نشریه علمی سازمان انرژی اتمی ایران
شماره ۱۳، صفحات ۶-۱، ۱۳۷۶.

بررسی میزان آسیب‌پذیری کروموزومی افراد پرتوکار در مقابل پرتوگیری بالاتر از حد مجاز در محیط فاقد موجود زنده با روش تراکم زودرس کروموزومهای سلولهای تک هسته‌ای خون

پروین زرساو[*]، عبدعلی ضیائی[**]*
مرکز تحقیقات هسته‌ای سازمان انرژی اتمی ایران[*]
مرکز بیوشیمی و بیوفیزیک دانشگاه تهران[**]

چکیده

به موجب مطالعات همه‌گیر شناختی انجام شده برروی بازماندگان بمباران اتمی هیروشیما کسانی که در معرض دزهای زیر ۰/۵ گری قرار داشته‌اند کمتر به سرطانهای ناشی از پرتومبتلا شده‌اند. لذا در این تحقیق با توجه به این امر و به نیت دستیابی به اثرات مفید احتمالی پرتوها با دز کم، مقاومت افرادی را که به اقتضای شغلشان در معرض پرتوهای با دز کم قرار دارند در مقابل شکستهای کروموزومی مورد مطالعه قرار داده‌ایم. بدین منظور تعداد ۲۰ نفر از شاغلین پرتوکار سازمان انرژی اتمی ایران را انتخاب کرده و با گروه شاهد از نظر شکستهای کروموزومی لنفوسیتی در محیط فاقد موجود زنده در معرض ۲/۷ گری پرتو گاما از یک چشمهٔ کبالت - ۶۰ قرار داده و با استفاده از روش تراکم زودرس کروموزومهای لنفوسیتی با هم مقایسه کرده‌ایم. نتایج حاصله دال بر عدم وجود اختلاف معنیدار بین گروه شاهد و موردنظر قبل از پرتودهی می باشد و این در حالیست که اختلاف بین دو گروه بعد از پرتودهی معنیدار ($t=۶/۲, p=۰/۰۰۰$) بوده، این نتایج حاکی از افزایش حساسیت در مقابل شکستهای کروموزومی در دز ۲/۷ گری در گروه پرتوکاران می باشد.

مقدمه

در محیطی که ما در آن زندگی می‌کنیم، عواملی بطور مستمر برروی مواد ژنتیکی ما اثر می‌گذارند. پرتوهای یونساز و فرابنفش موجود در نور خورشید و عوامل متعدد شیمیائی تغییراتی را در DNA سبب می‌شوند [۱] که اگر ترمیم نگردند، بازهای موجود در یک سلول متوسط انسان بالغ را تا حد ۱۰٪ تغییر خواهند داد [۲] و دراین شرایط ماقادر به ادامهٔ زندگی نخواهیم بود مگر اینکه مکانیزم بسیار موثر و حساسی برای مقابله با بروزاین تغییرات وجود داشته باشد [۳].

فرایندهای ترمیم DNA، پاسخهای سلولی است که به صورت بازسازی توالی نوکلئوتیدهای DNA پس از بروز تغییرات انجام می‌گیرد. ترمیم DNA را می‌توان تاحدودی به نوعی سیستم ایمنی در سطح DNA تشبیه کرد [۲]. این فرایند درست مانند سیستم ایمنی، بدن را در مقابل عوامل خارجی حفظ می‌کند. تشکیلات ترمیم DNA می تواند گونه‌های مختلف تخریب DNA را یافته و با روشهای گوناگون، برگشت به ساختمان اولیه آن را میسر سازد [۵]. در ضمن می‌توان به مثابه یک سیستم ایمنی، از تحریک یا تنظیم سیستم ترمیم DNA در راه درمان بیماریها سود جست [۳].

پرتوهای یونساز با تجمع انرژی روی مواد اثر می‌گذارند. پیامد این تجمع انرژی در سلول، فرایندی رادیوشیمیائی است که منجر به تغییر ساختمانی مولکول هدف (DNA) می‌گردد، که متعاقب آن سیستم آنزیمی ترمیم DNA، در فاصله زمانی از چند ثانیه تا چند روز شروع به فعالیت می‌کند [۵]. این فرایندهای فیزیکی، شیمیائی و زیست شناختی در نهایت تعیین‌کننده اثر

پرتو بر روی موجودات تک سلولی و پرسلولی می‌باشند.

مطالعات همه‌گیرشناختی بر روی بازماندگان بمباران اتمی هیروشیما و ناکازاکی نتایج ارزشمندی را درخصوص جهشها و سرطانهای ناشی از پرتوهای یونساز به دست داده‌اند [۴]. این نتایج بیانگر اثرات جهش‌زائی و سرطان‌زائی پرتوهای با دز بالاتر از ۰/۵ گری می‌باشند [۶]. علیرغم شواهدانکارناپذیری که در خصوص اثرهای سوء ناشی از دزهای بالا در دست است، بررسیهای انجام یافته نشان می‌دهند افرادی که تحت تاثیر دزهای زیر ۰/۵ گری قرار گرفته بودند، به گونه‌ای معنیدار کمتر به سرطانهای ناشی از پرتو، نظیر سرطانهای خون، ریه، سینه و روده بزرگ مبتلا شده‌اند [۴].

با توجه به شواهد فوق و به منظور مطالعهٔ اثرهای پرتو با دز کم، تحقیق حاضر به بررسی حساسیت افرادی که به صورت مستمر با پرتو با دز کم مواجه هستند در مقابل انحرافات کروموزومی در مقادیر بالاتر پرتو می‌پردازد.

لازم به تذکر است که روش اندازه‌گیری در این تحقیق ایجاد تراکم زودرس در کروموزومهای سلولهای تک هسته‌ای خون یا روش PCC (Prematur Chromosome Condensation) است که در سال ۱۳۶۸ در سازمان انرژی اتمی ایران برای اولین بار در ایران توسط همین گروه راه‌اندازی شد.

دلیل انتخاب روش PCC توانمندی بیشتر آن نسبت به روش متداول کشت سلول می‌باشد. مواردی که ذکر می‌شود بیانگر تفاوتهای مثبت روش مذکور است:

- سرعت دستیابی به کروموزومهای قابل مشاهده که نموداراختلاف بین روش کشت و PCC می تواند باشد حدود ۴۸ الی ۷۲ ساعت است.
- افزایش دقت و حساسیت اندازه‌گیری ، موجد توانائی بررسی کروموزومها در مراحل مختلف سیکل سلول (G_1, S, G_2). که از ویژگیهای منحصر بفرد روش مذکور است خواهد بود. این خصوصیات امکان تشخیص زودرس سرطان خون در اطفال و نیز پیگیری روند بهبودی پس از درمان را ممکن می‌سازد [۷، ۸، ۹]. مورد دیگر بررسی چگونگی ترمیم کروموزمها پس از تخریب می‌باشد.

روش

تعداد ۲۰ نفر از افراد پرتوکار شاغل در سازمان انرژی اتمی ایران به لحاظ متغیرهای سن، جنس و سابقهٔ کار، به شیوه نمونه‌گیری تصادفی انتخاب شدند. از آنجا که بررسی اثر پرتوگیری شغلی هدف اصلی این تحقیق را تشکیل می‌داد، لذا از میان کارکنان قسمت اداری افرادی که فاقد پرتوگیری شغلی و بدون سابقه پرتوگیریهای دیگر بودند به عنوان شاهد جهت مقایسه با گروه مورد نظر، به صورت یک به یک با توجه به متغیرهای سن، جنس و در ارتباط با نمونه‌های اصلی انتخاب شدند.

خون افراد در گروههای شاهد و مورد نظر در دو مرحله مورد بررسی قرار گرفت. در مرحلهٔ اول بررسی، شکستهای کروموزومی افراد در حالت عادی و در مرحلهٔ دوم بررسی، این شکستها پس از پرتوتابی به نمونه‌های خون خارج از بدن صورت گرفت.

لنفوسیتهای موجود در نمونه‌های خون پس از جداسازی، بوسیلهٔ چشمهٔ کبالت ۶۰ پس از دزیمتری و تثبیت شرایط جهت جذب پرتو در مقدار ثابت ۲/۷ گری در حرارت صفر درجه سانتیگراد، مورد تابش قرار گرفتند.

جهت بررسی شکستهای کروموزومی لنفوسیتها، حجم ۳ میلی‌لیتر خون سیاهرگی افراد بوسیلهٔ سرنگ آغشته به هپارین در هر مرحله از بررسی گرفته شد و با استفاده از روش تراکم زودرس کروموزومهای لنفوسیت مورد مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا لنفوسیتهای موجود در خون افراد بوسیلهٔ مادهٔ Ficol-Hypaque جدا شده، با سلولهای میتوزی (Chines Hamster Ovary-CHO) مخلوط و سپس

به کمک مادهٔ پلی اتیلن گلیکول با وزن مولکولی ۱۰۰۰ (Poly Ethylene Glycol ۱۰۰۰) فرایند الحاق سلولهای لنفوسیت با سلولهای میتوزی CHO انجام پذیرفت. پس از گذشت زمان ۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجهٔ سانتیگراد، آنزیمهای سلول میتوزی، سبب تراکم و قابل رؤیت کردن کروموزومهای لنفوسیت گردیدند، که بعد از مرحلهٔ برداشت و رنگ‌آمیزی کروموزومها با مادهٔ Gimsa با غلظت ۳٪ و به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از میکروسکوپ نوری، از نظر کمی مورد ارزیابی قرارگرفتند. (جهت کسب اطلاعات بیشتر در مورد روش PCC به منابع ۵ ، ۶، ۱۱ ، ۱۲ و ۱۳ مراجعه شود.)

یافته‌ها و بررسی‌آنها

تعداد ۲۰ الی ۱۰۰ PCC از هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت و میانگین تعداد کروماتین‌ها محاسبه گردید. جهت بررسی تعداد قطعات اضافه شده به علت پرتودهی، میانگین تعداد قطعات کروموزومی در حالت عادی از میانگین قطعات کروموزومی پرتو دیده کم شد. جدول شمارهٔ ۱ نمودار نتایج فوق می‌باشد.

جدول ۱: میانگین تعداد کروموزومهای لنفوسیت در حالت عادی و پرتو دیده در گروههای شاهد و موردنظر با توجه به سن (در هر دو گروه) و سابقهٔ کار (در گروه مورد نظر) و تفاضل تعداد کروموزومها قبل و بعد از پرتودهی در هردو گروه.

تفاضل گروه مورد نظر	تعدادکروموزوم پرتو دیده گروه موردنظر	تعدادکروموزوم درحالت عادی گروه مورد نظر	تفاضل گروه شاهد	تعدادکروموزوم پرتو دیده گروه شاهد	تعدادکروموزوم درحالت عادی گروه شاهد	سابقه‌کار گروه مورد نظر به سال	سن افراد در هر دو گروه به سال
۱۲	۵۸	۴۶	۹	۵۵	۴۶	۲۰	۵۳
۱۲	۵۹	۴۷	۹	۵۵	۴۶	۲۰	۵۳
۱۱	۵۷	۴۶	۸	۵۴	۴۶	۸	۴۷
۱۱	۵۹	۴۸	۸	۵۴	۴۶	۱۶	۴۷
۹	۵۵	۴۶	۸	۵۴	۴۶	۵	۴۴
۱۱	۵۷	۴۶	۸	۵۴	۴۶	۱۵	۴۳
۱۲	۵۸	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۱۵	۴۲
۱۱	۵۷	۴۶	۸	۵۴	۴۶	۱۵	۴۱
۱۲	۵۸	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۱۷	۴۱
۱۱	۵۷	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۱۶	۴۰
۱۱	۵۷	۴۶	۸	۵۴	۴۶	۱۵	۴۰
۹	۵۵	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۱۵	۴۰
۸	۵۴	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۶	۳۹
۹	۵۵	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۸	۳۷
۸	۵۴	۴۶	۷	۵۳	۴۶	۸	۳۷
۹	۵۵	۴۶	۵	۵۱	۴۶	۸	۳۷
۱۱	۵۸	۴۶	۶	۵۲	۴۶	۸	۳۵
۶	۵۲	۴۶	۶	۵۲	۴۶	۳	۳۴
۷	۵۳	۴۶	۶	۵۲	۴۶	۱/۲۵	۳۰
۵	۵۱	۴۶	۵	۵۱	۴۶	۴/۵	۲۴

با استفاده از آزمون آماری t-Test میانگین تعداد قطعات اضافه کروموزومی ناشی از پرتو در گروه شاهد و مورد نظر، قبل و بعد از پرتودهی مورد بررسی قرار گرفت. قبل از پرتودهی هیچ اختلاف معنیداری میان گروه شاهد ومورد نظر از نظر تعداد قطعات کروموزوم مشاهده نشد. در حالیکه بعد از پرتودهی اختلاف بین میانگین قطعات افزوده شده اختلاف معنیدار (t=۶/۲ p=۰/۰۰۰) وجود داشت. همبستگی میان سن و قطعات اضافه در گروه شاهد از طریق آزمون پیرسون مورد بررسی قرار گرفت که

بین سن و قطعات اضافه شده ارتباط وجود داشت (Pearson's R=۰/۸۲ P=۰/۰۰۰) این رابطه به صورت مستقیم می‌باشد.

بحث و نتیجه‌گیری

در رابطه با اثرهای مفید پرتوهای با دز کم، دریافتها و نظریات متناقضی در دست می‌باشد. برخی از مقالات اشاره به اثرهای مفید پرتو با دز کم، در رابطه با کاهش بروز برخی از بیماریها از جمله سرطان دارند [۴]. همانگونه که در بخش یافته‌ها اشاره شده هیچگونه اختلاف معنیداری در حالت طبیعی بین افراد پرتوکار با افراد عادی گروه شاهد موجود نیست. از آنجائی که رابطه بین شکستگی کروماتینها در روش PCC و دز پرتو، خطی می‌باشد [۶ ، ۱۰ ، ۱۲ و ۱۳]، بدیهی است که در افراد پرتوکار، شکستگی بیشتری نسبت به افراد عادی وجود داشته، که بعلت فعالیت سیستم ترمیم DNA، این شکستگیها ترمیم شده، و به حالت اولیه برگشته‌اند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که پرتو در این افراد سبب تحریک سیستم ترمیم DNA شده است. این تحریک را می‌توان با تحریک سیستم ایمنی مقایسه کرد [۴]. در این صورت شاید بتوان نظریاتی را که در رابطه با اثرات مفید پرتو در دست است توجیه نمود. ولی با افزایش دز بصورت in-Vitro به میزان ۲/۷ گری (این آزمایش بر روی چند نمونه با دزهای ۰/۵ و ۱ گری نیز انجام گرفت ولی اختلافی بین دو گروه مشاهده نشد به همین دلیل دز ۲/۷ گری انتخاب گردید)، اختلاف معنیداری بین قطعات افزودهٔ کروموزومی در هر دو گروه مورد نظر و شاهد دیده می‌شود که نشانگر حساسیت بیشتر افراد پرتوکار به این دز اضافی می‌باشد. این مورد ممکن است نظریهٔ مفید بودن پرتو با دز کم را زیر سئوال ببرد، زیرا علیرغم فقدان اختلاف در حالت طبیعی، عواملی سبب بروز اختلاف و تحریک پذیر شدن کروموزومهای افراد پرتوکار گردیده‌اند. از طرفی چون سیستم ترمیم DNA نسبت به توالی‌های حیاتی حساس می‌باشد [۳]. ممکن است نقاطی که در کروموزوم افراد پرتوکار شکننده ترند، از جمله توالی‌هائی باشند که سیستم ترمیم DNA روی آنها حساسیت فوق‌العاده‌ای نداشته و بعبارت دیگر برای ادامهٔ حیات سلول چندان مهم نمی‌باشند. که این نظر هم با تصادفی بودن نقاط شکست ناشی از پرتو منطبق نیست. چنین بنظر می‌رسد افرادی که در معرض تابش مستمر قرار می‌گیرند، ممکن است دامنه‌ای از تخریب داشته باشند که در شرایط عادی تبدیل به شکستگی نگردد ولی هنگامی که تحت تاثیر میزان پرتوهای بالاتری قرار می‌گیرند، این تخریبات بالقوه به شکل شکستگی ظاهر می‌شوند. لذا افرادی که در معرض تابش قرار نگیرند، چنین تخریباتی نیز در کروموزوم های آنها صورت نمی‌گیرد، بنابراین در پرتوگیری‌های بالاتر، تنها تجربیات جدید حاصله می‌توانند مورد شناسائی و جستجو قرار گیرند.

با توجه به نظرات مختلفی که در این موارد وجود دارد برای رسیدن به نتایج قاطع‌تر، انجام تحقیقات بیشتری مورد نیاز است. این پژوهشها، مطالعات همه‌گیرشناختی بر روی پرتوکاران، حیوانات آزمایشگاهی و تحقیقات سلولی و مولکولی را دربرمی‌گیرد. در این صورت ارتباط منطقی‌تری میان دز کم و احتمال بروز بیماریها با منشأ ژنتیکی را می‌توان پیدا کرد.

قدردانی و تشکر

ازهمکاران گرامی خانم فاطمه محمود خان و آقایان حسین حمزه‌ای و رضا کلهر که نهایت همکاری را در پیشبرد اجرای این بررسی داشته اند، قدردانی و تشکر می شود.

References

1 M.N. Conforth and J.S. Bedford "X-Ray Induced Breakage & Rejoining of Human Interphase Chromosome", Science, 222, 1141-1143 (1983).

2. V.A. Bohr, K.E. Evans, A. J. Fornance Jr. "DNA Repair & It's Pathogenic Implication" Lab. Invest. 61, 143-161 (1989).

3. C. Waldren "Measurement of Low Level X-Ray Mutagenesis in Relation to Human Disease" Proc. Nall. Acad. Sci. USA. 83, 4839-4843 (1986).

4. S. Kondo "Mutation & Cancer in Relation to the Atomic Bomb Radiation Effect" JPM. Y. Cancer Res. 79, 785-799 (1988).

5. Marlis Frankenberg-Schwager "Review or Repair Kinetics for D.N.A Damage Induced in Eukaryotic Cells In-Vitro by Ionizinng Radiation". Radiotherapy & Onco. 14, 307-320 (1989).

6. F. Darrudi "Premature Cromosome Condensation, a Novel Method for Biological Dosimetry", Int. Conf. on High Level Natural Radiation, Ramsar, Iran. 3-7 Nov. (1990), Editors, M. Sohrabi, J. U. Ahmed and S.A. Durrani IAEA Publication Serries (1993).

7. W. N. Hittelman "The Technique of Premature Chromosome Condensation to Study the Leukemic Process, "CRC Crit. Rev. Onc. Hemat. (6), 147-221 (1988).

8. W.N. Hittelman, L.C. Broussard. K. Meeredie " Premature Chromosome Condensation Study in Human Leukemia, L. L. Proliferate Potential Change after Induction Leukemia, Blood, 55, 457-465 (1980).

9. R. A. Macleod, F. G. Hill and M.R. Creasy Premature Chromosome Condensation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia", Genes Chrom Cancer. 1, 135-8, Nov. (1984).

10. H.D. Mallien and G.E. Pantelias. "Measuring Damage to Human Lymphocytes In-Vitro Low Level Exposure Using Premature Chromosome Condensation", Health Physics 51, PP. 672-676 (1986).

11. G. E. Pantelias and H.D. Mallie, "A Simple Method for Premature Chromosome Condensation Induction in Primary Human & Rodent Cells Using Polyethylene Glycol", Somat. Cell Genel. 9,533-547 (1983).

12. G. E. Pantelias and H. D. Mallie "Direct Analysis of Radiation-Induced Chromosome Fragments and ...", Mutation Res. 149, PP. 67-72 (1985).

13. G. E. Pantelias, and H. D. Mallie, The Use of Blood Mononuclear Cell Prematurely Condensed Chromosome for Bilogical Dosimetry", Radiation Res. 99, PP. 140-150 (1984).

AEOI Scientific Bulletin
No. 13, pp. 1-6, (1997)

CHROMOSOMAL ABERRATION STUDY OF RADIATION WORKER AFTER IN- VITRO EXPOSURE

P. Zarsav* and A. Ziaee**
Nuclear Research Centre*
Institute of Biochemistry and
Biophysics (I.B.B) University of Tehran**

Abstract

Epidemiological studies on A `- bomb survivals show that cancer incidence of the persons who were exposed to low level ionizing radiation (under 0.5 Gy) was lower than the control. As it was our intention to find the probable benefit effect of low level exposure, we present this study to recognize chromosomal aberration resistance effect of who were occupationally exposed to low level ionzing radiation. In this way, comparing with control group, 20 samples were selected among the AEOI workers who were involved with radiation. After in-vitro exposure of lymphocytes with extra dose (2.7 Gy γ - radiation emitted by C0-60), chromosome breakages were studied by means of premature chromosome condensation (PCC) technique. Using t-test, we didn't find any significant differences between PCCs, in case and control groups in pre-irradiated samples. However, a significant differences were found in post-irradiated ones ($t=6.02$, $P=0.000$) the results manifest that the case group is more sensetive to extra dose than the control.