طب نظامی
تابستان ۱۳۸۱، شماره ٤(۲)
صفحات:۷٤-۷۱

بررسی میزان حساسیت آزمون میکرونوکلئوس در مغز استخوان موش‌های balb/c پرتو دیده با گامای ^{60}Co

حسن توکلی* .M.Sc ، غلامرضا پورحیدری** .Ph.D

آدرس مکاتبه : * دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌ا (عج) ـ دانشکده پزشکی ـ گروه فیزیولوژی و بیوفیزیک ـ
** دانشگاه علوم پزشکی بقیه‌الله (عج) ـ پژوهشکده طب رزمی ـ مرکز تحقیقات آسیب‌های شیمیایی نظامی

خلاصه

در کلیه انفجارهای هسته‌ای دو عامل وجود دارد که نیروهای انسانی را اعم از نظامی و غیر نظامی در معرض تهدید قرار می‌دهد، یکی موج انفجار اولیه و دیگری پرتوهای رادیواکتیو شامل پرتوهای آلفا، بتا و گاما می‌باشند. بررسی آثار بیولوژیک هر یک از این پرتوها، مورد توجه پژوهشگران متعددی بوده است بطوریکه تاریخچه این پژوهش‌ها به زمان کشف پرتو ایکس بوسیله رونتگن برمی‌گردد.

سوال مهمی که همه پژوهشگران در این زمینه با آن مواجه‌اند این است که چه شاخص یا شاخص‌هایی برای بررسی آثار زیان بار بیولوژیک پرتوهای رادیواکتیو مناسب بوده و در مقابل نوع پرتو و میزان دوز آن حساسیت لازم را دارا است.

یکی از روش‌های مطالعه در زیست پرتوی، استفاده از آزمون میکرونوکلئوس می‌باشد. میکرونوکلئوس‌ها پاره‌های کروموزمی هستند که در فرایند میتوزی به سلول‌های دختری منتقل نشده و در سیتوپلاسم مادر باقی می‌مانند. میزان حساسیت این شاخص (شمارش میکرونوکلئوس‌ها) در مقابل پرتوی گاما تابش شده از ^{60}Co در این طرح پژوهشی مورد ارزیابی قرار گرفت. در معرض تابش قرار دادن موش‌های balb/c باعث افزایش چشمگیر میکرونوکلئوس‌ها در سلول‌های پلی کروماتیک اریتروسیت (PCE) و نرموکروماتیک اریتروسیت (NCE) می‌گردد، درحالیکه پرتو برروی نسبت این دوگونه سلولی یعنی PCE/PCE+NCE تاثیری ندارد. دوز گامای مورد استفاده دراین پژوهش ۱/۵ گری بوده است .

نتایج بدست آمده نشان داد که آزمون میکرونوکلئوس از حساسیت لازم برای مطالعات زیست پرتوی برخوردار بوده و می‌تواند به عنوان یک دوزیمتر بیولوژیکی در مقابل پرتو گاما مورد استفاده قرار گیرد و علاوه بر این، در روند تکاملی سلول‌های اریتروئیدی در مغز استخوان فمور موش تاثیر گذار نیست.

واژه‌های کلیدی: آزمون میکرونوکلئوس، پرتو گاما، مغزاستخوان

مقدمه

اعتبار گزارش‌های پژوهشی در زمینه زیست پرتوی، به میزان حساسیت روش بکار برده شده بستگی دارد. از نظر تاریخی اولین مطالعات در *in vivo* در سال ۱۹۵۹ توسط Wilson و Hewit انجام شد. این پژوهشگران، میزان تاثیر پرتو گاما را بر روی درمان تومورهای سرطانی موش‌ها مورد بررسی قرار دادند و در روش کار خود از سلول‌های سرطانی رشد یافته در صفاق موش استفاده نمودند (۱). این سلولها را بدون پرتو دهی قبلی، به موش‌های گروه کنترل تزریق کردند. در گروه آزمایشی، ابتدا سلول‌های سرطانی را در معرض تابش پرتو گاما قرار داده و سپس آنها را به موش‌ها تزریق کردند. تعداد سلول‌های سرطانی که باعث مرگ و میر ۵۰٪ از موش‌ها گردید را به عنوان شاخص ارزیابی آزمایش انتخاب نموده

[Downloaded from militarymedj.ir on 2023-01-31]

و ثابت کردند که LD_{50} بدست آمده در گروه آزمایشی بطور موثری افزایش پیدا کرد.

در سال ۱۹۶۹ Hill و Bush سلول‌های سرطانی را به موش تزریق کرده و میزان کولنی‌زایی آن را در درون ریه موش مورد ارزیابی قرار داده و نشان دادند که میزان کولنی زایی سلول‌های سرطانی که در معرض پرتو گاما قرار گرفته‌اند، بطور چشمگیری کاهش یافته است (۲).

در سال ۱۹۶۰، Till و Mcclloch سلول‌های سازنده خونی را در طحال موش مورد بررسی قرار دادند، به این ترتیب که سلول‌های مغز استخوان موش را که حاوی سلول‌های CFU (Colony Forming Unit Spleen) بود را به دو صورت، همراه با تابش پرتو گاما و بدون پرتو دهی، به موش تزریق کرده و میزان کولنی زایی را در طحال مشاهده نمودند. نتیجه این آزمایش نشان داد که با افزایش دوز پرتو، میزان کولنی‌زایی آن در طحال به نحو چشمگیری کاهش یافته است (۳).

در سال ۱۹۷۰، Elkind و Withers میزان از بین رفتن و تولید پرزهای موجود در سیتم گوارشی را شاخص آسیب پذیری پرتو گاما قرار دادند و ملاحظه کردند که میزان پرزها در موش‌های پرتو گرفته، بطور معنی داری نسبت به موش‌هایی که در معرض پرتو قرار نگرفته‌اند، کاهش یافته است (۴).

در سال ۱۹۸۲ ، Powers-Risius و Alpen برای ارزیابی میزان آسیب پذیری پرتوهای گاما، کاهش وزن بیضه را در اثر پرتوگیری حیوان، مورد توجه قرار داده و از آن به عنوان یک شاخص مهم برای سنجش میزان تاثیر پذیری حیوان در مقابل پرتوگیری استفاده نمودند (۵).

Withers ، در سال ۱۹۶۷ با روش خاصی میزان تاثیر گذاری پرتو گاما را بر روی سلول‌های زایای مو مورد بررسی قرار داد (۶). درمطالعه انجام شده، ابتدا با قرار دادن یک حفاظ سربی دایره‌ای، کل اطراف آن را در معرض پرتودهی با دوز بسیار بالا، مثلاً ۳۰ گری قرار داده و سپس با برداشتن حفاظ، ناحیه پرتو ندیده را در معرض دوزهای مختلف پرتو گاما قرار داده و میزان بهبودی آن را پس از پرتو گیری مورد مطالعه قرار دادند.

علاوه بر روش‌های ذکر شده برای مطالعه زیست پرتوی، می‌توان بطور مستقیم اثر پرتو را بر موش‌هایی که مراحل مختلف دوران حاملگی خود را می‌گذرانند و در معرض پرتو با دوزهای مختلف قرار می‌گیرند، بر روی جنین آنها مورد بررسی قرار داد. لذا، Rugh از این روش برای مطالعات زیست پرتوی استفاده نمود (۷). اما روشی که در این طرح تحقیقاتی مورد بررسی قرار گرفت، آزمون میکرونوکلئوس بوده است. این آزمون در سال ۱۹۷۵، توسط Schmid معرفی گردید و درآن روش رنگ آمیزی و آشکار سازی میکرونوکلئوس‌ها نیز بیان گردید (۸).

در سال ۱۹۷۳ Heddle شمارش میکرونوکلئوس‌ها را در لنفوسیت‌ها برای ارزیابی میزان تاثیر عوامل ژنوتوکسیک بکار گرفت (۹). در سال ۱۹۹۴، Streffer و Muller مکانیزم تولید میکرونوکلئوس را مورد بررسی و ارزیابی قرار دادند (۱۰). آنها ثابت کردند که میکرونوکلئوس‌ها در طی فرایند میتوز سلولی ایجاد می‌شوند و در واقع تکه‌های کروموزمی هستند که به دلیل صدمه در کینتکور سلولی و یا فقدان دوک‌هایی که در تقسیم سلولی مشارکت دارند، این تکه در سیتوپلاسم یکی از سلول‌های دختری باقی مانده که با رنگ آمیزی مناسب با ابعادی در حدود یک پنجم تا یک بیستم حجم هسته قابل مشاهده می‌باشند. از آنجا که شمارش تعداد زیادی سلول به منظور دستیابی دقیق‌تر به میزان میکرونوکلئوس‌ها بوسیله میکروسکپ کار دشواری است، در سال ۱۹۹۵ بوسیله Bocker و همکارانش شمارش اتوماتیک آنها، از روی تجزیه و تحلیل تصاویر میکروسکپی پیشنهاد و اجرا گردید (۱۱). یک سال بعد Nusse و همکارانش، روش فلوسایتومتری را برای شمارش میکرونوکلئوس‌ها پیشنهاد نمودند (۱۲).

مواد و روش‌ها

۱۰ عدد موش از نژاد balb/c از مرکز پژوهش‌های خون وابسته به سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. سن موش‌ها دو ماه و وزن همه آنها بین ۲۳ تا ۲۵ گرم بود. برای تطبیق با شرایط آزمایشگاهی به مدت یک هفته تمام موش‌های مورد آزمایش، در شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفتند. هنگام آزمایش این حیوانات به دو گروه ۵ تایی کنترل و آزمون تقسیم شدند.

برای پرتو دهی به حیوان از مرکز رادیو تراپی بیمارستان امام خمینی استفاده گردید. دستگاه پرتو دهنده، چشمه گاما دهنده کبالت ۶۰ مدل Theratron 780 Medical AECL بود. با توجه به فاکتورهای فاصله حیوان تا چشمه پرتو زا، آهنگ دوز (dose rate) پرتو دهی ۱۴۵ rad/min تعیین گردید. پرتو دهی به مدت ۱/۰۶ دقیقه انجام شد و مقدار دوزی که گروه آزمایشی دریافت نمودند، ۱/۵ گری تعیین گردید. ۲۴ ساعت پس از پرتو دهی موش‌های هر دو گروه به روش جابجایی گردنی (cervical dislocation) کشته شدند. پس از آن استخوان فمور آنها خارج شده و از گوشت‌های اضافی کاملاً تمیز گردید.

دو سر استخوان فمور با قیچی قطع شده و ۲cc سرم جنین گوساله که از دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شده بود، از قسمت بالای استخوان به درون آن تزریق گردید. از قسمت

[Downloaded from militarymedj.ir on 2023-01-31]

زیرین استخوان، محتویات مغز استخوان آن استخراج گردید. به این ترتیب، سرم جنین گوساله از مغز استخوان جدا شد.

از مغز استخوان، اسمیرهای نازکی بر روی لام تهیه گردید. این لام‌ها در مجاورت هوا فیکس شده و پس از ۲۴ ساعت با مای-گرانوالد و گیمسا، رنگ آمیزی گردید و سپس با بزرگنمایی ۱۰۰ میکروسکپ چهار نوع سلول مغز استخوان مورد شمارش قرار گرفتند. دو نوع آنها عبارت بودند از پلی‌کروماتیک اریتروسیت (PCE) و نرموکروماتیک اریتروسیت (NCE). دو نوع سلول دیگر، در واقع از جنس سلول‌های قبلی بوده ولی محتوی میکرونوکلئوس‌ها و یا به اصطلاح خون شناسان، همان اجسام هاول-ژولی بوده‌اند.

حدود هزار سلول PCE مورد شمارش قرار گرفت و همراه با آن و در همان میدان‌های دید میکروسکپی mnNCE و mnPCE و NCE نیز شمارش گردید. شاخص‌هایی که برای ارزیابی تاثیر پرتوها مورد استفاده قرار گرفت عبارت بودند از :

۱- mnPCE/PCE ۲- mnNCE/NCE ۳- PCE/PCE+NCE

۴- mnPCE+mnNCE/PCE+NCE .

نتایج

شمارشهایی که از فاکتورهای چهارگانه در زمینه‌های مختلف میکروسکپی به عمل آمد برای گروه کنترل در جدول یک آمده است.

جدول ۱. درصد فاکتورهای چهار گانه مورد بررسی در گروه‌های کنترل و آزمایشی

Treatment	PCE/PCE+NCE	MnPNCE/PCE	MnNCE/NCE	MnPCE+mnNCE/PCE+NCE
Control	۵۳/۵۶±۱/۳۵	۱/۳۵±۰/۱۹	۱/۱۱±۰/۱۲	۱/۲۲±۰/۱۴
Irradiated	۵۰/۰۹±۱/۱	۴/۷۷±۰/۸۵	۴/۳۵±۰/۶۷	۴/۵۵±۰/۷۱

اطلاعات بدست آمده در گروه کنترل و آزمایشی با آزمون آماری Kruskal-Wallis مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتیجه این آزمون نشان داد که در نسبت PCE/PCE+NCE تفاوت معنی داری بین دو گروه آزمایشی و کنترل وجود ندارد. اما در مورد سایر فاکتورها تفاوت‌ها از نظر آماری معنی دار بوده است ($P<0.05$). لازم به ذکر است که کلیه داده‌های جدول به صورت درصد بیان شده است.

بحث

وقتی پرتو یونسازی مانند پرتو گاما وارد محیط بیولوژیک می‌گردد، با انتقال انرژی خود بر روی پیوندهای مولکول‌های بیولوژیک مانند DNA بطور مستقیم تاثیر گذاشته و باعث شکست آنها می‌گردد.

البته چنین شکست‌هایی با تأثیر غیر مستقیم پرتو گاما برمولکول‌های آب و ایجاد رادیکال‌های آزادی مانند H0 و OH^0 و HO_2^0 می‌گردد. این رادیکال‌ها باعث آسیب مولکول‌های DNA و پروتئین‌ها نیز ایجاد خواهد شد. شکست‌هایی که در سطح مولکول‌های DNA بوقوع می‌پیوندد، می‌تواند در یک زنجیره آن SSB (single strain breakage) و یا در هر دو زنجیره DSB (Double Strain Breakage) ایجاد نماید. اینگونه آسیب‌ها، در مرحله تقسیم میتوزی سلول، شکل شکست‌های کروموزمی را بخود می‌گیرد. هنگامی که دوک‌های سلولی به سانترومر کروموزم‌ها متصل شده و هر یک از آنها را از سلول‌های مادر، به سلول‌های دختری منتقل می‌کنند، تکه‌های کروموزمی شکسته شده ناشی از پرتوگیری با پرتو گاما همچنان در سلول مادر باقی می‌ماند.

در مورد سلول‌های سازنده RBC در مغز استخوان نیز چنین اتفاقی می‌افتد، یعنی پرتو گاما در رده‌های سلولی پیش‌ساز PCE شکست‌های کروموزمی را ایجاد نموده و این تکه‌های شکسته شده در PCE به صورت mnPCE ظهور می‌یابد. با پیشرفت مراحل بلوغ PCE به نوع هموگلوبین دار خود یعنی NCE ، این تکه‌های کروموزمی در مرحله خروج هسته از سیتوپلاسم سلول از آن خارج نمی‌شود و در سلول‌های NCE نیز خود را نشان می‌دهند که به شکل mnNCE ظهور می‌یابند.

در طرح تحقیقاتی انجام شده بخوبی تأثیر گذاری پرتو گاما، بر میزان افزایش میکرونوکلئوس‌ها، هم در مورد PCE و NCE بخوبی مشاهده گردید، بطوریکه افزایش چشمگیری در مقدار میکرونوکلئوس‌های گروه پرتو دیده نسبت به گروه کنترل ایجاد شده است. آزمایشات انجام شده در این طرح ثابت می‌کند که شمارش میکرونوکلئوس‌ها می‌تواند یک شاخص قابل قبول برای دوزیمتری بیولوژیکی پرتو گاما، در نظر گرفته شود و این موضوع با آزمایش‌هایی که Garriot. و همکارانش انجام داده‌اند، همخوانی دارد.

از آنجا که ایجاد شکست‌های کروموزمی در تمام سلول‌ها امکان وقوع دارد، بنابراین می‌توان انتظار داشت که میکرونوکلئوس‌ها در گونه‌های دیگر سلولی نیز بوقوع بپیوندد، بنابراین انجام آزمایشات مربوط به شمارش میکرونوکلئوس‌ها در گستره دوزهای وسیعتر مثلاً در دوزهای بین صفر تا ده گری و در گونه‌های دیگر مانند لنفوسیت‌ها نیز پیشنهاد می‌گردد.

از آنجا که شمارش میکرونوکلئوس‌ها به ازای ۱۰۰۰ تا ۱۵۰۰ سلول انجام می‌پذیرند، بنابراین کاری مشکل و زمانبر می‌باشد. روش‌هایی که بتواند امر شمارش و تمایز سلول‌ها را تسهیل کند، باعث تسریع آزمون میکرونوکلئوس می‌گردد. اگر چه Bocker [۱۱] با روش آنالیز تصویری در تمایز سلولی بین رده‌های

[Downloaded from militarymedj.ir on 2023-01-31]

مختلف سلولی حاوی میکرونوکلئوس و Nusse [۱۲] با روش فلوسایتومتری در تسریع شمارش سلولی گام‌های اساسی برداشته‌اند و با توجه به پیشرفت‌هایی که در تکنیک‌های شمارش سلولی در سال‌های اخیر بوجود آمده است، می‌توان طرح‌های تحقیقاتی که در زیست پرتوی بر مبنای شمارش میکرونوکلئوس انجام می‌پذیرد، با دقت و سرعت بیشتری به پیش برد.

References

1. Hewitt HB, and Wilson CW (1959). A survival curve in vivo. Nature; 183: 1060 - 1061.

2. Hill RP, and Bush RS (1969). A lung colony assay to detemine the radiosensitivity of the cells of a solid tumor. Int J Rad Biol; 15: 435- 444

3. Till JE, and Mcculloch EA (1960). The radiation on sensitivity of normal mouse bone marrow cells determined by quantitative marrow transplantation in irradiated mice, Rad Res Bull: 115-125.

4. Withers HR, and Elkind MM (1970). Microcolony survival assay for cells of mouse intestinal mucosa exposed to radiation. Int J Rad Biol; 17: 561-567.

5. Alpen EL, and Powers-Risius P (1981). The relative biological effect of high-z, high-LET charged particles for spermatogonial killing, Rad Res; 88: 132-143.

6. Withers HR (1967). The dose-survival relationship for irradiation of epithelial cells of mouse skin. British. J Radiol; 40: 187-194.

7. Rugh R (1964). Why radiobiology? Radiology; 82: 917-920.

8. Schmid.W (1971). The micronucleous test. Mutant Research; 12: 417- 425.

9. Heddle JA (1973). A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research ;18: 187-190.

10. Muller WU, and Streffer C (1994). Micronucleous assay, Mutation Research; 5: 1-33

11. Bocker W, Muller WU, and Streffer C (1995). Image processing algorithms for the automated micronucleous assay in binucleated human lymphocytes.Cytometery ;19: 283-293.

12. Nusse M, Kramer J, and Miller BM (1995). Measurment of micronuclei by flowcytometery. Methods in Cell Biology; 19: 149-158.

13. Alpen EL (1990). Radiation Biophysics. Prentice-Hall international editors. Chapter 6.

14. Garriot ML,Crowe DT (1983). AET reducesthe frequency of micronuclei in bone marrow cells of mice exposed to gamma radiation, Rdiation Research ;93: 200-204.

15. Muller WVM, and Nusse Streffer C (1996). A biological indicator of radiation damage. Mutation Research; 360: 163-169.

[Downloaded from militarymedj.ir on 2023-01-31]