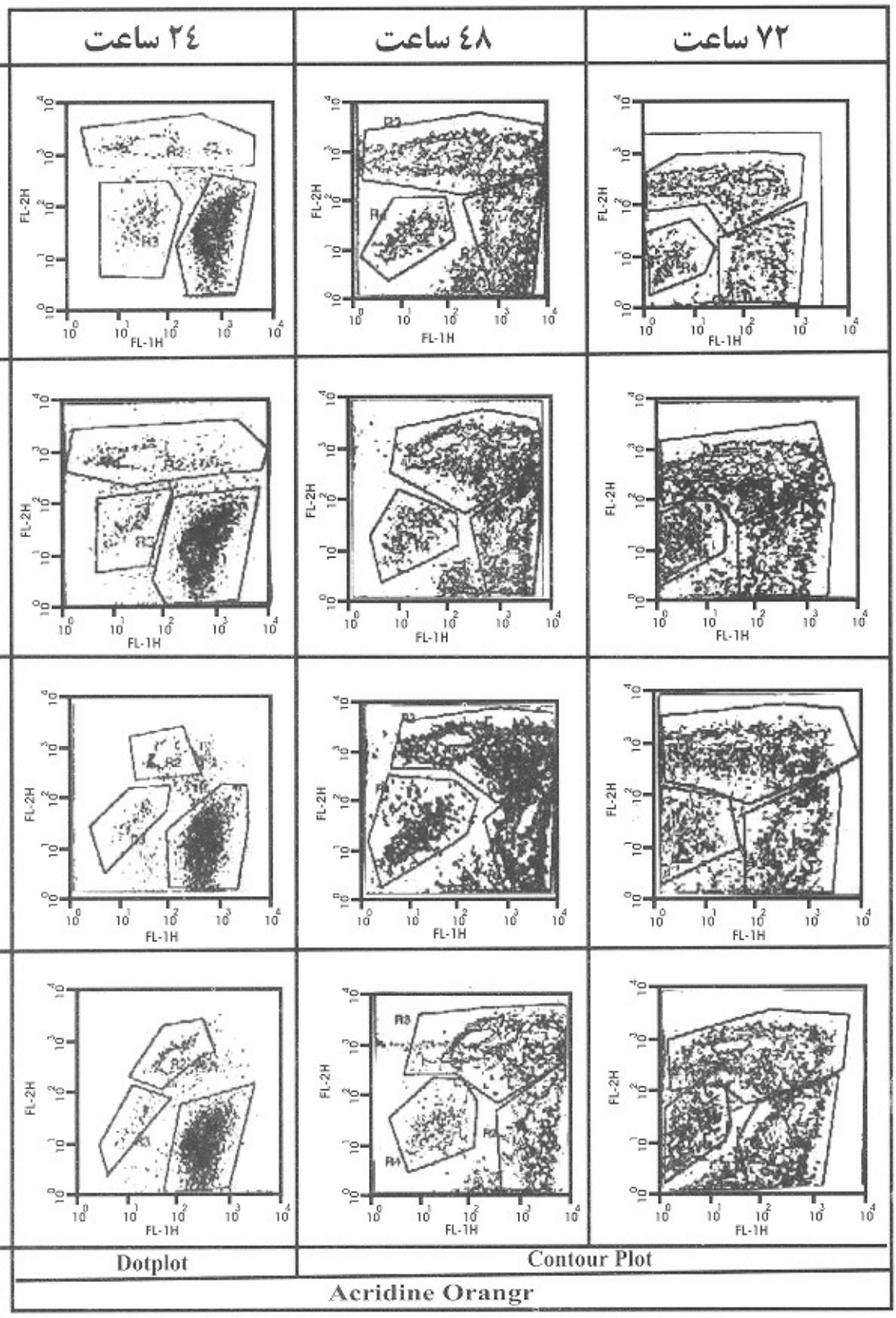


شکل ۲: بعد از تابش پرتو گاما به سلولهای کارسینوم پستان (رده T-47D) و رنگ‌آمیزی آنها با دو رنگ AO و PI و بررسی فلو سیتومتری سه جمعیت مجزای سلولی مشاهده می‌گردد: زنده ($AO^{hi}PI^{10}$)، آپوپتوتیک ($AO^{10}PI^{10}$) و مرده ($AO^{10}PI^{hi}$)

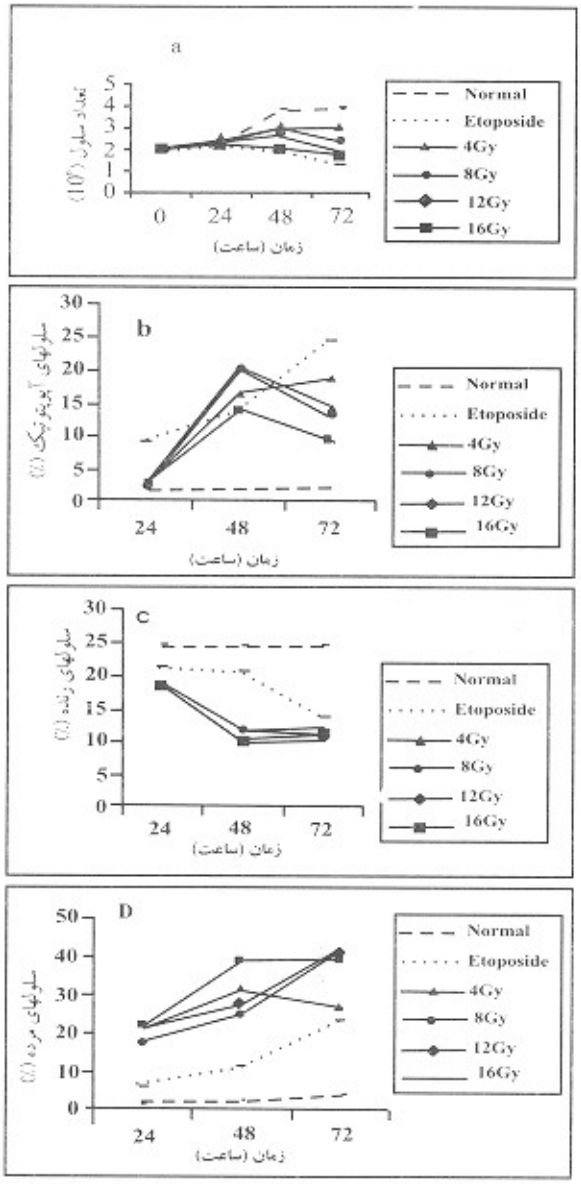
جدول ۳: تعداد سلولهای موجود در هنگام کشت، زمان تابش پرتو گاما و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از پرتودهی

زمان کشت ($\times10^6$)	زمان پرتودهی ($\times10^6$)	۲۴ ساعت	۴۸ ساعت ($\times10^6$)	۷۲ ساعت ($\times10^6$)	
۰/۵	۲±۰/۶	۲/۴±۰/۹	۳/۳۷±۱/۷	۳/۸۳±۱	نرمال
۰/۵	۲±۰/۶	۲/۲±۰/۹	۱/۸±۰/۵۳	۱/۲۷±۰/۲۵	انوپرزاید
۰/۵	۲±۰/۶	۲/۲۹±۰/۹	۲±۱/۸	۱/۹۲±۱/۳	۴Gy
۰/۵	۲±۰/۶	۲/۳۷±۰/۹	۲/۸۶±۱/۷	۲/۳۱±۱/۳	۸Gy
۰/۵	۲±۰/۶	۲/۳۳±۰/۹	۲/۶۵±۱/۷	۱/۹۳±۱/۳	۱۲Gy
۰/۵	۲±۰/۶	۲/۲۸±۰/۹	۲±۱/۴	۱/۶۹±۱/۲	۱۶Gy

Gy: گری، ۱ گری = ۱۰۰ راد



شکل ۳: نمونه‌ای از نمودارهای فلوسیتومتری سلولهای T-47D بعد از تابش گاما با دزهای ۴Gy، ۸Gy، ۱۲Gy و ۱۶Gy و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت انکوباسیون بعد از پرتودهی. بسته به میزان دز و زمان انکوباسیون درصدهای متفاوتی از سلولهای زنده (L)، سلولهای آپوپتوتیک (Ap) و مرده (D) بدست می آید. (برای توضیح بیشتر به متن مقاله مراجعه نمائید)



شکل ۴: سلولهای T-47D موجود در فلاسک کشت قبل از پرتودهی و ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد از پرتودهی (۲Gy، ۸Gy، ۱۲Gy و ۱۶Gy) از طریق هضم با تریپسین برداشت شده، قبل از بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری شمارش و تعداد سلولهای زنده آنها تعیین گردید (a). سپس با HO42/PI و AO/PI به ترتیب برای بررسی میکروسکوپی و فلوسیتومتری رنگ‌آمیزی شده، نتایج به صورت درصد سلولهای آپوپتوتیک (Ap) (b)، زنده (L) (c) و مرده (D) (d) بر حسب زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی نشان داده شده‌اند.

درصد سلولهای مرده نیز با افزایش دُز افزایش یافته و شیب این افزایش با گذشت زمان بیشتر گردید، به طوری که تا ۲۴ ساعت بعد از پرتودهی، شیب افزایش درصد سلولهای مرده ملایم بوده و بعد از آن (۷۲-۴۸ ساعت) این شیب تندتر گردید (شکل ۴d).

به طور خلاصه می‌توان گفت با افزایش دُز و زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی درصد سلولهای زنده کاهش و درصد سلولهای مرده افزایش می‌یابد ولی در مورد سلولهای آپوپتوتیک بیشترین درصد را بعد از ۴۸ ساعت می‌توان مشاهده نمود و پس از آن رو به کاهش می‌گذارد.

بحث

در این مطالعه از دو روش بررسی با میکروسکوپ فلورسانس و فلوسیتومتری برای تعیین میزان آپوپتوز ایجاد شده توسط تابش گاما در سلولهای کارسینوم پستان انسان استفاده شده است. در جریان آپوپتوز کروماتین سلول متراکم شده، غشاء هسته تمامیت خود را از دست داده، هسته قطعه قطعه می‌گردد، قطعات هسته به همراه بخشی از سیتوپلاسم اندامکهای سالمی که در غشاء سیتوپلاسمی محصور شده‌اند، اجسام آپوپتوتیک را تشکیل می‌دهند. این اجسام را می‌توان ۴۸ ساعت بعد از پرتودهی در زیر میکروسکوپ به وفور مشاهده نمود. بر اساس این تغییرات، فرآیند آپوپتوز را به سه مرحله اولیه، میانی و نهائی تقسیم نموده، روشهای متعددی را برای تشخیص مراحل مختلف آپوپتوز به کار می‌گیرند (۱۶). با اینکه مطالعات متعدد نشان داده‌اند که انواع پرتوها از جمله پرتوهای گاما، ایکس، ماوراء بنفش و غیره باعث القاء آپوپتوز

در سلولهای مختلف می‌شوند، ولی در غالب موارد این پرتوها در سلولهای مختلف به یک اندازه آپوپتوز القاء نمی‌کنند (۲۳). از این رو در این مطالعه ابتدا وقوع آپوپتوز از طریق رنگ‌آمیزی با HO42/PI و مشاهده با میکروسکوپ فلورسانس و نیز استفاده از داروی اتوپوزاید به عنوان شاهد مثبت مورد تائید قرار گرفت و همانگونه که محققین توصیف کرده بودند هسته سلولهای آپوپتیک اولیه به صورت متراکم، تکه تکه و به رنگ آبی روشن، هسته‌های سلولهای آپوپتوتیک نهایی به صورت متراکم تکه تکه و به رنگ قرمز و بالاخره هسته سلولهای طبیعی به رنگ آبی مات مشاهده گردید. به دنبال پرتودهی با دُزهای مختلف و انکوباسیون بعد از آن برای تعیین میزان تأثیر پرتو در القاء آپوپتوز لازم بود تا درصد سلولهای زنده آپوپتوتیک و مرده مشخص گردد که این امر با شمارش حدقال ۲۰۰ سلول در هر نمونه و نیز انجام آنالیز فلوسیتومتری میسر گردید.

مطالعات Gaugler و همکاران او (۲۴) نشان داد که آسیب ناشی از پرتو گاما بر روی DNAی سلول و در نتیجه القاء آپوپتوز و مرگ آن وابسته به دُز پرتو و زمان است. نتایج این مطالعه نیز به وضوح نشان داد که دُز و زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی، تأثیر مستقیمی بر تعداد سلولها دارد. به طوری که در مقایسه با نمونه شاهد با افزایش میزان دُز و زمان انکوباسیون تعداد سلولها کاهش می‌یابد و این کاهش در دُزهای بالاتر و زمان انکوباسیون بیشتر، بارزتر می‌شود. بدین معنی که در دُز ۴Gy کمترین میزان کاهش رشد و در ۱۶GY بیشترین میزان کاهش اتفاق می‌افتد (شکل ۴a). با اینکه نتایج این مطالعه و سایر مطالعات نشان داده که با افزایش دُز و طولانی‌تر شدن زمان انکوباسیون بعد از پرتودهی تعداد کلی سلولها کاهش یافته، از تعداد سلولهای زنده کاسته و بر تعداد سلولهای مرده (مراحل نهائی آپوپتوز و تکروز شده) افزوده می‌گردد. در این مورد سرعت مرگ سلولها و کاهش سلولهای زنده بین ۴۸-۲۴ ساعت زیاد بوده بعد از این مدت کندتر می‌گردد (شکل d، ۴c). ولی این یافته در مورد سلولهایی که در مراحل اولیه، آپوپتوز قرار دارند صادق نیست. بدین معنی که تعداد سلولهای آپوپتوتیک با میزان دُز و انکوباسیون بعد از آن رابطهٔ مستقیمی ندارد و تا دُز معین (۸Gy) و زمان مشخص (۴۸ ساعت) تعداد این سلولهای افزایش یافته و سپس رو به کاهش می‌گذارد. به نظر می‌رسد در مورد دُز ۴Gy روند القاء آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت نیز ادامه می‌یابد در صورتی که در مورد سایر دُزها رو به کاهش رفته و این امر می‌تواند به دلیل کمی دُز ۴Gy و تأثیر تدریجی آن باشد. نتایج مطالعات Meijer و Strobi نیز حاکی از آن است که بیشترین میزان آپوپتوز بعد از ۴۸ ساعت با دُز ۸Gy بدست می‌آید (۲۵، ۲۶). گزارش اخیر از این نظر که رده سلولی مورد مطالعه آن (MCF-7) همانند رده سلولی به کار رفته در تحقیق حاضر از کارسینوم پستان انسان حاصل شده است از اهمیت خاصی برخوردار است (۲۶).

از بررسی نتایج مطالعاتی که در این زمینه به عمل آمده چنین برمی‌آید که انواع گوناگون پرتوها در دُزهای ثابت و تقسیم شده می‌توانند باعث القاء آپوپتوز در سلولهای مختلف گردند (۱۰، ۱۱) و این امر به نوع سلول، نوع پرتو و دُز به کار رفته بستگی دارد (۱۴-۱۲). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که پرتو گاما در دُز ثابت می‌تواند باعث القاء آپوپتوز در سلولهای کارسینوم پستان انسان گردد ولی رابطه بین دُز و پرتو همیشه خطی نبوده و میزان القاء آپوپتوز می‌تواند در دُز و زمان انکوباسیون معینی به حداکثر برسد. نتایج مذکور با گزارش برخی از محققین دیگر نیز همخوانی دارد (۲۳، ۲۴). امروزه از نتایج این گونه مطالعات در علوم پایه و در علوم بالینی بهره گرفته می‌شود، که از آن جمله می‌توان به مطالعات مربوط به بررسی سازوکارهای سلولی و مولکولی آپوپتوز، جنین‌شناسی (۴) و تنظیم ایمنی (۵)، تعیین دُز مناسب برای رادیوتراپی (۷) و ایجاد آنتی ژنهای آپوپتوتیک برای ایمونوتراپی اشاره نمود.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله نگارندگان این مقاله بر خود وظیفه می‌دانند که از همکاری صمیمانه و و زحمات بی شائبه جناب آقای دکتر امان‌زاده و همکاران ایشان در بخش بانک سلولی انستیتوپاستور ایران سرکار خانم شریف‌زاده و همکاران ایشان در مرکز تابش گامای سازمان انرژی اتمی ایران و سرکار خانم حیات و همکاران ایشان در مرکز تحقیقات علوم پزشکی ایران تشکر و سپاسگزاری نمایند.

References

1. Kerr JFR, Wylie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenamenon with wide ranging implications in tissuekinetics. Brit J Cancer, 1972; 26 :239-257

2. Searle J, Kerr JFR, Bishop CJ: Necrosis and apoptosis distinct modes of cell death with fundamentally different significance. Pathol Ann, 1982; 17(2): 229-259

3. Cohen JJ, Duke RC: Glucocorticoid induced apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. J Immunol 1984; 132: 38-42

4. Goldman AS, Baker MK, Piddington R, Herold R: Inhibition of programmed cell death in mouse embryonic palate in vitro by cortisol and phenytoin: receptor involvement and requirement of protein synthesis. Proc Soc Exp Biol Med 1983; 174: 239-243

5. Duke RC: Apoptosis in cell mediated immunity, In: Apoptosis: The molecular basis of cell death, Curr. Commun. Cell And Mol Biol Vol 3 Tomei, LD, Cope, FO, (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 1991; pp: 209-226

6. Martin DP, Johnson EM: Jr: Programmed cell death in the peripheral nervous system, In: apoptosis: The molecular basis of cell death, Curr. Commun. Cell. And Mol Biol Vol 3, Tamei LD, Cope, FO (eds), Cold Spring

Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1991; 247-261
7. Krishan A, Frei E: III: Morphological basis for cytolytic effect of vinblastine and vincristine on cultured human leukemic lymphocytes. Cancer Res. 1975; 35: 497-501
8. Carson DA, Ribeiro JM: Apoptosis and disease. Lancet, 1993; 341: 1251-1254
9. Oren M: The involvement of oncogenes and tumor suppressor genes in the control of apoptosis. Cancer Metastasis Rev 1992; 11:141-148.
10. Meyn RE, Stephans LC, Ang KK, Hunter NR, Brock WA, Milas L, Peters L: Heterogeneity in the development of apoptosis in irradiated murine tumors of different histologies. Int J Rad Biol 1993; 64: 583-591
11. Olive PL, Frazer G, Bunath JP: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. Rad Res 1993; 136: 130-136
12. Stapper NJ, Stuschke M, sak A, stuben G: Radiation- induced apoptosis in human sarcoma and glioma cell lines. Int J Cancer 1995; 62: 58-62
13. Seamus JM, Cotter TG: Ultraviolet B irradiation of human leukemia HL-60 cells in vitro induces apoptosis. Int J Rad Biol 1991; 59(4): 1001-1016
14. Zhan Q, Fan S, Bue I, Guillouf C, Liebermann DA, O ConnorPM, Fornace AJ: Induction of bax by genotoxic stress in human cells correlates with normal p53 status and apoptosis. Oncogene 1994; 9: 3743-3751
15. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wylie AH: Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis programmed cell death by multiparameter flow cytometry, Biochim Biophys Acta, 1992; 1133: 275-285
16. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Andtraganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytomery, Cytometry 1992; 13: 795-808
17. Ormerod MG, Sun XM, Snowden RT, Davies R, Fearnhead H, Cohen G: Increased membrane permeability of apoptotic thymocytes and flow cytometric study, Cytometry 1993; 14: 595-602
18. Telford WG, king LE, Fraker PJ: Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis associated chromatin degradation by flow cytometry, cytometry, 1992; 13: 131-143
19. Darzynkiewicz Z, Traganos F, Kapuscinski J, Stuiano-Coico L, Melamed MR: Accessibility of DNA in situ to various fluorochromes: Relationship to chromatin damages during erythroid differentiation of Friend leukemia cells, Cytometry 1984; 5: 355-363
20. Matthews JB, Harrison A, Palcio B, Skov K: Automated fluorescence microscopic measurement of apoptosis frequency following ionizing radiation exposure in cultured mammalian cells. Int J Rad Biol 1998; 73: 629-639
21. Tanke HJ, Van der Linden PWG, Lungerak J: Alternative fluorochromes to ethidium bromide for automated read out of cytotoxicity tests. J Immunol Methods 1982; 52: 91
22. Afanas evVN, Korol BA, Mantsygin YA, Nelipovich PA, Pechtnikov VA, Umansky SR: Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two tyypes of cell death. FEBS 1986; 194: 347-350
23. Burger H, Nooters K, Boersma AWM, Kortland CJ, Van der Berg AP, Stoter G: Expression of p53, p21/WAF/CIP, Bcl-2,Bax,Bcl-X, and Bak in radiation-induced apoptosis in testicular germ cell tumor lines. Int J Rad Oncol Biol Phys 1998; 41(2): 415-424
24. Gaugler MH, Squiban C, Claraz M, Schweitzer K, Weksler B, Gourmelon P, Van der Meeren A, Characrerization of the response of human bone marrow endothelial cells to in vitro irradiation. Brit J Haematol 1998; 103: 980-989
25. Meijer AE, Kronquist U-SE, Levensohn R, Harms-ring dahl M: RBE for the induction of apoptosis in human peripheral lymphocytes exposed in vitro to high- LET radiation generated by accelerated nitrogen ions Int J Rad Biol 1998; 73(2): 169-177
26. Strobi JS, Melkoumiun Z, Peterson AP, Hylton H: The cell death response to-radiation in MCF-7 cells is enhanced by a neuroleptic drug, pimozide. Breast Cancer Res. Treat 1998; 51: 83-95
27. Meijer AE, Backbro Saeidi AB, Zelenskaya A, Czene S, Granuth F, Hurms-Ringdahl M: Influence of dose-rate,post-irradiation incubation time and growth factors on interphase cell death by apoptosis and clonogenic survival of human peripheral. lymphocytes Int J Rad Biol 1999; 75(10): 1265-123
28. Liegler TJ, Hyan W, Benedictyen TS, Stites DP: Detection and quantification of live, apoptotic, and necrotic human peripheval lymphocytes by single-laser flow cytometry. Clin Diag Lab Immunol 1995; 369-376