

## ارزیابی تأثیر پرتو گاما بر سلول‌های اریترئیدی مغز استخوان موش‌های نژاد Balb/c بر اساس آزمون میکرونوکلئوس

حسن توکلی \* M.Sc.، غلامرضا پورحیدری \*\* Ph.D.، سید جلال حسینی مهر \*\*\* Ph.D. و علیقلی سبجانی \*\*\*\* Ph.D.

آدرس مکاتبه: \* دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) - دانشکده پزشکی - گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک - تهران - ایران

\*\* دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج) - دانشکده پزشکی - گروه فارماکولوژی و پژوهشکده طب رزمی

مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی - تهران - ایران

\*\*\* دانشگاه علوم پزشکی مازندران - گروه فارماکولوژی - ساری - ایران

\*\*\*\* دانشگاه علوم پزشکی تهران - دانشکده پزشکی - گروه علوم تشریح - تهران - ایران

### خلاصه

تأثیر پرتو گاما بر سلول‌های رده اریترئیدی مغز استخوان مانند پلی کروماتیک اریتروسیت‌ها (PCE) و نروماتیک اریتروسیت‌ها (NCE) در اثر تابش پرتو گاما در دوزهای ۱، ۲، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گری در این مقاله مورد بررسی قرار گرفته است. ۲۴ ساعت پس از پرتو دهی، موش‌ها به روش جابجایی گردنی (cervical dislocation) کشته شده و مغز استخوان ناحیه فمور آنها خارج گردید. سپس PCE، NCE و میکرونوکلئوس‌هایی که در اثر پرتوگیری در سلول‌های رده اریترئیدی ایجاد شده بودند، مورد بررسی قرار گرفته است. برای شمارش سلول‌های بدون میکرونوکلئوس و دارای میکرونوکلئوس از رنگ‌آمیزی استاندارد و میکروسکپ نوری استفاده شده است. بر اساس یافته‌های این تحقیق کاهش نسبی PCE و افزایش تعداد میکرونوکلئوس‌ها تا دوز ۲ گری مشاهده گردید که به ترتیب بیان‌گر اثر مسمومیت‌زایی (cytotoxic effect) و ایجاد شکست در زنجیره DNA ناشی از پرتو گاما (clastogenic effect) می‌باشد. در دوزهای بالاتر از ۲ گری، روند فوق ادامه نیافت، زیرا بین دوزهای ۵ تا ۷/۵ گری افزایش و در دوزهای ۷/۵ تا ۱۰ گری کاهش، مشاهده گردید. تعداد میکرونوکلئوس‌ها نیز در همین دوزها کاهش یافته است. از مجموع این تحولات، چنین به نظر می‌رسد که احتمالاً مکانیزم‌های دفاعی موش‌های Balb/c در دوزهای بالاتر از ۲ گری تحریک شده و مقاومت بیشتری را در مقابل آثار مخرب پرتو از خود نشان می‌دهند.

**واژه‌های کلیدی:** میکرونوکلئوس، پرتو گاما، مغز استخوان، موش نژاد Balb/c

### مقدمه

به‌دلیل کارایی بسیار زیاد پرتو گاما در ابعاد درمانی و تشخیصی استفاده از آن هر روزه دامنه گسترده‌تری می‌یابد. از طرف دیگر برای کاهش آثار زیان‌بار پرتو گاما و به‌ویژه طراحی داروهای حفاظتی مناسب، تاکنون پژوهش‌های متعددی در مورد

پرتوهای یونیزان از جمله پرتو گاما انرژی لازم را برای ایجاد یونیزاسیون در بافت‌های بدن، دارا هستند و اثرات تخریبی این پرتوها نیز به همین دلیل به‌وجود می‌آید [۱، ۲]. با این حال،

سلول‌های رده اریترئیدی در مغز استخوان فمور موش‌های نژاد Balb/c در دوزهای ۱ تا ۱۰ گری به منظور ارزیابی اثر رادیو پروتکتوری ویتامین A (که موضوع پژوهش مستقلاً بوده است)، این پژوهش انجام شده و نتایج و بحث مربوط به آن در این مقاله ارائه می‌گردد.

## مواد و روش‌ها

۳۶ عدد موش Balb/ دو ماهه و با وزن ۲۳ تا ۲۵ گرم از انستیتو پاستور تهیه گردید. به منظور انطباق با شرایط آزمایشگاه، حیوانات به مدت یک هفته و هر روز، در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. سپس حیوانات در شش گروه مساوی تقسیم‌بندی شده و با دوزهای صفر (گروه کنترل)، ۱، ۲، ۵، ۷/۵ و ۱۰ گری تحت تابش پرتو گاما قرار گرفتند. برای پرتودهی از دستگاه رادیو تراپی Theratron 780 Medical AECL با میدان پرتودهی ۳۵ در ۳۵ سانتیمتر و با آهنگ دوز ۱/۴۵ CGy/min استفاده گردید. برای افزایش دقت آزمایش و سهولت کار، حیوانات در درون محفظه‌هایی از جنس پلاکسی‌گلاس و در فاصله ۸۰ سانتیمتری دستگاه قرار گرفتند. برای انجام آزمون میکرونوکلئوس و شمارش سلول‌های رده اریترئیدی، ۲۴ ساعت پس از پرتودهی، همه حیوانات به روش جابجایی گردنی (cervical dislocation) کشته شده و استخوان فمور آنها خارج گردید. با تزریق سرم جنین گوساله (که از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد) به درون فمور، مغز استخوان آنها به همراه سرم جنین گوساله درون لوله آزمایش جمع‌آوری گردید. برای تهیه مغز استخوان خالص لوله‌های آزمایش به مدت ۵ دقیقه و با دور ۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. نمونه‌های مغز استخوان خالص با پیپت پاستور بر روی یک لام قرار گرفته و سپس با کشیدن لام دیگر بر روی نمونه مغز استخوان، اسمیرهای نازکی تهیه گردید. لام‌ها به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد فیکس شده و سپس با مای - گرانوالد و گیمسا با روش استاندارد رنگ‌آمیزی گردید [۱۱].

در آخرین مرحله تعداد پلی کروماتیک اریتروسیت‌ها (PCE) و نرموکروماتیک اریتروسیت‌ها (NCE) و میکرونوکلئوس‌هایی که احتمالاً در هر یک از آنها وجود داشت به وسیله میکروسکپ نوری و با بزرگنمایی ۱۰۰ شمارش شدند.

مکانیزم تأثیر پرتو بر اندام‌های گوناگون انجام شده است [۳، ۴]، به طوری که بررسی‌های هماتوپوئیتیک پرتو گاما بخش مهمی از این پژوهش‌ها را به خود اختصاص داده است [۵، ۶].

پژوهش‌های متعدد ثابت کرده است که یکی از مهمترین تغییرات هماتوپوئیتیکی که پس از تابش پرتو گاما ایجاد می‌شود، کاهش قابل توجه تعداد گلبول‌های قرمز خون محیطی است و با توجه به این واقعیت، وجود تغییراتی در سلول‌های مغز استخوان که در واقع سلول‌های زایای گلبول قرمز هستند، قابل انتظار است [۷]. آزمون میکرونوکلئوس یکی از روش‌هایی است که در ارزیابی اثرات سیتوتوکسیک و کلاستوتیک پرتوها در اندام‌های گوناگون از جمله مغز استخوان مورد استفاده قرار گرفته است. وجود این دو اثر نشان‌دهنده اثرات تخریبی پرتو گاما بر مغز استخوان است. سلول‌های مغز استخوان از ابتدای تقسیم تا تبدیل شدن به پلی کروماتیک اریتروسیت‌ها (PCE) و سپس به نرموکروماتیک اریتروسیت‌ها (NCE) که بالغ‌ترین گونه رده اریترئیدی مغز استخوان است، مراحل مختلفی را طی می‌کنند و پرتوگیری مغز استخوان از چشمه گاما باعث ایجاد میکرونوکلئوس در بعضی از سلول‌های هر دو گونه می‌گردد که با روش استاندارد قابل آشکارسازی است.

میکرونوکلئوس‌ها یا ریز هسته‌ها در واقع پاره‌های کروموزمی هستند که در طی فرآیند میتوزی، به سلول حاصل از تقسیم منتقل نشده و در سیتوپلاسم سلول مادر باقی می‌مانند. اندازه این میکرونوکلئوس‌ها بین ۵ تا ۲۰ درصد اندازه واقعی هسته است [۸، ۹]. از هنگامی که شناسایی و شمارش میکرونوکلئوس‌ها توسط اشید و همکارانش امکان‌پذیر گردید، تاکنون از این آزمون در زمینه‌های گوناگون از جمله رادیوبیولوژی استفاده شده است که از جمله می‌توان به تعیین میزان اثر عوامل حساس‌کننده‌های پرتوی (radiosensitizers) و حفاظت‌کننده‌های پرتوی (radioprotectors) و پدیده انطباق پرتوی (radioadaptation) نام برد [۱۰].

علی‌رغم استفاده فراوان از آزمون میکرونوکلئوس در مطالعات رادیوبیولوژی، تاکنون در مورد این آزمون در دوزهای بالاتر از دو گری گزارشی ارائه نشده است. به دلیل نیاز به آگاهی از رفتار

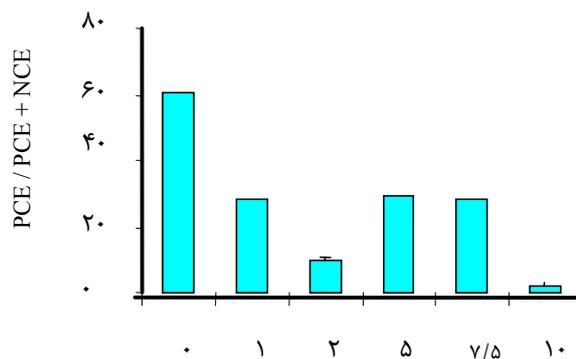
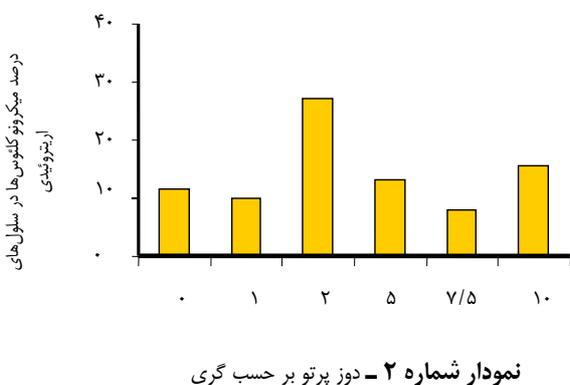
جدول شماره ۱: اثر دوزهای مختلف بر تغییرات PCE و NCE

شماره گروه	دوز پرتو بر حسب گری	$PCE / PCE+NCE \times 100$	تعداد کل میکرونوکلئوس‌ها PCE+NCE
۱	۰	$60.78 \pm 3.24$	$11/6 \pm 1/97$
۲	۱	$28.01 \pm 3.02$	$10/19 \pm 1/46$
۳	۲	$9.32 \pm 1.73$	$27/34 \pm 3/18$
۴	۵	$29.60 \pm 2.88$	$13/05 \pm 2/26$
۵	۷/۵	$28.69 \pm 2.55$	$8/06 \pm 2/12$
۶	۱۰	$2/07 \pm 1/15$	$15/49 \pm 2/72$

## نتایج

مقادیری که در جدول شماره ۱ ارایه شده است، شامل  $Ave \pm Se$  می‌باشد. هر گروه شامل ۶ موش از نژاد Balb/c بوده و تعداد میکرونوکلئوس‌ها از روی شمارش حدود ۱۰۰۰ عدد سلول به دست آمده است.

پنج و هفت و نیم گری پرتو گاما نشان داده شده است.



در این نمودار محور افقی نشان‌دهنده دوز پرتو گاما بر حسب گری و محور عمودی تعداد میکرونوکلئوس‌های ایجاد شده در سلول‌های رده اریتروئیدی یعنی پلی کروماتیک اریتروسیت‌ها (PCE) و نرموکروماتیک اریتروسیت‌ها (NCE) می‌باشد.

نمودار شماره ۱: تغییرات سلول‌های نابالغ مغز استخوان یعنی پلی کروماتیک اریتروسیت‌ها نسبت به سلول‌های بالغ یعنی نرموکروماتیک اریتروسیت‌ها در دوزهای مختلف پرتو گاما ترسیم شده است.

## بحث

تاکنون پژوهش‌های متعددی در مورد تأثیر پرتو گاما بر سلول‌های مغز استخوان بر اساس شمارش تعداد NCE، PCE و تعداد میکرونوکلئوس‌های ایجاد شده در آنها انجام شده است. بر اساس این پژوهش‌ها، افزایش تعداد میکرونوکلئوس‌ها در میان سلول‌های پلی کروماتیک اریتروسیت و نرموکروماتیک اریتروسیت بیان‌گر اثرات کلاستوزنیک پرتو گاما است. اثرات کلاستوزنیک در واقع به

در این نمودار محور افقی نشان‌دهنده دوز پرتو و محور عمودی نسبت تعداد پلی کروماتیک اریتروسیت به مجموع سلول‌های رده اریتروئیدی (مجموع پلی کروماتیک اریتروسیت و نرموکروماتیک اریتروسیت) را نشان می‌دهد. از نظر مراحل بلوغ مغز استخوان NCE از PCE بالغ‌تر است.

نمودار شماره ۲: در نمودار شماره ۲ افزایش قابل توجه تعداد میکرونوکلئوس‌ها در دوز ۲ گری و روند کاهش آن در دوزهای

نمودار ۲ نشان می‌دهد که با افزایش پرتو گاما تا دوز ۲ گری تعداد میکرونوکلئوس‌ها نیز متناسب با آن افزایش یافته است که با نتایج سایر پژوهش‌گران هم‌خوانی دارد. به دلیل عدم وجود اطلاعات در مورد پاسخ سلول‌های مغز استخوان به دوزهای بالاتر از ۲ گری و نیاز به آن برای بررسی خاصیت رادیو پروتکتوری ویتامین A در تحقیقات بعدی، تأثیر دوزهایی بالاتر پرتو گاما مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها نشان داد که در دوزهای بالاتر، با توقف روند افزایش، بین دوزهای ۲ تا ۷/۵ گری تعداد میکرونوکلئوس‌ها کاهش می‌یابد. اصولاً آثار کلاستوزنیک پرتو گاما به دلیل ایجاد رادیکال‌های آزاد هیدروژن، اکسیژن و هیدروکسیل در محیط‌های بیولوژیک و حمله این رادیکال‌ها به پیوندهای زنجیره DNA و شکست این پیوندها، ایجاد می‌شوند. مکانیزم دفاعی سلول در مقابل این گونه آثار سوء پرتو گاما، جمع‌آوری آنزیمی رادیکال‌های آزاد (radical scavenging) است [۱۴]. بنابراین، این احتمال وجود دارد که این مکانیزم در دوزهای مذکور با کارایی بیشتری وارد عمل شود.

شکست‌های ایجاد شده در زنجیره‌های DNA گفته می‌شود [۱۱، ۱۲، ۱۳].

همان‌طور که در نمودار ۱ ملاحظه می‌گردد، در آزمایش‌های انجام شده در شرایط نرمال (در دوز صفر پرتو گاما) نسبت پلی کروماتیک‌اریتروسیت به مجموع پلی کروماتیک‌اریتروسیت و نرموکروماتیک‌اریتروسیت برابر با ۰/۶ تعیین گردید. این نسبت تا دوز ۲ گری کاهش می‌یابد که اثر سوء پرتو را در ایجاد اختلال در روند رشد تکاملی سلول‌های مغز استخوان از پلی کروماتیک‌اریتروسیت به نرموکروماتیک‌اریتروسیت، نشان می‌دهد. در بین دوزهای ۲ تا ۷/۵ گری بهبودی نسبی در این نسبت دیده می‌شود اگرچه هنوز تا رسیدن به حد نرمال خود فاصله دارد. با توجه به نتایجی که از این نسبت به دست آمده، به همراه کاهش میکرونوکلئوس‌ها، احتمال افزایش کارایی ترمیم آنزیمی را بین دوزهای ۲ تا ۷/۵ گری قوت بخشیده است، اما ادامه نیافتن این روند در دوزهای بالاتر از ۷/۵ گری نیاز به بررسی بیشتری دارد.

## منابع

- Schmitz A, Bayer J, Dechamps N, Thomas G(2003). Intrinsic susceptibility to radiation-induced apoptosis of human lymphocyte subpopulations, *Inetrnational Journal of Radition Oncology Biology Physics*; 57(3): 769-778.
- Chaubey R.C, Bhilwade HN, Rajagopalan R, Bannur SV(2001). Gamma ray induced DNA damage in human and mouse leucocytes measured by SCGE-pro: a software developed for automated image analysis and data processing for comet assay. *Mutation Research / Genetic Toxicolgy and Environmental Mutagenesis*; 490(2): 187-197.
- Habit OH, Saada HN, Azab KhSh, Abdel-Rahman M, El-Malah DF(2000). The modifying effect of beta – carotene on gamma radiation– induced elevation of oxidative reactions and genotoxicity in male rats. *Mutation Research / Genetic Toxicolgy and Environmental Mutagenesis*; 466(2): 179 –186.
- Vrinda B, Daevi PU(2001). Radiation protection of human lymphocyte chromosomes in vitro by orientin and vicenin. *Mutation Research / Genetic Toxicolgy and Environmental Mutagenesis*; 498(1-2): 39-46.
- Daevi PU, Hossain M(2000). Induction of chromosomal instability in mouse hematopoietic cells by fetal irradiation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 456(1-2): 33- 37.
- Seed TM, Fritz TE, Tolle DV, Jackson WE, Hematopoietic responses under protracted exposures to low daily dose gamma irradiation. *Advance Space Research*; 30(4): 945– 955.
- Kumar MS, Unnikrishnan MK, Daevi PU(2003). Effect of 5- aminosalicyclic acid on radiation – induced micronuclei in mouse bone marrow. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*; 527(1-2): 7- 14.
- Vallarino– Kelly T, Morales– Ramirez P(2001). Kinetics of micronucleous induction and cytotoxic activity of colchicine In murine erythroblast in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicolgy and Environmental Mutagenesis*; 495(1-2): 51-59.
- Lenarczyk BM, Goddu SM, Rao DV, Howell RW(2001). Induction of micronuclei in reticulocytes after exposure to <sup>32</sup>P and <sup>90</sup>Y. *J Nucl Med*; 42: 162-169.

**10-** Masunaga S, Ono KO, Suzuki M, Kinashi Y, Takagaki M(2001). Radiobiologic significance of apoptosis and micronucleation in quiescent cells within solid tumors following gamma ray. International journal of radiation oncology. Biology Physics; 49(5): 1361 – 1368.

**11-** Jagetia GC, Aruna R(2003). Correlation of micronuclei– induction with the cell survival in Hella cells treated with a base a ine (AZT) before nalogue, azidothymid exposure radiation. Toxicology Letters; 139(1): 33 - 43.

**12-** Volders A, Zeiger E, Bigatti MP(2003). Intra and inter laboratory variation in the scoring of

micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes : Results of an international slide scoring exercise by the human project. Mutation Research / Genetic Toxicolgy and Environmental Mutagenesis; 534(1-2): 45-64.

**13-** Sari– Minodier I, Orsiere T, Bellon L, Pompili J, Spain C, Botta A(2002). Cytogenetic monitoring of industrial radiographers using the micronucleous assay. Mutation Research / Genetic Toxicolgy and Environmental Mutagenesis; 521(1-2): 37- 46.

**14-** Manova VI, Stoilov LM(2003). Induction and recovery of double strand breaks in barley ribosomal DNA. DNA repair; 2(9): 983– 990.