

## آزمون میکرونوکلئوس: روشی برای مانیتورینگ شکست‌های کروموزومی ناشی از تابش نوترون‌های سریع

علیرضا خوش‌بین خوش‌نظر\*، دکتر حسین مزدارانی\*\*

### چکیده

در این تحقیق حساسیت آزمون میکرونوکلئوس برای مانیتورینگ آثار کلاستوزنیک نوترون‌های سریع در دُزهای پائین مورد بررسی قرار گرفت. موش‌های سوری نر با سن ۱۲ هفته تحت تابش نوترون‌های سریع صادره از منبع آمرسیوم - برلیوم قرار گرفتند. دُزهای دریافتی،  $1/5 - 2/25 - 3/375 - 5/06$  سانتی‌گری بود. در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تابش دهی، موش‌ها به روش *Cervical dislocation* کشته شده و استخوان ران آن‌ها خارج گردید. با استفاده از سرم جنینی گوساله، مغزاستخوانشان خارج، و سوسپانسیون سلولی تهیه شده، به روش مای‌گرانوالدگیمسا رنگ‌آمیزی شد و مورد تحلیل میکروسکوپی قرار گرفت. برای هر نمونه، ۲۰۰۰ سلول پلی‌کروماتیک اریتروسیت (*PCE*) و به همین میزان، سلول نوروکروماتیک اریتروسیت (*NCE*) شمارش شدند و فراوانی میکرونوکلثی در سلول‌های *PCE* محاسبه شد. در این بررسی مشاهده شد با افزایش دُز تابشی، میزان سلول‌های *PCE* واجد میکرونوکلئوس افزایش یافته است. در زمان ۲۴ ساعت با افزایش دُز تابشی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از لحاظ بسامد در *MNPCE* به وجود آمد ( $Pvalue = 0.0003$ ) به طوری که بسامد *MNPCE* دُز  $5/06$  سانتی‌گری با گروه شاهد و گروه  $1/5$  سانتی‌گری دارای اختلاف معنی‌داری بود ( $P.value = 0.05$ ). نتیجه اصلی که از تحقیق گرفته شد آن بود که آزمون میکرونوکلئوس روشی کم هزینه و حساس برای مانیتورینگ آثار کلاستوزنیک پرتوهای *LET* بالا در دُزهای پایین می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: میکرونوکلئوس - آثار کلاستوزنیک - نوترون سریع

## مقدمه

می‌شوند. بنابراین این به راحتی این سلول‌های واجد میکرونوکلیئوس تشخیص داده می‌شوند (۳ و ۲).

از سوی دیگر افراد بسیاری به طور ناخواسته در معرض تابش پرتوهای نوترونی، مثلاً در راکتورها، قرار می‌گیرند. پرتوگیری شغلی در دُزها و تندی دُزهای پایین صورت می‌گیرد. بنابراین این اگر آزمون بتواند در این سطوح تابش‌گیری، بیانگر میزان ایمنی محیط باشد بسیار مناسب خواهد بود. ما در این تحقیق حساسیت این آزمون را برای مانیتورینگ آثار کلاستوزنیک نوترون‌های سریع به عنوان یک پرتو یونیزان با انتقال انرژی خطی<sup>۵</sup> (LET) بالا در دُزهای پائین به بوته آزمایش گذاشتیم.

## وسایل و روش‌ها

**حیوان:** در این تحقیق از تعداد ۴۵ سر موش سوری نر به سن ۱۲ هفته استفاده شد. موش‌ها از مؤسسه تحقیقاتی و واکنش و سرم‌سازی حصارک کرج خریداری شدند. موش‌ها در شرایط مناسب از لحاظ حرارت و نور نگهداری شدند و برای تغذیه آن‌ها از غذائی که در اکثر مراکز نگهداری موش استفاده می‌شود استفاده گردید.

**چشمه تابش:** چشمه نوترون مورد استفاده در اتاق کالیبراسیون و آزمایشگاه دُزیمتری نوترون و ذرات باردار امور حفاظت در برابر اشعه سازمان انرژی اتمی ایران از نوع آمرسیوم - برلیوم ( $Am - Be$ ) بود. تابش نوترون از این چشمه بر اساس واکنش هسته‌ای زیر صورت می‌گیرد:



آزمون میکرونوکلیئوس<sup>۱</sup> به عنوان روشی مطمئن و کارآمد برای غربالگری آثار جهش‌زاد<sup>۲</sup> مواد گوناگون شیمیائی و نیز تشعشعات مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش که در سال ۱۹۷۳ ارائه شد، نسبت به تحلیل کروموزوم‌های متافازی مغز استخوان دارای مزایای مهمی است (۱).

در روش آماده‌سازی و خواندن لام‌ها، این روش از تحلیل کروموزومی ساده‌تر است و این موجب کاهش دقت آزمون نمی‌گردد. آزمون میکرونوکلیئوس امروزه به عنوان یکی از شاخص‌های اصلی برای تأیید قابل استفاده بودن داروها و ترکیبات گوناگون در دستور کار شرکت‌های داروئی قرار گرفته است. اساس کار این روش بر این اصل استوار شده است که در مرحلهٔ آنافاز کروماتیدها، قطعات کروموزومی که به دلیل تابش‌گیری پرتوهای یونیزان یا مواد شیمیائی یا دلایل دیگر آسنتریک شده‌اند، جای می‌مانند و این در حالی است که کروموزوم‌های سنتریک به سمت قطبین دوک حرکت می‌کنند. پس از تلوفاز، کروموزوم‌های آسیب ندیده، همانند قطعات سنتریک، هسته‌های دختر معمولی به وجود می‌آورند. قطعات جامانده نیز در سلول‌های دختر وجود دارند ولی نسبت قابل توجهی از آن‌ها به شکل یک یا چند هسته ثانویه تغییر شکل می‌دهند که معمولاً میکرونوکلیئوس خوانده می‌شود. خوشبختانه قسمت عمده‌ای از میکرونوکلیئوس‌ها در نوعی از سلول‌های بدون هسته در مغز استخوان به نام‌های پلی‌کروماتیک اریتروسیت<sup>۳</sup> (PCE) و نوروکروماتیک اریتروسیت<sup>۴</sup> (NCE) که پیش‌سازهای سلول‌های قرمز خون هستند، ظاهر

1 - Micronucleus assay    2 - mutagenic

3 - Polychromatic erythrocyte

4 - Neurochromatic erythrocyte

5 - Linear Energy Transfer

سلول NCE شمرده و سلول‌های پللی کروماتیک اریتروسیت واجد میکرونوکلئوس<sup>۳</sup> MNPCE و سلول‌های نسوروکروماتیک اریتروسیت واجد میکرونوکلئوس<sup>۴</sup> MNNCE شناسائی شدند.

علت انتخاب دُزهای مذکور، آهنگ دُز پایین منبع تابشی ۰/۷۱۸ سانتی گری در ساعت بوده است که در فواصل زمانی طولانی تابش دهی، این دُزها به دست آمده‌اند. به عبارت دیگر، هر چند نتیجه‌گیری از روش میکرونوکلئوس با این دُزها، بر جذابیت آن می‌افزاید، محدودیت‌های اجرایی، ما را به این دُزها هدایت کرد.

#### یافته‌ها

تعداد ۴۵ سر موش سوری در ۵ گروه شاهد، ۱/۵، ۲/۲۵، ۳/۳۷۵، و ۵/۰۶ سانتی‌گری در ۳ زمان نمونه‌برداری ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت از نظر متغیرهای MNPCE و MNNCE مورد بررسی قرار گرفتند. نتایج در جدول (۱) آمده است.

چنانکه از جدول (۱) برمی‌آید با افزایش دُز تابشی، میزان MNPCE افزایش یافته است که البته در دُزهای ۳/۳۷۵ و ۵/۰۶ سانتی‌گری میزان MNPCE یکسان است. افزایش MNNCE به اندازه MNPCE کاسته شده است. در زمان ۲۴ ساعت با افزایش دُز تابشی اختلاف معنی‌داری بین گروه‌ها از لحاظ بسامد MNPCE به وجود آمده است ( $P = ۰/۰۰۰۳$ ) به طوری که بسامد MNPCE در دُز ۵/۰۶ سانتی‌گری با گروه شاهد و گروه ۱/۵ سانتی‌گری اختلاف

تابش دهی: با توجه به تابش یکنواخت نوترون‌های سریع در فضای استرادیان، حول منبع و ابعاد موش‌ها ظرفی به شکل حلقوی ساخته شد. فاصله دیوار داخلی آن از مرکز منبع ۳ سانتی‌متر و فاصله دیوار خارجی آن ۷ سانتی‌متر بود و فاصله مؤثر بدن حیوان تا مرکز منبع ۵ سانتی‌متر بود که در این فاصله تندی دُز ۰/۷۱۸ سانتی‌گری بر ساعت ( $\frac{cGy}{h}$ ) حاصل شد.

تهیه گستره مغزاستخوان: موش‌ها به فواصل ۲۴ - ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تابش‌گیری به روش cervical dislocation کشته شدند. بلافاصله هر دو استخوان ران آن‌ها خارج شدند. انتهای پروگزیمال ران به دقت توسط تیغ بیستوری کوتاه شد تا یک سوراخ کوچک منتهی به مجرای مغزاستخوان قابل رؤیت شود. حدود ۰/۲ میلی‌متر مکعب

سرم جنینی گوساله<sup>۱</sup> توسط یک سوزن شماره ۲۰ در انتهای دیستال استخوان به داخل مجرای مغزاستخوان هدایت گردید تا مغز استخوان به داخل لوله سانتریفوژ ریخته شود. پس از آن که سوسپانسیون سلولی یکنواخت تهیه شد، به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. از رسوب انتهای لوله سانتریفوژ گستره یکنواختی روی لام تهیه گردید. پس از ۲۴ ساعت با استفاده از رنگ‌آمیزی مای‌گرانوالد - گیمنسا<sup>۲</sup> لام‌ها رنگ‌آمیزی شدند.

تحلیل اسلاید: اسلایدها با بزرگ‌نمایی ۱۰۰ بررسی شدند. پخش سلول‌ها باید یکنواخت باشد طوری که سلول‌ها روی هم قرار نگیرند. بهترین تعریف برای شکل میکرونوکلئوس مشابهت کامل آن با هسته سلول است. به ازای هر حیوان ۲۰۰۰ سلول PCE و به همان تعداد،

1 - Fetal calf serum

2 - May Gruanwald Giemsa

3 - Micronucleated PCE

4 - Micronucleated NCE

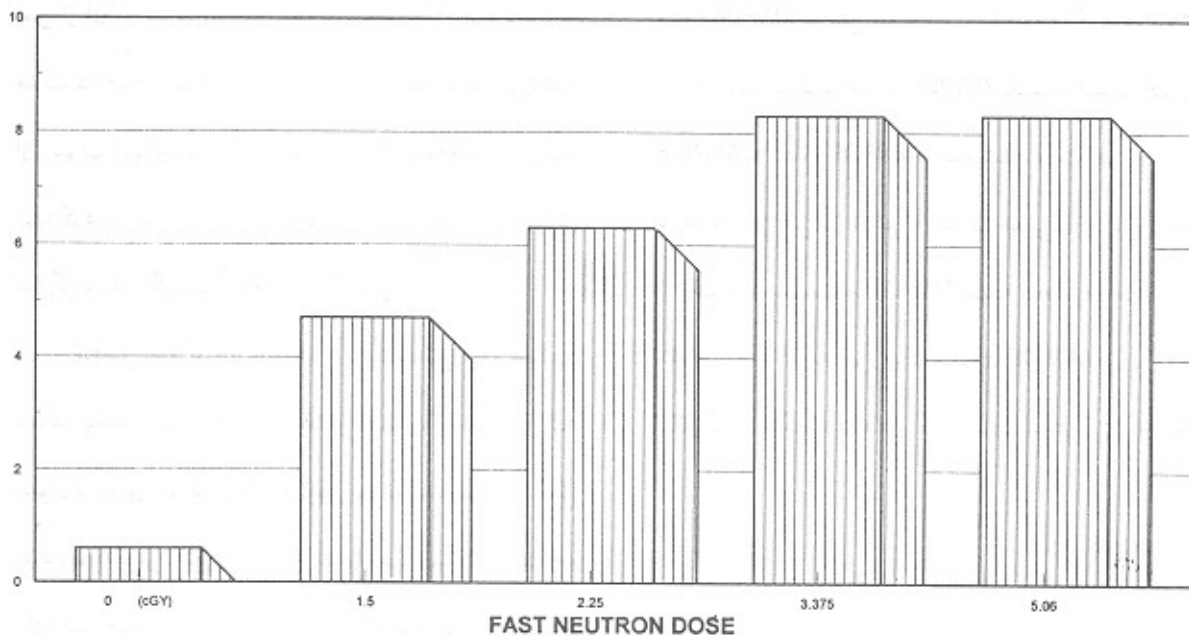
معنی‌دار نشان می‌دهد. ضریب همبستگی بین بسامد  $MNPCE$  و دُز در زمان ۲۴ ساعت برابر ۰/۸۲ (در سطح معنی‌دار ۰/۰۰۱) است و با افزایش زمان نمونه برداری از ضریب مذکور کاسته می‌شود.

معنی‌دار نشان می‌دهد ( $p < 0/05$ ). هم چنین گروه ۳/۳۷۵ سانتی‌گری با گروه شاهد و گروه ۱/۵ سانتی‌گری دارای اختلاف معنی‌دار است ( $p = 0/05$ ). بسامد  $MNPCE$  در گروه‌های ۲/۲۵ و ۱/۵ سانتی‌گری با گروه شاهد اختلاف

جدول (۱) تأثیر دُزهای مختلف نوترون سریع در ایجاد میکرونوکلئوس در زمان‌های مختلف در سلول‌های  $PCE$ ،  $NCE$  و اثر سمی آن‌ها بر سلول‌های مغزاستخوان

نسبت $PCE/PCE+NCE$	$MNPCE/2000PCE$	$MNPCE/2000PCE$	زمان (ساعت)	دُز (سانتی‌گری)
۰/۴۹۰۰ ± ۰/۰۰۸۰	۱/۰۰۰۰ ± ۰/۰۰۰۰	۰/۶۶۶۷ ± ۰/۶۷۸۲	۲۴	۰
۰/۴۹۹۳ ± ۰/۰۰۶۸	۱/۰۰۰۰ ± ۰/۵۷۷۳	۱/۰۰۰۰ ± ۰/۵۷۷۳	۴۸	—
۰/۵۱۳۳ ± ۰/۰۳۵۳	۰/۶۶۶۷ ± ۰/۳۳۳۳	۰/۶۶۶۷ ± ۰/۳۳۳۳	۷۲	—
۰/۵۱۳۳ ± ۰/۰۱۹۳	۲/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۴/۶۶۶۷ ± ۰/۶۶۶۶	۲۴	۱/۵
۰/۵۵۴۳ ± ۰/۰۳۶۳	۳/۰۰۰۰ ± ۰/۵۷۷۳	۳/۶۶۶۷ ± ۰/۳۳۳۳	۴۸	—
۰/۵۲۸۶ ± ۰/۰۳۵۶	۰/۶۶۶۷ ± ۰/۳۳۳۳	۱/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۷۲	—
۰/۵۰۸۰ ± ۰/۰۳۰۹	۳/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۶/۳۳۳۳ ± ۰/۸۸۱۹	۲۴	۲/۲۵
۰/۵۱۳۳ ± ۰/۰۳۳۵	۳/۰۰۰۰ ± ۱/۰۰۰۰	۵/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۴۸	—
۰/۵۶۷۳ ± ۰/۰۱۶۱	۱/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۱/۶۶۶۷ ± ۰/۳۳۳۳	۷۲	—
۰/۵۲۱۳ ± ۰/۰۳۰۶	۲/۰۰۰۰ ± ۰/۵۷۷۳	۸/۳۳۳۳ ± ۰/۸۸۱۹	۲۴	۳/۷۵
۰/۴۴۷۰ ± ۰/۰۵۱۵	۳/۰۰۰۰ ± ۰/۵۷۷۳	۳/۰۰۰۰ ± ۰/۵۷۷۳	۴۸	—
۰/۵۲۸۶ ± ۰/۰۲۹۰	۰/۵۷۷۴ ± ۰/۳۳۳۳	۱/۳۳۳۰ ± ۰/۳۳۳۳	۷۲	—
۰/۴۵۳۳ ± ۰/۰۱۲۲	۲/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۸/۳۳۳۳ ± ۰/۸۸۱۹	۲۴	۵/۰۶
۰/۴۵۷۳ ± ۰/۰۲۱۶	۱/۶۶۶۷ ± ۰/۸۸۰۸	۵/۰۰۰۰ ± ۱/۱۵۴۷	۴۸	—
۰/۵۸۳۳ ± ۰/۰۲۴۰	۰/۳۳۳۳ ± ۰/۳۳۳۳	۱/۳۳۳۳ ± ۰/۶۶۸۲	۷۲	—

FREQUENCY OF  $MNPCE/2000PCE$



نمودار (۱) تغییرات بسامد  $MNPCE/2000PCE$  نسبت به دُز در گروهی از موش‌ها که تنها تحت تابش نوترون بوده‌اند (۲۴ ساعت)

## بحث

نوترون‌ها و پرتوهای با LET بالا نسبت به تشعشعات یونیزان پراکنده (مثل اشعه X و گاما) دارای اثر زیست‌شناختی نسبی بالاتری هستند. RBE نوترون در محدوده تحقیقی ما حدود ۸ است. در این انرژی، بیشترین سهم در ایجاد دُز متعلق به پروتون‌های پس‌زده ناشی از برخورد نوترون با هیدروژن است و این پروتون‌های پس‌زده هستند که شروع به یونیزاسیون و برانگیختن مولکول‌های محیط اطراف خود و بالاخص آب می‌کنند. کارهای تحقیقی متعدد نشان دهنده کارایی بالا در ایجاد شکست رشته‌های دوگانه<sup>۱</sup> یا dsb در DNA توسط نوترون‌هاست (۴). اکنون معلوم شده است که مقدار آسیب‌های غیر قابل ترمیم، متعاقب تابش نوترون بیش از گاما است. در این تحقیق مشاهده شد که بسامد MNPCE در دُز ۱/۵ سانتی‌گری با گروه شاهد با حدود اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی‌دار داشته است. هم چنین رابطه قابل توجهی بین بسامد MNPCE و دُز تابشی مشاهده گردید به طوری که ضریب همبستگی آن‌ها معادل ۰/۸۲ بود. در کار تحقیقی ورال و همکارانش که در شرایط این‌وایترو (*invitro*) نمونه‌های خونی تحت تابش قرار داده شدند کارایی بالاتر نوترون‌های سریع در بروز میکرونوکلئوی نسبت به پرتوهای گاما گزارش و تأیید گردید (۶). کاهش رابطه خطی بین بسامد MNPCE و دُز تابشی که با افزایش زمان نمونه‌برداری تشدید شده است را می‌توان مربوط دانست. از سوی دیگر همان طور که پیش‌بینی می‌شد و در کارهای دیگر گزارش شده بود با افزایش زمان نمونه‌برداری از بسامد PCE کاسته شد. این به دلیل روند طبیعی تبدیل سلول‌های PCE به NCE

و در جریان خون قرار گرفتن سلول‌های مزبور است.

از تحقیق حاضر سه نتیجه کلی می‌توان گرفت:

اول آنکه آزمون میکرونوکلئوس روش کم هزینه و حساسی برای مانیتورینگ آثار کلاستوژنیک پرتوهای LET بالا در دُز پائین است.

دوم آنکه نوترون نسبت به پرتوهای گاما برای ایجاد میکرونوکلئوس از کارایی بالاتری برخوردار است و به طور غیرمستقیم dsb بیشتری ایجاد می‌کند (۵) و بالاخره سوم آنکه رابطه خطی معناداری بین بروز میکرونوکلئوس و دُز تابشی نوترون وجود دارد.

لازم به تذکر است از آنجا که بسامد سلول‌های پلی‌کروماتیک اریتروسیت و نوروکروماتیک اریتروسیت واجد میکرونوکلئوی، در زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، به دلیل در جریان خون قرار گرفتن، به خصوص با این تعداد کم میکرونوکلئوس، بسیار کاهش یافته بود، بنابراین داده‌های تطبیقی مربوط به زمان‌های ۴۸ و ۷۲ ساعت، در این مقاله برای خوانندگان محترم عرضه نشده است.

## منابع

- 1-Schmid W. The micronucleus test. Mut Res 1975; 9-5.
- 2-Lededur MV, Schmid W. The micronucleus test: methodological aspects. Mut Res 1973; 19:109-117.

- 3-Heddle JA, Hayashi M, Romanga, et al. A micronucleus as index of cytogenetic damage: past, present and future enviromental and molecular mutagenesis 1991; 18: 277-291
- 4- Furuno L., Yada T, Matsudaira H, Maruyama T. Induction and repair of DNA strand breaks in culture of mammalian cells following fast neutron irradiation. Int J Radiat Biol 1979; 36(6) : 9639-48
- 5- Mozdarani H , Gharbali A. A radioactive effects of cimetidine in mouse bone marrow cells exposed to gamma rays as assayed by the mironucleus test Int Jradiat Biol 1993; 64: 189-194
- 6- Verhogen V, Thierens F, Ridder LD. Micronuclei induced by fast neutrons versus  $^{60}\text{Co}$  gamma - rays in human peripheral blood lymphocytes. Int J Radiat Biol 1994; 65(3): 321-328