

Determining Lymphocyte Radiosensitivity of Healthy Individuals and Prostate Cancer Patients Using Premature Chromosome Condensation

Farhad Golfam¹,
Bijan Hashemi²,
Abolghasem Haeri³,
Alireza Nikoofar⁴

¹ PhD Student in Medical Physics, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Associate Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³ Assistant Professor, Nuclear Science and Technology Research Institute, Tehran, Iran

⁴ Assistant Professor, Department of Radiation Oncology, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 11, 2016 ; Accepted July 5, 2016)

Abstract

Background and purpose: Cytogenetic tests are used to assess the individual's radiosensitivity and the potential to develop cancerous diseases. Our aim was to assess the radiosensitivity of patients with prostate cancer and healthy individuals based on Premature Chromosome Condensation (PCC).

Materials and methods: 3.5 ml blood was collected from peripheral veins of 10 healthy individuals and 10 patients with prostate cancer and put into 7 sterile microtubes. All samples, except the controls, were irradiated to 6MV beams of a Siemens LINAC at different doses (0.25, 0.5, 1, 2, 4 and 6 Gy). Chemical PCC test was performed on each sample and the prepared slides were scored. The Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA and Mann-Whitney statistical tests were used to compare the chromosomal aberrations resulted from different dose levels in each group (healthy/cancerous), and identical doses resulted from the two groups, respectively.

Results: There was a significant correlation between irradiation dose (for doses ≥ 0.5 Gy) and the rings in both of the healthy and prostate cancer patients indicating an increase in the number of rings with dose escalation ($P < 0.05$). Comparing healthy individuals and cancerous patients revealed no significant difference in their ring number at the same level of radiation doses ($P = 0.784$).

Conclusion: In theory, PCC test should be capable of determining more chromosomal aberrations than dicentric test, so, if the FISH test is used simultaneously, we might be able to score dicentrics and other fragments. By these, it may also be possible to better differentiate the radiosensitivity of healthy individuals and prostate cancer patients.

Keywords: Premature Chromosome Condensation, Radiosensitivity, Cytogenetic test, Dose-Response curve, Prostate cancer

تعیین حساسیت پرتویی لنفوسیت‌های افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان پروستات با استفاده از روش تراکم پیش رس کروموزومی

فرهاد گلفام^۱
بیژن هاشمی^۲
ابوالقاسم حائری^۳
علیرضا نیکوفر^۴

چکیده

سابقه و هدف: تست‌های سیتوژنتیک برای سنجش حساسیت پرتویی و ریسک ابتلا به سرطان به کار برده می‌شوند. هدف ما بررسی حساسیت پرتویی افراد سالم و بیماران مبتلا به سرطان پروستات با روش تراکم پیش رس کروموزومی (PCC) شیمیایی بوده است.

مواد و روش‌ها: از ۱۰ بیمار مبتلا به سرطان پروستات و ۱۰ فرد سالم، ۳/۵ میلی‌لیتر خون وریدی دریافت و در ۷ میکروتیوب استریل قرار داده شد. نمونه‌های دو گروه به جز شاهد با شتاب دهنده Siemens در انرژی ۶ MV دوزهای ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ گری دریافت کردند. برای هر نمونه تست PCC شیمیایی انجام و لام‌های حاصله شمارش شد. برای مقایسه میزان بیراهی ناشی از دوزهای مختلف در هر گروه و مقایسه بیراهی حاصل از دوزهای یکسان در دو گروه از تست‌های Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA و Mann-Whitney استفاده شد.

یافته‌ها: بین تعداد حلقه‌های ایجاد شده و دوز پرتو دهی ($\geq 0.5\text{Gy}$) ارتباط معنی‌داری در دو گروه سالم و مبتلا به سرطان بود که با افزایش دوز، حلقه‌ها افزایش می‌یافت ($p < 0.05$). مقایسه افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات در دوزهای یکسان اختلاف معنی‌داری در تعداد حلقه‌های حاصل نشان نداد ($p = 0.784$).

استنتاج: چون PCC شیمیایی به لحاظ نظری باید قابلیت تشخیص ناهنجاری‌های کروموزومی بیش‌تری را نسبت به آنالیز متافاز داشته باشد، در صورت استفاده هم‌زمان از تکنیک FISH، امکان شمارش هم‌زمان دی‌سانتیریک‌ها و قطعات دیگر فراهم می‌شود و ممکن است حساسیت پرتویی دو گروه مبتلا به سرطان پروستات و سالم از نظر میزان ناهنجاری‌های کروموزومی بهتر تفکیک گردد.

واژه‌های کلیدی: تراکم پیش رس کروموزومی، حساسیت پرتویی، تست سیتوژنتیک، منحنی دوز-پاسخ، پرتو دهی، سرطان پروستات

مقدمه

مسائل مختلفی بر روی ایجاد سرطان تاثیر می‌گذارند که از جمله مهم‌ترین آن‌ها ژنتیک و عوامل محیطی است. در واقع عوامل محیطی و یا هر عامل دیگری که بتواند باعث سرطان شود از طریق آسیب به ژنوم عمل می‌کند.

مؤلف مسئول: بیژن هاشمی - تهران: تقاطع بزرگراه جمران و آل احمد، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیک پزشکی، Email: bhashemi@modares.ac.ir

۱. دانشجوی دکتری فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲. دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳. استادیار، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی، تهران، ایران

۴. استادیار، گروه رادیوتراپی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۳/۲۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۳/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۱۵

بنابراین، بررسی ژنتیکی افراد می‌تواند تاثیر تمامی عوامل سرطان‌زا را به صورت یک‌جا به ما نشان دهد. یکی از راه‌های ارزیابی ژنتیکی افراد، بررسی کروموزوم‌های آن‌ها است و آزمایشات سیتوژنتیک این ارزیابی را به خوبی انجام می‌دهند. ارتباط بین ایجاد سرطان با ناهنجاری‌های کروموزومی (Chromosomal Aberration) اولین بار سال ۱۹۶۰ در مورد لوسمی میلوئید مزمن کشف شد (۱) که در این بیماری یک جابجایی متقابل بین کروموزوم‌های ۹ و ۲۲ به وجود می‌آید. کروموزوم‌ها به طور دائم در معرض عوامل آسیب‌رسان از جمله پرتوهای یونیزان هستند و به همین دلیل به طور مداوم دچار آسیب می‌گردند. اما، مکانیسم‌های ترمیم کروموزوم‌ها آن‌ها را به حالت اول باز می‌گردانند. همان‌طور که افراد در صفات مختلف تفاوت‌های بسیاری دارند، در ترمیم آسیب‌های ژنومی هم با هم متفاوتند. به این معنی که ممکن است در دو نفر یک آسیب مشخص در کروموزوم یکسانی از آن‌ها ایجاد شود، ولی ترمیم در آن‌ها یکسان نباشد. به عنوان مثال، در یک فرد ترمیم به‌طور کامل و صحیح انجام شود و در دیگری ترمیم اشتباه یا ناکامل انجام شود. با توجه به این‌که هرگونه تغییر محتویات ژنومی می‌تواند موجب اختلال در فعالیت‌های نرمال سلول و از جمله سرطان شود، بنابراین می‌توان انتظار داشت افرادی که توان ترمیم کم‌تری در محتویات ژنتیکی خود دارند، ریسک بیش‌تری برای ابتلا به سرطان داشته باشند. یکی از بهترین راه‌های آزمایش کروموزوم‌ها از لحاظ آسیب‌پذیری ژنتیکی تابش پرتوهای یونیزان به آن‌هاست که به آن رادیوسنسیتیویته^۱ یا حساسیت پرتویی گفته می‌شود. تست‌های سیتوژنتیک ابزاری برای نشان دادن آسیب‌های کروموزومی هستند. اولین مطالعات اپیدمیولوژیک برای بررسی امکان پیش‌بینی سرطان در افراد بر اساس فراوانی آسیب‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی انجام گرفت که شامل دو مطالعه cohort بود که تعدادی

افراد سالم تحت مطالعه قرار گرفتند و آسیب‌های کروموزومی آن‌ها ثبت شد (۴-۲). در سال‌های بعد پیگیری‌های انجام گرفته بر روی این افراد نشان داد که بین ریسک ابتلا به سرطان و میزان ناهنجاری‌های کروموزومی ارتباط وجود دارد (۵). در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ به چاپ رسید، Baeyens و همکارانش (۶) مشاهده کردند که درصد قابل توجهی از افراد مبتلا به سرطان پستان دارای حساسیت پرتویی بالاتری نسبت به افراد سالم بودند. آن‌ها از آزمایشات متافاز G_2 و میکرونوکلئ G_0 (LDR^1 و HDR^3) استفاده کردند. استفاده از LDR به این دلیل بود که به سلول‌ها زمان ترمیم بیش‌تری داده شود و بدین وسیله افراد حساس به پرتو راحت‌تر افتراق داده شوند. در سال ۲۰۰۴، Scott (۷) مقاله‌ای منتشر کرد و در آن ذکر نمود که ۴۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان پستان (۱۶۶ نفر)، در آزمایش G_2 حساسیت پرتویی بالاتر از افراد سالم داشتند (با در نظر گرفتن صدک ۹۰ افراد نرمال به عنوان مرز حساسیت پرتویی). آزمایشات دیگر Scott (۷) نتایج مشابهی در مبتلایان به سرطان‌های کولورکتال و سر و گردن و سرطان‌های کودکان به دست داد. این در حالی بود که بیماران مبتلا به سرطان‌های ریه و دهانه رحم حساسیت پرتویی بالاتر از افراد عادی را نشان ندادند. این نتایج در بیماران مبتلا به سرطان پستان و سر و گردن با آزمایش G_0 هم تایید شد. در تحقیقات Baria و همکاران (۸)، ۳۰ درصد از مبتلایان به سرطان کولورکتال حساس به پرتو بودند، در حالی که ۹ درصد از افراد شاهد، حساسیت پرتویی بالا داشتند. در آزمایش Howe و همکارانش (۹)، حدود ۷۰ درصد از بیماران مبتلا به سرطان پستان در تست G_2 حساسیت پرتویی نشان دادند که این رقم در افراد سالم حدود ۸ درصد بود. در سال ۱۹۹۸، Scott و همکارانش (۱۰) تحقیقی انجام دادند و لنفوسیت افراد سالم و مبتلا به سرطان پستان را با تست‌های MN و G_2

2. Low Dose Rate
3 High Dose Rate

1. Radiosensitivity

دیگری نیز نبودند. با توجه به تعدد دوزهای پرتودهی مورد نظر، تعداد بیماران ۱۰ نفر انتخاب شد. افراد شاهد نیز از مردان غیر سیگاری انتخاب شدند که میانگین سن آن‌ها ۵۷/۵ سال بود (۷۰-۵۷ سال و $SD=7$) و سابقه هیچ‌گونه سرطان، شیمی درمانی، رادیوتراپی، هورمون درمانی و پرتوگیری شغلی نداشتند. تعداد افراد سالم نیز ۱۰ نفر بود (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: مشخصات بیماران مبتلا به سرطان پروستات و شاهد

گروه	نمونه	سن	نمره گلیسون	PSA	مرحله بندی	
سالم	A	۵۱	-	۰/۵	-	
	B	۵۳	-	۰/۷	-	
	C	۶۰	-	۱/۲	-	
	D	۶۳	-	۰/۶	-	
	E	۶۷	-	۰/۷	-	
	H	۷۰	-	۲/۲	-	
	I	۵۳	-	۰/۲	-	
	J	۵۱	-	۰/۲	-	
	K	۵۲	-	۰/۵	-	
	T	۵۵	-	۰/۳	-	
	سرطان پروستات	F	۵۷	۳	۵/۳	۲
		G	۶۶	۵	۸/۷	۲
		L	۷۰	۶	۱۲	۲
		M	۶۴	۶	۶/۵	۲
N		۶۳	۴	۸	۲	
O		۶۴	۶	۵/۵	۲	
P	۷۰	۵	۷/۶	۲		
Q	۶۹	۵	۸/۴	۲		
R	۶۴	۴	۷	۲		
S	۷۰	۶	۹	۲		

پرتودهی و انجام تست PCC شیمیایی

از هر یک از بیماران و افراد سالم در آزمایشگاه بیمارستان پارس تهران، ۳/۵ میلی لیتر خون وریدی در لوله‌های استریل هپارینه گرفته شد و در ۷ لوله استریل هر یک به مقدار ۰/۵ سی سی تقسیم شد. این نمونه‌ها با یک شتاب‌دهنده Siemens با انرژی ۶MV تحت تابش قرار گرفتند تا به ترتیب دوز ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ گری دریافت نمایند و یک نمونه هم بدون پرتودهی و برای تعیین میزان حلقه‌های زمینه نگهداری شد. لوله‌ها در محفظه حمل مخصوص عایق حرارتی ظرف حداکثر نیم ساعت به آزمایشگاه سیتوژنتیک منتقل شده و هر یک از نمونه‌ها با ۴/۵ میلی لیتر RPMI-1640 به علاوه

آزمایش کردند و متوجه شدند که متوسط تعداد ریزهسته‌ها و آسیب‌های G_2 قبل از پرتودهی در دو گروه تفاوت معنی داری ندارد، اما متوسط ریزهسته‌ها و آسیب‌های G_2 ناشی از تابش در دو گروه متفاوت است. در صورتی که بتوان با ارزیابی‌های ژنتیکی از جمله تست‌های سیتوژنتیک احتمال بروز سرطان را در افراد پیش‌گویی کرد و یا به عبارت دیگر افرادی که استعداد بیش‌تری برای ایجاد سرطان دارند را مشخص نمود، آن‌گاه می‌توان با انجام تست‌ها و معاینات پزشکی ویژه در این افراد و تشخیص زود هنگام سرطان، امکان درمان را افزایش داد. نکته قابل‌تامل این است که تاکنون در مطالعه‌ای برای مقایسه افراد سالم و مبتلا به سرطان از تست PCC (Premature Chromosome Condensation) یا تراکم پیش‌رس کروموزومی استفاده نشده است که ممکن است به دلیل پیچیدگی‌های فنی و گرانی آزمایش باشد (۱۱). در این روش با اضافه کردن calyculin A به کشت لنفوسیت‌ها، کروموزوم‌های آن‌ها را در هر مرحله‌ای از چرخه سلولی که باشند، متراکم می‌نماییم و بنابراین انتظار داریم آسیب‌های کروموزومی بیش‌تری را در سلول مشاهده کنیم (۱۲، ۱۳). در این مطالعه تلاش کردیم میزان آسیب‌های کروموزومی افراد سالم و مبتلا به سرطان را در اثر تابش اشعه X و با استفاده از تست سیتوژنتیک PCC شیمیایی و به روش شمارش حلقه مقایسه نماییم.

مواد و روش‌ها

انتخاب بیماران و افراد شاهد

بیماران از افراد مبتلا به سرطان پروستات بر اساس نتیجه پاتولوژی پروستات انتخاب شدند که به تازگی بیماری آن‌ها در بیمارستان پارس تهران تشخیص داده شده بود. میانگین سن این افراد ۶۵/۷ سال بود (۵۱-۷۰ سال و $SD=4/2$). این افراد سابقه مصرف سیگار، شیمی درمانی، هورمون درمانی یا سابقه قبلی پرتوگیری شغلی و یا رادیوتراپی نداشتند و ضمناً دچار سرطان همزمان

منحنی‌های دوز- پاسخ بر اساس میزان بیراهی‌های کروموزومی حلقه‌های PCC برای نمونه‌های سالم و سرطانی در تصاویر شماره ۱ و ۲ نشان داده شده و نمودار هیستوگرامی مقایسه‌ای آن‌ها نیز در تصویر شماره ۳ آورده شده است. با استفاده از روش رگرسیون با کمک نرم‌افزار Excel منحنی برازش شده مطابق معادله خطی - درجه دو $Y = a + bD + cD^2$ با $R^2 = 0/999$ بر حسب‌گیری برای افراد سالم: $x^2 = 0/0008x + 0/0004$ و برای افراد مبتلا به سرطان: $y = 0/0046$ و برای افراد مبتلا به سرطان: $y = 0/0043x^2 + 4E - 05x + 0/0008$ به دست می‌آید.

جدول شماره ۴: تعداد حلقه‌های شمرده شده در افراد سالم و مبتلا به سرطان

گروه	نمونه	تعداد سلول‌ها	دوز (سانتی‌گری)							
			۶۰۰	۴۰۰	۲۰۰	۱۰۰	۵۰	۲۵		
سالم	A	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	B	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	C	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	D	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	E	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	H	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	I	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	J	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	K	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	T	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
سرطانی	F	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	G	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	M	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	N	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	O	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	P	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	L	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	R	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	Q	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰
	S	۲۰۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰	۰

جدول شماره ۳: خلاصه اطلاعات آماری حلقه‌های PCC افراد سالم

دوز (CGy)	تعداد کل حلقه‌ها	تعداد حلقه در سلول	Ring Range	SE	CL(95%)
۰	۰	۰	۰(-۰۰)	۰	۰
۲۵	۰	۰	۰(-۰۰)	۰	۰
۵۰	۰	۰	۰(-۰۰)	۰	۰
۱۰۰	۱۵	۰/۰۰۷۵	۰/۰۰۷۵ (۰/۰۰۵-۰/۰۱۵)	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۰۲۵
۲۰۰	۳۳	۰/۰۱۶۵	۰/۰۱۶۵ (۰/۰۱-۰/۰۲۵)	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۰۳۴
۴۰۰	۱۳۹	۰/۰۶۹۵	۰/۰۶۹۵ (۰/۰۵۵-۰/۰۸۵)	۰/۰۰۲۷	۰/۰۰۰۶۲
۶۰۰	۳۲۱	۰/۱۶۰۵	۰/۱۶۰۵ (۰/۱۵-۰/۱۸)	۰/۰۰۳۳	۰/۰۰۰۷۴

SE: Standard Error,
CL: Confidence Limit

۰/۶ میلی‌لیتر FCS, L-Glutamine و آنتی‌بیوتیک مخلوط شد و پس از افزودن ۱۰۰ μL فیتوهایماگلوتینین (PHA) به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵ درصد CO_2 و همراه رطوبت انکوبه گردیدند. ۴۶ ساعت پس از افزودن PHA، ۶۰ μL کلسمید برای نگهداشتن سلول‌ها در متافاز و در ساعت ۴۷، ۱۵ μL کالیکولین A به هریک از لوله‌ها اضافه شد. در ساعت ۴۸ پس از اضافه کردن PHA، سلول‌ها با دور ۱۸۰ برای مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی آن‌ها جدا شد. سپس ۰.۰۷۵M KCl (۳۷ درجه سانتی‌گراد) تا حجم ۶ سی‌سی به سلول‌ها اضافه شد (در این حالت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند) و دوباره با دور ۱۸۰g به مدت ۷ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از جداسازی مایع رویی، سلول‌ها با اضافه کردن فیکساتیو شامل متانول و استیک اسید تا حجم ۶ سی‌سی (به نسبت ۳ به ۱) مجدداً با همان دور و زمان سانتریفیوژ شدند. پس از آن سه بار دیگر سلول‌ها با فیکساتیو شستشو شدند و مایع رویی آن‌ها تخلیه شد. در نهایت سلول‌ها با استفاده از دستگاه متافاز spreader بر روی لام‌های تمیز چکانده شده و با رنگ گیمسای ۷ درصد به مدت ۱۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. لام‌ها با برس‌های اولیه کدگذاری شد تا به صورت blind شمارش شود.

یافته‌ها

نتیجه شمارش حلقه‌ها در ۲۰۰ لئوسیت در هر دوز اشعه، در افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات به طور جداگانه در جدول شماره ۲ آمده است.

فراوانی و توزیع حلقه‌های PCC در لئوسیت‌های پرتو دیده در دوزهای مختلف و در افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات شامل آنالیز میزان بیراهی‌های کروموزومی یا Yield (PCC Rings/Total Cells)، SE و متوسط تعداد حلقه‌ها در هر دوز در جداول شماره ۳ و ۴ آورده شده است.

جدول شماره ۴: خلاصه اطلاعات آماری حلقه های PCC بیماران

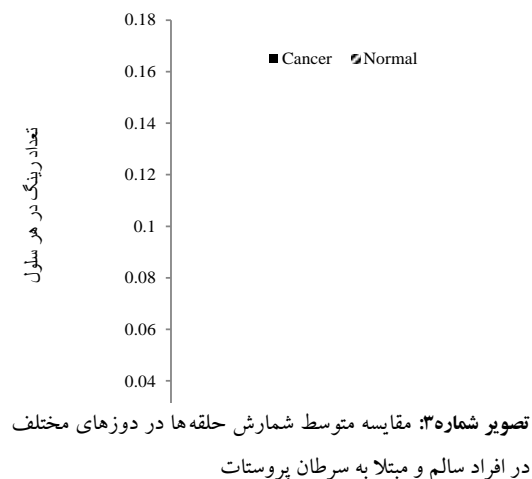
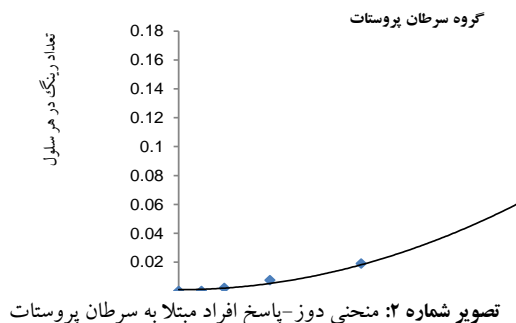
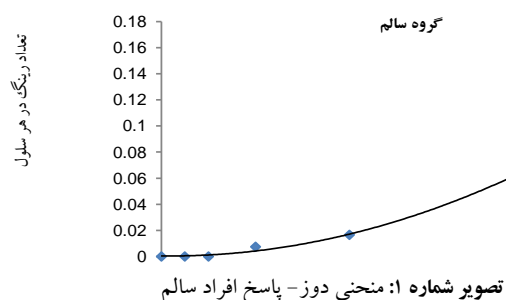
دوز (CGy)	تعداد کل حلقه ها	تعداد حلقه در سلول	Ring Range	SE	CL(95%)
۰	۰	۰	(۰-۰)	۰	۰
۲۵	۰	۰	(۰-۰)	۰	۰
۵۰	۴	۰/۰۰۲۰	(۰-۰/۰۰۵)	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۱۸
۱۰۰	۱۵	۰/۰۰۷۵	(۰/۰۰۵-۰/۰۰۱)	۰/۰۰۰۰۸	۰/۰۰۰۱۹
۲۰۰	۳۸	۰/۰۰۱۹۰	(۰/۰۰۱-۰/۰۰۳)	۰/۰۰۰۱۸	۰/۰۰۰۴۱
۴۰۰	۱۳۵	۰/۰۰۶۷۵	(۰/۰۰۵۵-۰/۰۰۸)	۰/۰۰۰۲۳	۰/۰۰۰۵۱
۶۰۰	۳۱۳	۰/۰۰۱۵۶۵	(۰/۰۱۴۵-۰/۰۱۸۵)	۰/۰۰۰۴۳	۰/۰۰۰۹۸

SE: Standard Error,
CL: Confidence Limit

برای مقایسه میزان پیراهنی‌های کروموزومی در دوزهای مختلف در افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات (به طور جداگانه) از تست Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA استفاده شد. برای دو حالت سالم و سرطانی مقدار p نزدیک به صفر به دست می‌آید که از ۰/۰۵ کوچک‌تر می‌باشد و نشان می‌دهد که اختلاف معنی‌داری بین دوزهای داده شده وجود دارد و گروه‌های مستقل از یکدیگر وجود دارند. تست Mann-Whitney بین تمامی دوزها در افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات (به طور جداگانه) اعمال گردید و مشخص شد که در دوزهای ۰/۵ تا ۶ گری بین کلیه دوزها اختلاف معنی‌دار وجود دارد. یعنی اثرات دوز برای ایجاد حلقه کاملاً مستقل از هم می‌باشد. تست مذکور برای مقایسه بین افراد سالم و مبتلا به سرطان در دوزهای یکسان نیز به کار برده شد که نشان داد اختلاف معنی‌دار بین افراد سالم و سرطانی در هیچ دوزی وجود ندارد.

بحث

میزان سرطان در دنیا رو به افزایش است و محققین در تلاش هستند تا با به دست آوردن ابزارهای تشخیصی و درمانی موثر، بتوانند با این بیماری مبارزه نمایند. برخی سرطان‌ها در صورتی که به موقع و در مراحل اولیه تشخیص داده شوند، قابلیت درمان قطعی دارند. بنابراین تشخیص زودرس این گونه سرطان‌ها نجات بخش جان بیماران خواهد بود. در حال حاضر پزشکان تلاش می‌کنند با انجام تست‌های غربالگری و معاینات بالینی، این گونه سرطان‌ها را در زودترین زمان ممکن تشخیص دهند. تست‌های سیتوژنتیک، برای کمک به پیدا کردن افراد مستعد سرطان به کار برده شده‌اند، تا بتوان با شناسایی این افراد و انجام تست‌های تخصصی‌تر و حساس‌تر تشخیص سرطان در مراحل اولیه برای آن‌ها را امکان پذیر نمود. در بسیاری از مطالعات انجام شده، بالاتر بودن حساسیت پرتویی افراد مبتلا به سرطان نسبت



به افراد سالم با تست‌های سیتوژنتیک میکرونوکلئی و آنالیز متافاز مشخص شده است. در این آزمایشات، پرتودهی یا در فاز G_0 چرخه سلولی انجام می‌شود یا در مرحله G_2 . در تست‌های فاز G_2 به دلیل آسیب‌پذیری بالای لنفوسیت‌ها به پرتوهای یونیزان، میزان پرتوتابی بسیار کم‌تر از تست‌های مرحله G_0 است. با دقت در مطالعاتی که نشان‌دهنده بالا بودن حساسیت پرتویی در افراد خانواده بیماران مبتلا به سرطان است، احتمال این فرضیه که خود سرطان ممکن است باعث بالا رفتن حساسیت پرتویی شود، بسیار کم می‌شود (۱۴،۷). هم‌چنین مطالعات آینده‌نگری که بر روی تعداد افراد زیاد انجام شده و بر اساس نتایج تست‌های سیتوژنتیک بروز سرطان بیش‌تر را در افراد با حساسیت پرتویی بالاتر در سال‌های آتی ثبت کرده‌اند، فرضیه مذکور را رد می‌کند (۱۵،۲).

پیش‌بینی می‌شود سرطان پروستات در آمریکا در سال ۲۰۱۶ بالاترین میزان بروز را در بین سرطان‌ها در مردان داشته باشد و دومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان مردان بعد از سرطان ریه باشد (۱۶). نکته قابل توجه این که با وجود آمار بالای ابتلا و مرگ و میر ناشی از سرطان پروستات، آزمایشات سیتوژنتیک زیادی برای بررسی تفاوت مبتلایان با افراد سالم انجام نشده است. لذا، تصمیم گرفته شد که این تحقیق بر روی افراد مبتلا به سرطان پروستات انجام شود. از طرفی در برخی تست‌های سیتوژنتیک، مانند میکرونوکلئی، میزان ریزهسته‌ها در زنان و مردان تفاوت دارد و بررسی سرطان پروستات که مختص مردان است، احتمال تفاوت‌های جنسیتی را نیز حذف می‌نماید. انتخاب افراد سالم و مبتلا به سرطان در محدوده سنی ۵۰ تا ۷۰ سال نیز به منظور به حداقل رساندن تاثیر سن بر آسیب‌های کروموزومی لحاظ شده است. در صورتی که بتوان معیار مناسبی برای تفکیک بیماران مبتلا به سرطان پروستات از افراد غیر مستعد تعریف نمود، با انجام تست‌ها و معاینات بیش‌تر برای افراد مستعد، می‌توان سرطان را در مراحل اولیه تشخیص و درمان قطعی نمود. تنها مطالعه سیتوژنتیک

برای مقایسه افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات در سال ۲۰۱۰ توسط Borgmann (۱۷) به عمل آمده است. در این مطالعه Borgmann متوجه شد که افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات در تست آنالیز متافاز و در فاز G_0 از لحاظ حساسیت پرتویی تفاوتی ندارند، اما در فاز G_2 این تفاوت ایجاد می‌شود. Borgmann با در نظر گرفتن این که مطالعات مشابهی در سرطان‌های دیگر در فاز G_0 ولی با روش میکرونوکلئی انجام گرفته و تفاوت افراد سالم و مبتلا به سرطان را نشان داده، نتیجه گرفت که ممکن است endpoint های تست آنالیز متافاز و میکرونوکلئی متفاوت باشند. هم‌چنین ممکن است که این endpoint ها در سرطان‌های مختلف با هم فرق داشته باشند. مطالعه حاضر به منظور بررسی حساسیت پرتویی افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات با روش PCC حلقه انجام شد تا مشخص شود آیا تعداد حلقه‌های ایجاد شده ناشی از پرتودهی در لنفوسیت‌های این دو گروه می‌تواند در تمایز این دو کمک کند؟ یا به عبارتی بررسی شود که آیا حلقه‌های تست PCC می‌تواند معرف endpoint های مربوط به سرطان پروستات باشد؟ نتایج حاصله نشان داد که در هیچ یک از دوزهای ۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ گری، اختلاف معنی‌داری بین حلقه‌های PCC افراد سالم و مبتلا به سرطان پروستات وجود ندارد. البته در هر گروه و بین دوزهای ۰/۵ تا ۶ گری اختلاف معنی‌دار به چشم می‌خورد. بنابراین در دوزهای زیر ۰/۵ گری تست PCC رینگ کارایی ندارد. به لحاظ تنوریک و با توجه به این که در تست PCC با اضافه کردن کالیکولین A، کروموزوم‌ها در هر مرحله‌ای فشرده شده و قابل مشاهده می‌شوند، انتظار داریم که بتوانیم ناهنجاری‌های کروموزومی بیش‌تری را نسبت به آنالیز متافاز مشاهده نماییم (۱۸). در صورت مشاهده ناهنجاری‌های بیش‌تر، احتمال تفکیک سلول‌های سرطانی از سالم هم به دلیل آسیب‌پذیری بیش‌تر سلول‌های سرطانی - قاعدتاً بیش‌تر می‌شود. عدم مشاهده اختلاف معنی‌دار بین سلول‌های سالم و سرطانی با شمارش

دیسانتریک‌ها و قطعات دیگر هم فراهم شود (۲۱-۱۹). در این صورت با شمردن تعداد قطعات، دیسانتریک‌ها، حلقه‌ها و ترکیب آن‌ها ممکن است به معیاری برای افتراق بیماران مبتلا به سرطان پروستات از افراد سالم دست یافت. هم‌چنین استفاده از تست میکرونوکلی می‌تواند مد نظر قرار گیرد.

حلقه‌ها، می‌تواند مطرح‌کننده همان نظر Borgmann (۱۷) باشد، مبنی بر اینکه endpoint های سلول‌های افراد مبتلا به سرطان پروستات خود را به صورت حلقه نشان نمی‌دهند. برای بررسی‌های بیش‌تر، می‌توان این تست را همراه با تست FISH (Fluorescence In situ Hybridization) تکرار نمود تا امکان شمارش

References

- Nowell PC, Hungerford DA. Chromosome studies in human leukemia. II. Chronic granulocytic leukemia. JNC J Caner Inst 1961; 27(5): 1013-1035.
- Hagmar L, Brøgger A, Hansteen I-L, Heim S, Högstedt B, Knudsen L, et al. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. Cancer Res 1994; 54(11): 2919-2922.
- Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá L, De Ferrari M, Degrossi F, et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. Cancer Genet Cytogenet 1995; 79(2): 133-135.
- Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brøgger A, Knudsen LE, Norppa H, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). Cancer Res 1998; 58(18): 4117-4121.
- Bonassi S, Hagmar L, Strömberg U, Montagud AH, Tinnerberg H, Forni A, et al. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. Cancer Res 2000; 60(6): 1619-1625.
- Baeyens A, Thierens H, Claes K, Poppe B, Messiaen L, De Ridder L, et al. Chromosomal radiosensitivity in breast cancer patients with a known or putative genetic predisposition. Br J Cancer 2002; 87(12): 1379-1385.
- Scott D. Chromosomal radiosensitivity and low penetrance predisposition to cancer. Cytogenet Genome Res 2004; 104(1-4): 365-370.
- Baria K, Warren C, Roberts SA, West CM, Scott D. Chromosomal radiosensitivity as a marker of predisposition to common cancers? Br J Cancer 2001; 84(7): 892-896.
- Howe OL, Daly PA, Seymour C, Ormiston W, Nolan C, Mothersill C. Elevated G₂ chromosomal radiosensitivity in Irish breast cancer patients: a comparison with other studies. Int J Radiat Biol 2005; 81(5): 373-378.
- Scott D, Barber JB, Levine EL, Burrill W, Roberts SA. Radiation-induced micronucleus induction in lymphocytes identifies a high frequency of radiosensitive cases among breast cancer patients: a test for predisposition? British Journal of Cancer 1998; 77(4): 614-20.
- Gotoh E. Drug-induced premature chromosome condensation (PCC) protocols: cytogenetic approaches in mitotic chromosome and interphase chromatin. Chapter 5. In Chromatin Protocols; Editor: Srikumar P. Chellapan. Springer 2015. p. 53-66.

12. González JE, Romero I, Gregoire E, Martin C, Lamadrid AI, Voisin P, et al. Biosimetry estimation using the ratio of the longest: shortest length in the premature chromosome condensation (PCC) method applying autocapture and automatic image analysis. *J Radiat Res* 2014; 55(5): 862-565.
13. Nairy RK, Yerol N, Bhat NN, Desai U, Shirsath K, Yadav U, et al. Estimation of high radiation dose during accidental exposure using Calyculin-an induced premature chromosome condensation assay. Proceedings of the International Conference on Radiation Biology: Frontiers in Radiobiology-Immunomodulation, Countermeasures and Therapeutics: Abstract Book, Souvenir and Scientific Programme (conference paper); November 2014.
14. Roberts SA, Spreadborough AR, Bulman B, Barber JB, Evans D, th G, et al. Heritability of cellular radiosensitivity: a marker of low-penetrance predisposition genes in breast cancer? *Am J Hum Genet* 1999; 65(3): 784-794.
15. Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, et al. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* 2008; 29(6): 1178-1183.
16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66(1): 7-30.
17. Borgmann K, Raabe A, Reuther S, Szymczak S, Schlomm T, Isbarn H, et al. The potential role of G₂-but not of G₀-radiosensitivity for predisposition of prostate cancer. *Radiother Oncol* 2010; 96(1): 19-24.
18. Sommer S, Buraczewska I, Sikorska K, Bartłomiejczyk T, Szumiel I, Kruszewski M. The rapid interphase chromosome assay (RICA) implementation: comparison with other PCC methods. *Nukleonika (The Journal of Instytut Chemii I Techniki Jadrowej)* 2015; 60(4): 933-941.
19. Karachristou I, Karakosta M, Pantelias A, Hatzi VI, Karaiskos P, Dimitriou P, et al. Triage biosimetry using centromeric/telomeric PNA probes and Giemsa staining to score dicentric or excess fragments in non-stimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 2015; 793:107-114.
20. Suto Y, Gotoh T, Noda T, Akiyama M, Owaki M, Darroudi F, et al. Assessing the applicability of FISH-based prematurely condensed dicentric chromosome assay in triage biosimetry. *Health Phys* 2015; 108(3): 371-376.
21. M'kacher R, El Maalouf E, Terzoudi G, Ricoul M, Heidingsfelder L, Karachristou I, et al. Detection and automated scoring of dicentric chromosomes in nonstimulated lymphocyte prematurely condensed chromosomes after telomere and centromere staining. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2015; 91(3): 640-649.