

حساسیت کروموزومی لنفوسیت‌های بیماران سرطان سر و گردن نسبت به تابش با اشعه گاما در محیط آزمایشگاهی توسط دو روش میکرونوکلوئوس و G2

چکیده

دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۷ ویرایش: ۱۳۹۵/۰۲/۱۸ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۲/۲۹ آنلاین: ۱۳۹۵/۰۲/۳۰

زمینه و هدف: بر اساس گزارشات، افزایش فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی در سلول‌های خون محیطی، نشانه‌ای از استعداد ژنتیکی افراد در ابتلا به سرطان می‌باشد. هدف از این مطالعه، بررسی فراوانی ضایعات کروموزومی لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن در مواجهه با تابش اشعه رادیوتراپی در محیط آزمایشگاهی در مقایسه با گروه افراد سالم بود.

روش بررسی: در یک مطالعه مورد-شاهدی، از اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۱ تا بهمن‌ماه ۱۳۹۳، لنفوسیت‌های خون محیطی ۱۰۱ نفر از بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن پیش از درمان رادیوتراپی و ۴۰ نفر از افراد گروه کنترل سالم با عدم ابتلا به هیچ‌گونه بیماری جسمی و روانی جمع‌آوری گردید. این افراد به درمانگاه رادیوتراپی انستیتو کانسر واقع در مجتمع بیمارستانی امام‌خمینی (ره) در تهران مراجعه نمودند. جهت بررسی ناهنجاری‌های کروموزومی، دو آزمون سنجش حساسیت کروموزومی، G2 و میکرونوکلوئوس به کار گرفته شد.

یافته‌ها: دو گروه مورد مطالعه از نظر شاخص‌های دموگرافیک همگون بوده و اختلاف آماری معناداری نداشتند. نتایج این بررسی نشان داد که در هر دو آزمون سنجش حساسیت کروموزومی، G2 و میکرونوکلوئوس، میانگین ضایعات کروموزومی بیماران بیشتر از این میانگین در گروه افراد سالم است ($P=0/001$ و $P=0/005$). ارتباط معناداری بین فراوانی ضایعات کروموزومی در بیماران و واکنش‌های بافتی زودرس و یا دیر هنگام در آن‌ها مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: از یافته‌های به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که حساسیت کروموزومی لنفوسیت‌های بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن نسبت به تابش اشعه گاما در محیط آزمایشگاهی از حساسیت کروموزومی به اشعه گاما در افراد سالم بیشتر است.

کلمات کلیدی: مطالعه مورد-شاهدی، ضایعات کروموزومی، لنفوسیت‌ها، رادیوتراپی.

فرشید فرهان^۱، سیروس عظیمی^۲
مجید محمودی^{۲*}، محمدعلی محقی^۲
فریده فرزانه^۲، اعظم نورمحمدی^۱
ملیحه خالقیان^۲، عباس جعفری^۲
مهرانگیز قائم‌مقامی^۱، کوروس دیوسالار^۳
۱- مرکز تحقیقات رادیوتراپی شیمی‌درمانی، انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۲- مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.
۳- مرکز تحقیقات علوم اعصاب، پژوهشگاه نوروفارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران.

* نویسنده مسئول: تهران، مرکز تحقیقات سرطان، انستیتو کانسر ایران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، بلوار کشاورز، مجتمع بیمارستانی امام‌خمینی (ره)، کدپستی: ۱۴۱۹۷۳۱۴۱
تلفن: ۶۱۱۹۲۰۱-۰۲۱
E-mail: dmahmoodi@razi.tums.ac.ir

مقدمه

از بیماران مبتلا به کارسینومای سلول‌های سنگفرشی سر و گردن، بیماری را بدون مواجهه با فاکتورهای ریسک نشان می‌دهند^۱ بنابراین استعداد ژنتیکی افراد را در ابتلا به این بیماری از فاکتورهای موثر بر شمرده شده است. افزایش ریسک سه تا چهار برابری کارسینومای سلول‌های سنگفرشی سر و گردن در خویشاوندان درجه اول بیماران مبتلا به سرطان سلول‌های سنگفرشی سر و گردن گزارش شده است.^{۲-۴} شواهد غیرمستقیم برای وجود فاکتورهای ژنتیکی مستعدکننده در ابتلا

کارسینومای سلول‌های سنگفرشی سر و گردن هفتمین نوع سرطان است که از نظر شیوع در تمام دنیا گزارش شده است.^۱ هر چند مصرف الکل و اعتیاد به سیگار و یا تباکو از عوامل موثر در ابتلا به این سرطان شناخته شده است،^۲ از طرفی به علت اینکه درصد زیادی از مصرف‌کنندگان دایمی سیگار به این نوع سرطان مبتلا نمی‌شوند، و برخی

جهت افراد گروه کنترل شامل عدم سابقه ابتلا به هر نوع سرطان، بیماری اتوایمون یا هر نوع بیماری عفونی و یا اثری در خود و یا افراد خانواده بود. این مطالعه توسط کمیته اخلاق پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران بررسی و تصویب شد. پس از دریافت رضایت‌نامه کتبی از بیماران و گروه افراد سالم از ۳ ml خون اهدایی هر یک، آزمایشات سیتوتونیک انجام گردید. نمونه‌های خون کدگذاری شد و اسلایدهای تهیه‌شده از هر نمونه خون مطابق همان کد مورد مشاهده و بررسی میکروسکوپی قرار گرفت.

آزمون G2 بر اساس روش شرح داده شده توسط Distel LV و همکارانش صورت گرفت.^{۱۲} به‌طور خلاصه، خون هپارینه پیش از کشت به مدت چهار ساعت در دمای اتاق نگهداری شد. برای هر نمونه، دو فلاسک کشت سلول (۲۵ cm²) به‌کار برده شد: یکی جهت پرتودهی و دیگری به‌عنوان کنترل (عدم پرتودهی). به هر فلاسک ۰/۵ ml نمونه خون تام و ۴/۵ ml محیط کشت RPMI-1640، که حاوی ۱۵٪ سرم جنین گاوی، ۱٪ L-گلوتامین، ۱۰۰ unit/ml پنی‌سیلین و ۱۰۰ µg/ml استرپتومایسین بود، اضافه گردید. تکثیر لنفوسیت‌ها توسط فیتوهماگلوئینین (PHA, Life Technologies GmbH, Germany) با غلظت نهایی ۰/۵٪ مخلوط محیط کشت و خون تام، صورت گرفت.

صد عدد متافاز با گسترش مناسب از هر نمونه (کنترل و پرتودهی‌شده) انتخاب و آنالیز شدند و از نظر تعداد ناهنجاری‌هایی همچون شکست‌ها و شکاف‌های کروماتیدی، شکست‌ها و شکاف‌های کروموزومی و تبادل کروماتیدی در صد عدد متافاز نمره‌دهی شدند و نتیجه نهایی از تفریق تعداد ناهنجاری‌ها در نمونه‌های کنترل از نمونه‌های پرتودهی شده به‌دست آمد. آزمون میکرونوکلوئوس بر اساس روش شرح داده شده انجام گردید.^{۱۳}

واکنش‌های بافتی در بیماران به دو گروه تقسیم‌بندی شدند. واکنش‌های بافتی حاد (Early) و دیر هنگام (Late). واکنش‌های بافتی زود هنگام شامل واکنش‌هایی است که در هنگام درمان رادیوتراپی و یا تا شش ماه اول از شروع رادیوتراپی ظاهر می‌شوند. واکنش‌های بافتی دیر هنگام از شش ماه پس از رادیوتراپی ظاهر می‌گردند. این واکنش‌ها ممکن است در مرحله ابتدایی به Erythema در پوست (پوست صورت و یا اطراف گردن) ظاهر شوند و یا ممکن است مخاط کف دهان، مری و یا غدد بزاقی را درگیر نمایند و باعث کاهش فعالیت

به سرطان سر و گردن نیز گزارش شده است.^۷ در بررسی سلول‌های خون محیطی و افزایش تعداد ناهنجاری‌های کروموزومی این سلول‌ها در مواجهه با اشعه رادیوتراپی، نتایج متفاوتی گزارش شده است. افزایش ضایعات کروموزومی سلول‌های خون محیطی به اشعه گاما همراه است با مستعد شدن فرد در ابتلا به یک نوع بدخیمی.^۸ علاوه بر این، آزمون‌های میکرونوکلوئوس و G2 به‌طور متداول برای بررسی آسیب‌های کروموزومی و پایداری ژنومی در جمعیت‌های انسانی استفاده می‌شود.^{۹،۱۰} آزمایش میکرونوکلوئوس، بررسی دقیق حذف و شکست کروموزومی را ممکن می‌سازد و بنابراین پژوهش‌گران از آن به‌عنوان یک روش مطلوب برای ارزیابی آسیب‌های کروموزومی استفاده می‌کنند.^{۱۱}

پژوهش کنونی با هدف بررسی حساسیت کروموزومی لنفوسیت‌های خون محیطی بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن در مواجهه با تابش پرتو گاما در محیط آزمایشگاهی در مقایسه با افراد سالم انجام شد.

روش بررسی

این بررسی به‌صورت یک مطالعه مورد-شاهدی بر روی نمونه‌های خون محیطی ۱۰۱ بیمار مبتلا به سرطان سر و گردن، مراجعه‌کننده به درمانگاه رادیوتراپی مرکز سرطان (انستیتو کانسر) واقع در مجتمع بیمارستانی امام‌خمینی (ره) وابسته به دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام گرفت. این بیماران جهت درمان تومور سر و گردن که بیشتر از نوع Squamous cell carcinoma که حلق و یا حنجره را درگیر نموده بود معرفی شدند. مطالعه مزبور به مدت ۳۴ ماه، از اردیبهشت‌ماه ۱۳۹۱ تا بهمن‌ماه ۱۳۹۳، به‌طول انجامید.

معیارهای بالینی ورود بیماران به این مطالعه عبارت بودند از: ابتلا به سرطان سر و گردن با تایید پاتولوژی، عدم ابتلا به اچ‌آی‌وی و یا سایر بیماری‌های عفونی، عدم ابتلا به بیماری‌های اتوایمون و یا بیماری‌های ارثی مانند دیابت. برای هر فرد مورد مطالعه در این پژوهش یک پرسش‌نامه و یک فرم رضایت‌نامه تکمیل شد. داده‌هایی مانند سن بیمار، میزان تحصیلات و مصرف دخانیات در پرسش‌نامه مربوط به بیمار جمع‌آوری شد. گروه کنترل هم متشکل از ۴۰ فرد سالم با عدم ابتلا به هیچ‌گونه بیماری جسمی و روانی بود که از مراجعه‌کنندگان به بیمارستان امام‌خمینی (ره) انتخاب شدند. معیارهای ورود به مطالعه

جدول ۱: میانگین تعداد هر یک از ناهنجاری‌های کروموزومی به ازای هر سلول (لنفوسیت خون محیطی) در اثر تحریک با تابش اشعه گاما در بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن در مقایسه با افراد سالم

ناهنجاری‌های کروموزومی	مبتلایان سرطان سر و گردن (n=۱۰۱)	گروه کنترل سالم (n=۴۰)	P
شکست کروماتیدی	۰/۰۹±۰/۱۶	۰/۰۳±۰/۱۳	۰/۰۰۳
شکست کروموزومی	۰/۰۴±۰/۱۱	۰/۰۲±۰/۰۷	۰/۰۰۱
مجموع صدمات کروموزومی	۰/۱۳±۰/۲۷	۰/۰۳±۰/۲۰	۰/۰۰۱
شکاف کروماتیدی	۰/۱۳±۰/۲۱	۰/۰۳±۰/۱۶	۰/۰۲
تعداد میکرونوکلوئوس	۰/۰۱۶±۰/۰۲۴	۰/۰۰۳±۰/۰۱۹	۰/۰۵
قطعات کروماتیدی	۰/۳۸±۰/۲۰	۰/۲۲±۰/۰۶	۰/۰۲
جابه‌جایی کروماتیدی	۰/۰۰۲±۰/۰۰۵	۰/۰۰۱±۰/۰۰۱	۰/۰۸

شکست کروماتیدی و کروموزومی، شکاف کروماتیدی و کروموزومی، قطعات کروماتیدی و پیدایش میکرونوکلوئوس در هسته سلول هر کدام در اثر ضایعه کروموزومی در سلول مشاهده می‌گردند. مقایسه بین دو گروه مورد و شاهد با استفاده از Independent Samples t-test انجام پذیرفت. سطح معناداری در این آزمون کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

و درجه واکنش‌های بافتی مشاهده نشد.

بحث

با توجه به اینکه بسیاری از بیماران مبتلا به کارسینومای سلول‌های سنگفرشی سر و گردن این بدخیمی را بدون مواجه با فاکتورهای ریسک نشان می‌دهند،^۳ بررسی تاثیر ژنتیکی افراد در ابتلا به این بیماری توجه برخی از پژوهش‌گران را به خود معطوف داشته است. Lisowska و همکارانش که شکست کروموزومی لنفوسیت‌ها را بدون تاثیر اشعه رادیوتراپی و یا در اثر برخورد با اشعه رادیوتراپی در ۳۸ بیمار مبتلا به سرطان حنجره در مقایسه با ۴۰ فرد سالم بررسی نمودند، چنین نتیجه گرفته که تعداد این ضایعات کروموزومی در بیماران بیشتر از گروه افراد سالم است و هیچ‌گونه وابستگی بین این ضایعات کروموزومی و واکنش‌های بافتی زودرس و یا مدت‌ها پس از درمان با اشعه رادیوتراپی در بیماران وجود ندارد. این یافته با نتایج پژوهش کنونی همخوانی دارد.^{۱۴}

همین‌طور پژوهش کنونی با مطالعه‌ای که توسط Brzozowska و همکارانش بر روی بیماران مبتلا به سرطان پروستات صورت گرفته

غدد بزاقی و در نتیجه خشکی دهان گردند و یا رشد قارچ در دهان گردند. در صورتی که بیمار هیچ‌گونه واکنش بافتی نداشت به صورت Grade 0 گزارش می‌شد. واکنش بافتی ضعیف به صورت Grade 1 گزارش شد. واکنش بافتی متوسط به صورت Grade 2 و واکنش بافتی شدید به صورت Grade 3 یا Grade 4 گزارش شدند.

آنالیز داده‌ها توسط SPSS software, version 16 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) صورت گرفت. میانگین همراه با انحراف معیار هر یک از این ناهنجاری‌ها در یک متافاز و یا در یک سلول محاسبه گردید. مقایسه بین گروه‌ها با استفاده از Student's t-test انجام پذیرفت. سطح معناداری در این آزمون کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

دو گروه مورد مطالعه از نظر شاخص‌های دموگرافیک همگون بوده و اختلاف آماری معناداری نداشتند. میانگین سنی بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن 56.35 ± 13.5 سال بود که بین سنین ۳۲ تا ۷۴ سال متغیر بود. ۶۲ نفر (۶۱/۴٪) نفر از این بیماران مرد و ۳۹ نفر (۳۸/۶٪) زن بودند. میانگین سنی افراد گروه کنترل هم 43.97 ± 9.1 سال بود که بین سنین ۲۷ تا ۶۷ سال متغیر بود. میانگین تعداد هر یک از ناهنجاری‌های بررسی‌شده مانند شکست‌های کروماتیدی (Chromatid breaks) و کروموزومی (Chromosome breaks)، مجموع صدمات کروموزومی (Chromosomal aberrations) بدون احتساب شکاف‌های کروماتیدی و کروموزومی (Chromosomal gaps) و تعداد میکرونوکلوئوس (Micronuclei) در هر سلول (متافاز) در لنفوسیت‌های خون محیطی ۱۰۱ نفر از بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن در مقایسه با ۴۰ نفر از افراد سالم در جدول ۱ نشان داده شده است.

این نتایج نشان می‌دهد که میانگین ناهنجاری‌هایی مانند تعداد شکست‌های کروماتیدی ($P=0/003$)، تعداد شکست‌های کروموزومی ($P=0/001$)، مجموع صدمات کروموزومی ($P=0/001$)، تعداد میکرونوکلوئوس ($P=0/005$)، تعداد شکاف‌های کروماتیدی ($P=0/02$)، تعداد قطعات کروماتیدی یا تعداد Fragments ($P=0/02$) در گروه بیماران مبتلا به سرطان سر و گردن در مقایسه با آن ناهنجاری در گروه افراد کنترل سالم به‌طور معناداری بیشتر است. در مجموع هیچ‌گونه وابستگی بین فراوانی ناهنجاری‌های کروموزومی

10. Rekhadevi PV, Sailaja N, Chandrasekhar M, Mahboob M, Rahman MF, Grover P. Genotoxicity assessment in oncology nurses handling anti-neoplastic drugs. *Mutagenesis* 2007;22(6):395-401.
11. Choudhury RC, Palo AK, Padhy A. Cytogenetic consequences of vinblastine treatment in mouse bone marrow. *Chemotherapy* 2004;50(4):171-7.
12. Distel LV, Neubauer S, Keller U, Sprung CN, Sauer R, Grabenbauer GG. Individual differences in chromosomal aberrations after in vitro irradiation of cells from healthy individuals, cancer and cancer susceptibility syndrome patients. *Radiother Oncol* 2006;81(3):257-63.
13. Minozzo R, Deimling LI, Gigante LP, Santos-Mello R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes of workers exposed to lead. *Mutat Res* 2004;565(1):53-60.
14. Lisowska H, Lankoff A, Wiczorek A, Florek A, Kuszewski T, Gózdź S, et al. Enhanced chromosomal radiosensitivity in peripheral blood lymphocytes of larynx cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;66(4):1245-52.
15. Brzozowska K, Pinkawa M, Eble MJ, Müller WU, Wojcik A, Kriehuber R, et al. In vivo versus in vitro individual radiosensitivity analysed in healthy donors and in prostate cancer patients with and without severe side effects after radiotherapy. *Int J Radiat Biol* 2012;88(5):405-13.
16. Székely G, Remenár É, Kásler M, Gundy S. Mutagen sensitivity of patients with cancer at different sites of the head and neck. *Mutagenesis* 2005;20(5):381-5.
17. Poggioli T, Sterpone S, Palma S, Cozzi R, Testa A. G0 and G2 chromosomal assays in the evaluation of radiosensitivity in a cohort of Italian breast cancer patients. *J Radiat Res* 2010;51(5):615-9.

Chromosomal radiosensitivity in lymphocytes of head and neck cancer patients as determined by micronucleus and G2 assays

Farshid Farhan M.D.¹
Cyrus Azimi Ph.D.²
Majid Mahmoodi Ph.D.^{2*}
Mohammad-Ali Mohagheghi M.D.²
Farideh Farzanfar M.Sc.²
Azam Noor-Mohammadi¹
Malihea Khaleghian Ph.D.²
Abbas Jafari M.Sc.²
Mehrangiz Ghaem-maghani M.Sc.¹
Kouros Divsalar M.Sc.³

1- Radiotherapy Oncology Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

2- Cancer Research Center, Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3- Neuroscience Research Center, Institute of Neuropharmacology, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.

* Corresponding author: Cancer Research Center, Cancer Institute, Keshavarz Blvd., Imam Khomeini Hospital, 14197-33141, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 61192501
E-mail: dmahmoodi@razi.tums.ac.ir

Abstract

Received: 08 Aug. 2015 Revised: 07 May 2016 Accepted: 18 May 2016 Available online: 19 May 2016

Background: It is reported that high frequency of chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes of individuals is a marker of cancer predisposition. The aim of this study was to investigate the *in vitro* frequency of chromosomal damage in lymphocytes of patients with head and neck cancer against gamma irradiation compared with those in healthy individuals.

Methods: In a case and control study, peripheral blood lymphocytes of 101 patients with head and neck cancer were collected before the onset of radiotherapy. Lymphocytes of 40 healthy individuals were also collected as controls. Head and neck cancer patients and the control group were consecutively recruited between April 2012 and February 2015 from Clinics of Cancer Institute, Imam Khomeini Hospital, Tehran, Iran. Lymphocytes of patients or control group were cultured and exposed to gamma radiation in G2- and G0-phase of the cell cycle. The induced chromosomal aberrations such as chromosome and chromatid breakages, chromosome and chromatid gaps, chromatid exchanges and micronuclei were scored in one-hundred metaphase cells of each individual. The mean of each chromosomal aberration was compared in patient and control groups. Early and late tissue reactions were scored during radiotherapy treatment or thereafter.

Results: There was no significant difference in demographic characterization between the two study groups. The frequency of radiation-induced G2 aberrations in lymphocytes of patients was significantly higher than in those of healthy donors ($P=0.001$ for chromosomal breaks). The frequency of radiation-induced micronuclei in G0 assay was also higher in patients than in those in controls ($P=0.05$). The results also indicate that there is no correlation between the two assays. No significant correlation was also observed between aberration frequencies in lymphocytes and the degree of both early and late normal tissue reactions.

Conclusion: The results indicate that the *in vitro* chromosomal radiosensitivity of peripheral blood lymphocytes of patients with head and neck cancer against gamma irradiation was significantly higher than that in healthy individuals.

Keywords: case-control studies, chromosome aberrations, lymphocytes, radiotherapy.