Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

ارزیابی آسیب‌های کروموزومی بیماران مبتلا به سرطان مری پیش و پس از رادیوتراپی با استفاده از روش آزمون میکرونوکلئی

ثریا امامقلی زاده مینایی[۱]
حسین مزدارانی[۲*]، سید محمود رضا آقامیری[۳]، مرتضی متذکر[۴]، محسن منصوری[۵]

۱- گروه رادیوبیولوژی و حفاظت پرتویی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.
۲- گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳- گروه فیزیک هسته‌ای، دانشکده مهندسی هسته‌ای، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران.
۴- گروه ویرولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران.
۵- گروه انکولوژی و پرتودرمانی، مرکز رادیوتراپی امید ارومیه، ارومیه، ایران.

*نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه جلال آل احمد، پل نصر، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی تلفن: ۰۲۱-۸۲۸۸۳۸۳۰
E-mail: mozdarah@modares.ac.ir

چکیده

دریافت: ۱۳۹۳/۰۱/۲۰ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۶/۳۰ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰

زمینه و هدف: رادیوتراپی به‌طور اجتناب‌ناپذیری با تابش‌گیری بافت‌های نرمال همراه است. پرتو یونساز می‌تواند منجر به ایجاد آسیب در DNA سلول سالم شده و در نتیجه آن بیماران متحمل عوارض زودرس و دیررس در طی درمان می‌شوند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تغییرات سیتوژنتیکی ایجاد شده در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان مری در طی رادیوتراپی بود.

روش بررسی: این نوع مطالعه تجربی- آزمایشگاهی و آینده‌نگر در مرکز رادیوتراپی امید شهرستان ارومیه از فروردین تا اسفند ۱۳۹۱ انجام شد. نمونه‌های خون محیطی از ۱۵ بیمار مبتلا به سرطان مری در طی سه مرحله قبل (۰ Gy)، وسط (۲۱/۶ Gy) و در انتهای (۴۳/۲ Gy) درمان رادیوتراپی جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌ها در محیط کشت کامل RPMI-1640 حاوی ۱٪ PHA کشت داده شده و در انکوباتور نگهداری شدند. سیتوکالازین- B با غلظت نهایی ۵ μg/ml به نمونه‌ها اضافه شد و در نهایت نمونه‌ها محصول‌برداری شده و برای هر نمونه لام مربوطه تهیه شد.

یافته‌ها: افراد مورد مطالعه شامل هشت بیمار زن و هفت بیمار مرد مبتلا به سرطان مری با میانگین سنی ۷۰/۰۷±۱۱/۵۴۸ بودند. مطالعه حاضر نشان داد که میانگین فراوانی میکرونوکلئی در وسط درمان در مقایسه با نمونه‌های پیش از درمان به‌طور قابل توجهی بالاتر بود (بیشتر از چهار برابر). همچنین بررسی نمونه‌های جمع‌آوری شده در انتهای درمان، افزایش در فراوانی میکرونوکلئی متناسب با افزایش مقدار دوز دریافتی از پرتوهای یونیزان نشان داد (P=۰/۰۰۱).

نتیجه‌گیری: افزایش در فراوانی میکرونوکلئی در مراحل دوم و سوم نمونه‌گیری در اثر عملکرد پرتوهای یونیزان است بنابراین استفاده از آزمون میکرونوکلئی در طی مراحل مختلف درمان جهت بررسی عوارض رادیوتراپی بسیار کمک کننده است.

کلمات کلیدی: نئوپلاسم مری، لنفوسیت‌ها، رادیوتراپی، میکرونوکلئی.

مقدمه

بیماری‌های نئوپلاسمیک یکی از شایعترین علل مرگ و میر در انسان‌ها است. سرطان مری به دلیل جایگاه مری و نزدیکی آن به ارگان‌های حیاتی، یکی از کشنده‌ترین سرطان‌ها است. این سرطان هشتمین سرطان رایج در جهان بوده ولی در عین حال ششمین رتبه در مرگ و میر ناشی از سرطان را به خود اختصاص داده است.[۱] سرطان مری بیشتر در آسیای مرکزی، شمال چین، حواشی دریای خزر در ایران، آفریقای شرقی و جنوبی، شمال فرانسه و انگلستان دیده می‌شود. جهت درمان سرطان مری از روش‌های مختلفی مانند

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

جراحی، رادیوتراپی، شیمی‌درمانی و انواع مختلف درمان‌های ترکیبی استفاده می‌کنند.[۱] در رادیوتراپی و شیمی‌درمانی هدف از درمان نابود کردن سلول‌های بدخیم است در حالی‌که سعی به حفظ سلول‌های نرمال دارد. مولکول هدف برای رخداد آثار بیولوژیکی تابش و داروهای ضد سرطان، DNA است.[۲و۳]

پرتوهای یونیزان از طریق ایجاد پارگی‌های تک‌رشته‌ای و دو رشته‌ای در مولکول DNA سلول‌های بدخیم، باعث ایجاد آسیب‌های کروموزومی ناپایدار و در نتیجه مرگ سلول‌های تومورال شده و به این ترتیب باعث از بین رفتن تومور می‌شود[۴] ولی در عین حال رادیوتراپی باعث ایجاد مشکلاتی نیز می‌شود، استفاده از پرتوهای یونساز در درمان سرطان به‌طور اجتناب‌ناپذیری با تابش‌گیری بافت‌های نرمال همراه است در نتیجه می‌تواند DNA سلول نرمال را هدف قرار داده و باعث ایجاد پارگی‌های تک رشته‌ای و دو رشته‌ای در DNA سلول نرمال شود که در صورت عدم ترمیم این آسیب‌ها، ناهنجاری‌های کروموزومی در سلول‌های نرمال حادث می‌شود که در نهایت می‌تواند باعث بروز اثرات حاد و مزمن و سرطان‌های ثانویه در بافت نرمال شود و در نتیجه آن، بیماران یکسری علایمی را در طی درمان و یا ماه‌ها و سال‌ها پس از درمان نشان می‌دهند.[۵-۷] بنابراین تکنیک‌هایی که بتوانند شدت آسیب در سلول‌های نرمال را در طی درمان ارزیابی کنند بسیار ارزشمند هستند.

در حال حاضر روش‌های متعددی جهت بررسی شدت آسیب در سلول‌های نرمال وجود دارد که در بین آن‌ها آزمون‌های سیتوژنتیکی کاربردی‌ترین روش‌ها است. از آنجا که مطالعات متعددی ثابت کرده‌اند که بین آسیب‌های کروموزومی و احتمال خطر ابتلا به سرطان ارتباط مستقیم وجود دارد،[۸و۹] از این روی روش‌های سیتوژنتیک می‌توانند به‌عنوان سنجش پیشگویی سرطان و سایر عوارض ایجاد شده در طی درمان مورد استفاده قرار گیرند.[۱۰و۱۱]

در مطالعه حاضر جهت بررسی شکست‌های کروموزومی در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران از روش آزمون میکرونوکلئی به دلیل سادگی روش، قابل اعتماد بودن نتایج آن، عدم نیاز به افراد بسیار ماهر جهت شمارش آن و به صرفه بودن از نظر اقتصادی استفاده شده است.[۱۲-۱۴] در این روش فراوانی میکرونوکلئی در اولین مرحله تقسیم سلولی پس از توقف در مرحله سیتوکینز چرخه سلولی ثبت می‌شود. میکرونوکلئی حاوی یک قطعه کروموزوم آسنتریک و یا کروموزوم کامل عقب‌مانده از میتوز است بنابراین آزمون میکرونوکلئی قادر است هر دو نوع آسیب عددی و ساختاری کروموزوم‌ها را بررسی کند.[۱۵و۱۶] هدف از مطالعه حاضر بررسی میزان آسیب‌های کروموزومی ایجاد شده در لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان مری در طی رادیوتراپی بود و همچنین از روش آزمون میکرونوکلئی به‌عنوان سنجش پیشگویی عوارض ایجاد شده در اثر رادیوتراپی و شناسایی افراد حساس به پرتو استفاده شد.

روش بررسی

در این پژوهش تجربی- آزمایشگاهی بر اساس مطالعات پیشین ۱۵ بیمار مبتلا به سرطان مری از فروردین تا اسفند ۱۳۹۱ که فقط به روش رادیوتراپی درمان می‌شدند شرکت کردند. نمونه‌های خون محیطی از بیماران مرکز رادیوتراپی امید در شهرستان ارومیه جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها با دریافت رضایت از بیماران تهیه شد و انجام پژوهش از سوی کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه مورد تایید قرار گرفت. جهت ارزیابی آسیب‌های سیتوژنتیکی از کلیه بیماران نمونه خون محیطی به میزان ۳ ml طی سه مرحله گرفته شد: پیش از شروع درمان (۰ Gy)، ۱۲ جلسه پس از شروع درمان (۲۱/۶ Gy) و ۲۴ جلسه پس از رادیوتراپی (۴۳/۲ Gy) (Gy واحد مقدار دوز پرتو دریافتی توسط بیماران است).

نمونه‌های خون داخل لوله‌های هپارینه به آزمایشگاه منتقل شدند و در اتاق کشت تحت شرایط استریل با کمک روش آزمون میکرونوکلئی کشت داده شدند. مقدار ۰/۵ ml خون کامل داخل لوله کشت حاوی ۴/۵ ml محیط کشت RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (شامل ال-گلوتامین و ۱۵٪ FBS) اضافه شد. لنفوسیت‌ها با فیتوهماگلوتینین ۱٪ (PHA) تحریک شده و سپس در داخل انکوباتور ۳۷ °C قرار داده شدند، ۴۴ ساعت بعد از شروع کشت، سیتوکالازین-B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) با غلظت نهایی ۵ µg/ml برای متوقف نمودن تقسیم سلول در مرحله سیتوکینز به محیط افزوده شد. ۲۸ ساعت پس از آن سلول‌ها از طریق سانتریفوژ با دور ۱۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه محصول‌برداری شدند. سلول‌ها در معرض شوک هیپوتونیک (۰/۰۷۵ M KCl) قرار گرفته سپس سانتریفوژ شده و در محلول ثابت کننده (متانول و اسید استیک

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

۱:۶) به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق تثبیت شدند. مرحله فیکساتیو دو بار دیگر تکرار شده و پس از آخرین سانتریفوژ، سلولها در حجم کمی از محلول ثابت‌کننده به حالت تعلیق درآمده و روی لام‌های میکروسکوپی کاملا تمیز پرتاب شدند. در نهایت لام‌ها با گیمسا ۱۰٪ به مدت ۲۰ دقیقه رنگ‌آمیزی و برای هر نمونه ۱۰۰۰ سلول لنفوسیتی دو هسته‌ای با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. در مطالعه حاضر جهت دقت بیشتر، برای هر نمونه کشت به صورت دوبل گذاشته شد.

آنالیز آماری: در هر یک از مراحل نمونه‌گیری، فراوانی میکرونوکلئی به ازای ۱۰۰۰ سلول لنفوسیتی دو هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. بررسی‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS ویراست ۱۶ صورت گرفت و نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2007 و SPSS ویراست ۱۶ رسم شد. برای نشان دادن وجود اختلاف معنادار در میانگین فراوانی میکرونوکلئی بین سه مرحله نمونه‌گیری از روش آزمون فریدمن استفاده شد. برای نشان دادن ارتباط بین فراوانی میکرونوکلئی و جنس و سن بیماران به ترتیب از روش Independent Two sample t-test و Correlation test using student's t-distribution استفاده گردید. P<۰/۰۵ سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

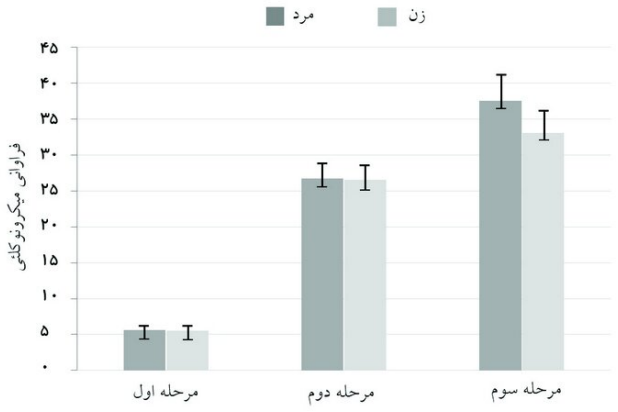
اطلاعات در مورد ویژگی‌های بیماران و فراوانی میکرونوکلئی آن‌ها در طی سه مرحله نمونه‌گیری ارایه شد (جدول ۱). افراد مورد مطالعه شامل هفت بیمار مرد و هشت بیمار زن بودند، با SD± میانگین سن ۱۱/۵۴۸±۷۰/۰۷. میانگین فراوانی نسبی میکرونوکلئی زمینه در مرحله پیش از درمان گروه رادیوتراپی تنها ۵/۳۱٪ و شدت آسیب بین ۲۵ تا ۱۰۲ میکرونوکلئی به ازاء هزار سلول لنفوسیتی دو هسته‌ای متغیر بود (۲۲/۲۵±۵/۳۱). در نمونه‌های جمع‌آوری شده در مرحله دوم پس از دریافت دوز ۲۱/۶Gy میانگین فراوانی میکرونوکلئی به ۶/۰۵±۲۶/۳۵٪ افزایش یافت که بیشتر از چهار برابر مرحله اول نمونه‌گیری بود.

جدول ۱: توزیع سن، جنس و درصد فراوانی آسیب میکرونوکلئی در بیماران مبتلا به سرطان مری در طی مراحل مختلف درمان

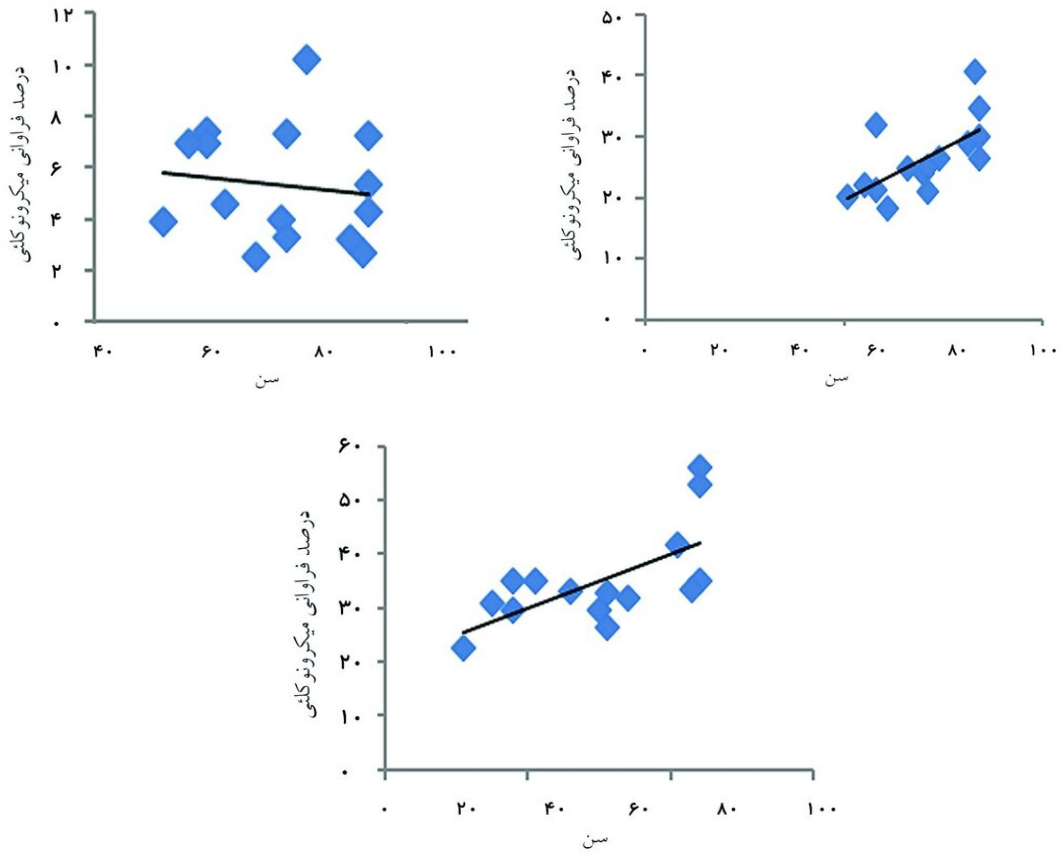
کد بیماران	جنس	سن	درصد فراوانی میکرونوکلئی		
			پیش از درمان	وسط درمان	پس از درمان
۰۱	مرد	۸۴	٪۵/۳۱	٪۳۴/۷	٪۵۶/۰۳
۰۲	مرد	۸۴	٪۷/۲	٪۲۶/۵۳	٪۳۵/۰۳
۰۳	مرد	۷۱	٪۷/۳	٪۲۰/۹	٪۲۶/۳
۰٤	زن	۷۰	٪۴	٪۲۳/۸۷	٪۲۹/۶۸
۰۵	مرد	۵۸	٪۷/۴	٪۳۲	٪۳۵/۰۳
۰٦	زن	۷۴	٪۱۰/۲	٪۲۶/۴۳	٪۳۱/۶۹
۰۷	زن	۵۸	٪۶/۹	٪۲۱/۳	٪۲۹/۵
۰۸	مرد	۶۱	٪۴/۵۸	٪۱۸/۲۵	٪۳۵/۰۳
۰۹	زن	۵۱	٪۳/۹	٪۲۰/۱	٪۲۲/۵
۰۱۰	مرد	۸۱	٪۳/۲	٪۲۸/۹	٪۴۱/۷
۰۱۱	زن	۷۱	٪۳/۳	٪۲۵	٪۳۲/۷
۰۱۲	مرد	۶۶	٪۲/۵	٪۲۴/۷	٪۳۳/۲
۰۱۳	زن	۸۴	٪۴/۳	٪۳۰	٪۵۲/۷
۰۱٤	زن	۸۳	٪۲/۷	٪۴۰/۵۷	٪۳۳/۵
۰۱۵	زن	۵۵	٪۶/۹	٪۲۱/۹۹	٪۳۰/۸۸
SD± میانگین		۱۱/۵۴۸±۷۰/۰۷	٪۲/۲۲±۵/۳۱	٪۶/۰۵±۲۶/۳۵	٪۸/۹۸±۳۵/۰۳

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

در مرحله سوم، ۲۴ جلسه پس از درمان افزایش مقدار دوز دریافتی منجر به افزایش میانگین فراوانی میکرونوکلئی به ۸/۹۸±۳۵/۰۳٪ گردید که بیشتر از شش برابر نمونه‌های مرحله اول بود (جدول ۱). افزایش میانگین فراوانی میکرونوکلئی همراه با افزایش مقدار دوز دریافتی در طی مراحل مختلف نمونه‌گیری به‌طور قابل توجهی از نظر آماری معنادار بود (P=۰/۰۰۱). در پژوهش حاضر در طی مراحل مختلف درمان اختلاف آماری معناداری بین زنان و مردان از نظر فراوانی میکرونوکلئی دیده نشد (در مرحله اول و دوم P=۰/۹ و در مرحله سوم P=۰/۰۸۱). بنابراین جنسیت بیماران هیچگونه تأثیری روی فراوانی میکرونوکلئی نداشت (نمودار ۱). در مورد اثر سن روی فراوانی میکرونوکلئی در مرحله پیش از شروع درمان (r=-۰/۱۳۵)



نمودار ۱: ارتباط بین فراوانی میکرونوکلئی و جنسیت بیماران مبتلا به سرطان مری در طی سه مرحله نمونه‌گیری



نمودار ۲: ارتباط بین فراوانی میکرونوکلئی و سن بیماران مبتلا به سرطان مری در طی سه مرحله نمونه‌گیری

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

اختلاف معناداری بین فراوانی میکرونوکلئی و سن بیماران وجود نداشت (P=۰/۶۳) ولی در مرحله دوم (r=۰/۶۵) و سوم نمونه‌گیری (r=۰/۶۵) مشاهده شد که همراه با افزایش سن بیماران، شدت آسیب نیز افزایش می‌یابد و ارتباط معناداری بین آن‌ها ملاحظه شد (P=۰/۰۰۹) (نمودار ۲).

بحث

بررسی فراوانی میکرونوکلئی زمینه در مطالعه حاضر در مرحله پیش از درمان نشان داد که بیماران مختلف دارای دامنه وسیعی از فراوانی میکرونوکلئی بودند (از ۲۵ تا ۱۰۲ آسیب به ازای هزار سلول لنفوسیتی دو هسته‌ای) این یافته با نتایج به‌دست آمده توسط پژوهشگران دیگر همخوانی داشت.

Kiltie، Jianlin، Jagetia، Banerjee و همکارانشان نشان دادند که افراد مختلف دارای آسیب‌های ژنتیکی متفاوتی هستند که بیانگر وجود اختلافات ژنتیکی بین افراد مختلف و حساسیت ذاتی متفاوت آنها است. اختلاف در فراوانی میکرونوکلئی در بیماران مختلف می‌تواند در اثر سبک زندگی (مصرف سیگار و الکل) و فاکتورهای بیولوژیکی ارثی باشد.[۵و۶و۱۶و۱۷]

بررسی نمونه‌ها در مرحله دوم نمونه‌گیری بیماران (پس از دریافت دوز ۲۱/۶ گری) افزایش قابل توجه در فراوانی میکرونوکلئی در مقایسه با مرحله اول نمونه‌گیری نشان داد (بیشتر از چهار برابر). افزایش در فراوانی میکرونوکلئی در اثر عملکرد پرتوهای یونیزان است. این یافته با مطالعات پیشین نیز همخوانی داشت، Wolff و همکاران و Gamulin در گزارشات خود نشان دادند که پس از دریافت پرتو شدت آسیب در بافت‌های نرمال افزایش می‌یابد.[۱۲و۱۸] Jagetia و همکاران بر اساس انجام آزمون میکرونوکلئی روی نمونه‌های خون جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به سرطان در وسط درمان رادیوتراپی نشان دادند که شدت آسیب در این مرحله به بیشتر از دو برابر مرحله قبل از درمان می‌رسد.[۱۶]

نمونه‌های جمع‌آوری شده در انتهای درمان پس از دریافت دوز ۴۳/۲ گری نیز افزایشی بیشتر از شش برابر در مقایسه با نمونه‌های مرحله اول نشان داد و این افزایش متناسب با افزایش دوز پرتوهای یونساز بود. در این مرحله مقدار دوز تجمعی دریافت شده در بافت‌های نرمال افزایش یافته در نتیجه شدت آسیب‌ها نیز در مقایسه با مرحله پیش از درمان و وسط درمان تشدید می‌یابد. این یافته با نتایج گزارشات دیگر که در شرایط‌های مختلف In vivo و In vitro انجام شده‌اند نیز در تطابق است.[۱۰و۱۲و۱۶و۱۸و۱۹]

در مورد اثر سن و جنس روی فراوانی میکرونوکلئی اختلاف نظر وجود دارد. تعدادی از پژوهشگران بیان کرده‌اند که فراوانی میکرونوکلئی در لنفوسیت‌های خون محیطی تحت تأثیر سن و جنس افراد قرار می‌گیرد[۲۰و۲۱] و بر عکس مطالعات دیگری نیز نشان دادند که سن و جنس هیچگونه تاثیری بر فراوانی میکرونوکلئی ندارد و فراوانی میکرونوکلئی مستقل از اثر سن و جنس است.[۱۰و۱۶و۲۲]

در مطالعه حاضر، بین زنان و مردان از نظر فراوانی میکرونوکلئی اختلاف آماری معناداری وجود نداشت که بیانگر عدم وجود ارتباط بین جنسیت و فراوانی میکرونوکلئی است. اما در مورد اثر سن، در مرحله دوم و سوم نمونه‌گیری همراه با افزایش سن بیماران، افزایش در فراوانی میکرونوکلئی مشاهده شد.

به طور خلاصه یافته‌ها نشان داد که در درمان رادیوتراپی بیماران مبتلا به سرطان به طور اجتناب‌ناپذیری بافت‌های نرمال نیز درگیر بوده و آسیب‌های کروموزومی در سلول‌های نرمال به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد که این می‌تواند منجر به بروز اثرات زودرس و دیررس در بافت‌های نرمال و سرطان‌های ثانویه شود، بنابراین استفاده از آزمون میکرونوکلئی در طی مراحل مختلف درمان جهت بررسی عوارض رادیوتراپی و تخمین مخاطرات ثانویه بسیار کمک کننده است. علاوه بر این مطالعه حاضر نشان داد که بیماران مختلف دارای حساسیت پرتویی متفاوتی می‌باشند از این روی پیش‌بینی حساسیت ذاتی بیماران مبتلا به سرطان نسبت به پرتوهای یونیزان دارای اهمیت کلینیکی ویژه است زیرا بیماران پس از قرار گرفتن در معرض تابش پرتوهای یونساز به هنگام پرتودرمانی واکنش‌های بیولوژیکی متفاوتی را نشان می‌دهند.

آزمون میکرونوکلئی می‌تواند به‌عنوان یک روش پیشگویی‌کننده جهت شناسایی افراد حساس به پرتو و تنظیم پروتکل درمانی بر اساس میزان حساسیت افراد مورد استفاده قرار گیرد.

سپاسگزاری: این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه تحت عنوان "بررسی شکست‌های کروموزومی لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان مری در دو نوع روش درمانی رادیوتراپی تنها و

کموراديا‌سيون بـا اسـتفاده از روش آزمـون ميكرونـوكلئي" در مقطـع كارشناسي ارشد در سال ۱۳۹۲ مي‌باشد كه با حمايت دانـشگاه علـوم پزشكي و خـدمات بهداشـتي درمـاني شـهيد بهـشتي تهـران و مركـز راديوتراپي اميد ارومیه اجرا شده است.

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

References

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
2. Sánchez-Suárez P, Ostrosky-Wegman P, Gallegos-Hernández F, Peñarroja-Flores R, Toledo-García J, Bravo JL, et al. DNA damage in peripheral blood lymphocytes in patients during combined chemotherapy for breast cancer. *Mutat Res* 2008;640(1-2):8-15.
3. Joiner M, van der Kogel A, editors. Basic Clinical Radiobiology. 4th ed. London, UK: Hodder Arnold; 2009. p. 246-58.
4. Rigaud O, Guedeney G, Duranton I, Leroy A, Doloy MT, Magdelenat H. Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. I. Chromosome aberrations induced in vivo. *Mutat Res* 1990;242(1):17-23.
5. Kiltie AE, Ryan AJ, Swindell R, Barber JB, West CM, Magee B, et al. A correlation between residual radiation-induced DNA double-strand breaks in cultured fibroblasts and late radiotherapy reactions in breast cancer patients. *Radiother Oncol* 1999;51(1):55-65.
6. Jianlin L, Jiliang H, Lifen J, Wei Z, Baohong W, Hongping D. Measuring the genetic damage in cancer patients during radiotherapy with three genetic end-points. *Mutagenesis* 2004;19(6):457-64.
7. Stone HB, Coleman CN, Anscher MS, McBride WH. Effects of radiation on normal tissue: consequences and mechanisms. *Lancet Oncol* 2003;4(9):529-36.
8. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983;221(4607):227-36.
9. 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. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res* 2000;60(6):1619-25.
10. Mozdarani H, Mansouri Z, Haeri SA. Cytogenetic radiosensitivity of g0-lymphocytes of breast and esophageal cancer patients as determined by micronucleus assay. *J Radiat Res* 2005;46(1):111-6.
11. Miller BM, Werner T, Weier HU, Nüsse M. Analysis of radiation-induced micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes. *Radiat Res* 1992;131(2):177-85.
12. Wolff HA, Hennies S, Herrmann MK, Rave-Fränk M, Eickelmann D, Virsik P, et al. Comparison of the micronucleus and chromosome aberration techniques for the documentation of cytogenetic damage in radiochemotherapy-treated patients with rectal cancer. *Strahlenther Onkol* 2011;187(1):52-8.
13. Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, Orsière T, Bonassi S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis. *Mutat Res* 2008;659(3):274-83.
14. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 2000;455(1-2):81-95.
15. Fenech M, Neville S. Conversion of excision-repairable DNA lesions to micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen* 1992;19(1):27-36.
16. Jagetia GC, Jayakrishnan A, Fernandes D, Vidyasagar MS. Evaluation of micronuclei frequency in the cultured peripheral blood lymphocytes of cancer patients before and after radiation treatment. *Mutat Res* 2001;491(1-2):9-16.
17. Banerjee B, Sharma S, Hegde S, Hande MP. Analysis of telomere damage by fluorescence in situ hybridisation on micronuclei in lymphocytes of breast carcinoma patients after radiotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2008;107(1):25-31.
18. Gamulin M, Garaj-Vrhovac V, Kopjar N. Evaluation of DNA damage in radiotherapy-treated cancer patients using the alkaline comet assay. *Coll Antropol* 2007;31(3):837-45.
19. Palyvoda O, Polańska J, Wygoda A, Rzeszowska-Wolny J. DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim Pol* 2003;50(1):181-90.
20. Baciuchka-Palmaro M, Orsière T, Duffaud F, Sari-Minodier I, Pompili J, Bellon L, et al. Acentromeric micronuclei are increased in peripheral blood lymphocytes of untreated cancer patients. *Mutat Res* 2002;520(1-2):189-98.
21. Fenech M, Morley AA. The effect of donor age on spontaneous and induced micronuclei. *Mutat Res* 1985;148(1-2):99-105.
22. Prosser JS, Moquet JE, Lloyd DC, Edwards AA. Radiation induction of micronuclei in human lymphocytes. *Mutat Res* 1988;199(1):37-45.

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2014; Vol. 72, No. 8: 533-539 Original Article

Downloaded from tumj.tums.ac.ir at 21:09 IRDT on Sunday May 19th 2019

Cytokinesis blocked micronucleus assay for evaluation of chromosomal breaks in esophageal cancer

Soraya Emamgholizadeh Minaei M.Sc.[1]
Hossein Mozdarani Ph.D.[2*]
Seyed Mahmoud Reza Aghamiri Ph.D.[3]
Morteza Motazakker Ph.D.[4]
Mohsen Mansouri M.D.[5]

1- Department of Radiobiology and Radiation Protection, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
2- Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3- Department of Nuclear Physics, Faculty of Nuclear Engineering, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.
4- Department of Clinical Virology, Faculty of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.
5- Department of Oncology and Radiotherapy, Omid Center, Urmia, Iran.

[*] Corresponding author: Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Jalal-e-Ale Ahmad Highway, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 82883830
E-mail: mozdarah@modares.ac.ir

Abstract

Received: 09 Apr. 2014 Accepted: 21 Sep. 2014 Available online: 11 Nov. 2014

***Background*:** Radiotherapy can cause DNA damage in normal cells, misrepaired or unrepaired double strand breaks in DNA lead to chromosomal breaks. As a result patient experience early and late effects in normal tissue during and after radiotherapy. Cytogenetic techniques can be used as a cancer predictive assay because there is an association between chromosome abnormalities and the risk of developing cancer. Also it can assess patient's complications during the therapy. The aim of the present study was evaluation of the cytogenetic alteration in peripheral blood lymphocytes of esophageal cancer patients treated with radiotherapy.

***Methods*:** The present study is an experimental and prospective research. It was done at radiotherapy department at Omid Center in Urmia from January to December 2012. Blood samples were obtained from 15 esophageal cancer patients, before (0 Gy), during (21.6 Gy), and after radiotherapy treatment (43.2 Gy). Blood samples were cultured in RPMI-1640 complete medium containing 1% phytohaemagglutinin and incubated in a CO_2 incubator. Cytochalasin-B was added to the cultures at a final concentration of 5 µg/ml. Finally, harvesting, slide making, and analysis were performed according to standard procedures.

***Results*:** This study consisted of 15 patients, including 7 men and 8 women from 55 to 84 years old (70.07±11.548). Results indicate that, in the middle of treatment the average frequency of micronuclei increased significantly compared with their concurrent pre-treatment samples (greater than four-fold). Also, an increase in chromosome damage (MN frequency) proportional increasing radiation doses at the end of treatment was observed (P=0.001).

Conclusion: Increasing in the MN frequency in the second and third stages is due to radiation effects. Thus, the use of the MN technique for assessing of the side effects in patients during the therapy is very helpful. Moreover, MN assay can be used as a predictive assay for detecting individuals (patient or healthy) with intrinsic radiosensitivity.

Keywords: esophageal neoplasms, lymphocytes, micronuclei, radiotherapy.