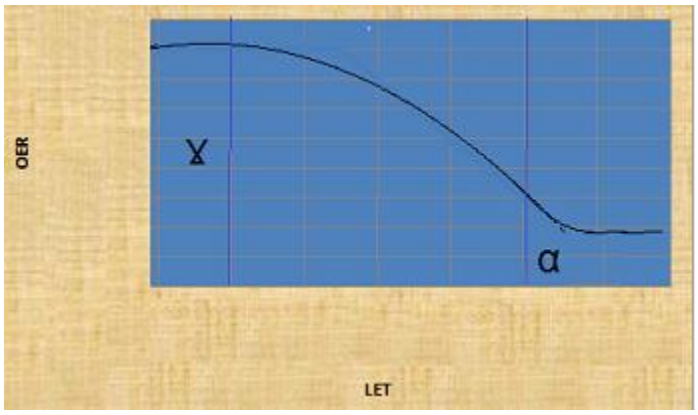
جلسه هشتم

دانشجویان رادیولوژی ورودی ۸۹
دانشگاه علوم پزشکی تهران

نمودار روبرو نقش LET در برابر اکسیژن را نشان میدهد.با افزایش OER،LET کاهش می یابد.اگر نوع انرژی جزو انرژی هایی باشد که تاثیر صدمه بالایی داشته باشد،LET افزایش می یابد.



نکته جدی در بحث درمان بحث دوز است.هرقدر دوز را کنترل شده تر و با مقدار کمتری بدهیم،میزان آسیب به بافتهای نرمال کمتر میشود و میتوان درمان را موفق در نظر گرفت.در درمان هم باید به تومور توجه داشت و هم عوارض جانبی را کنترل کرد تا به min برسد.کاهش دوز باعث کاهش مقدار صدمه میشود.یکی از راههای کمک به این موضوع فرایند تاثیر دوز در یک چرخه سلولی است.اگر فرض بر این باشد که چرخه سلولی شامل Mو G1و G2وs است.چرخه تقسیم سلولی یا باید یک حساسیت نسبی برابر در تمام فازهایش باشد یا یک تفاوت در فاز در حساسیت یا اینکه در هر فازی از چرخه سلول که دوز را میدهیم یک تاثیر یکسان را بگیریم یا تفاوت در فرایند حساسیت فازها یعنی در فازهایی از چرخه سلولی که پرتوگیری بالاتری داشته باشد را نسبت به فاز دیگر.این را باید پیدا کنیم که مثلا اگر در فاز G1 دوز را بدهیم تاثیر یکسانی با فاز Sیا G2 دارد که راهش این است که آزمایش را انجام دهیم.سلولهایی که در فاز G1 هستند دوز بدهیم و منحنی بقا را رسم کنیم.بعد که یک بار در فاز S یک بار در فاز G2 و بعد منحنی های بقا را با هم مقایسه کرده،اینکه در کدام منحنی حساسیت بیشتر بوده کدام شانه کوچکتری دارد،کدام شیب تندتری دارد که اینها نشان دهنده آن است که آن فاز نسبت به فازهای دیگر حساسیت بیشتری داردوقتی این را پیدا کنیم یک قدم به درمان نزدیکتر میشویم یعنی اگر فرض بر این باشد که فازی نسبت به فاز دیگر حساس تر است و در آن فاز دوز بدهیم مقدار دوز بیشتری می یابد و میتوان درصدش را کاهش داد.و بحث عمده ای که مطرح است اسن است که ما فرایندی داریم که به آن نا همگونی در تقسیم سلولی می گوییم.

ناهمگونی در تقسیم سلولی(peroferative petrogerative)

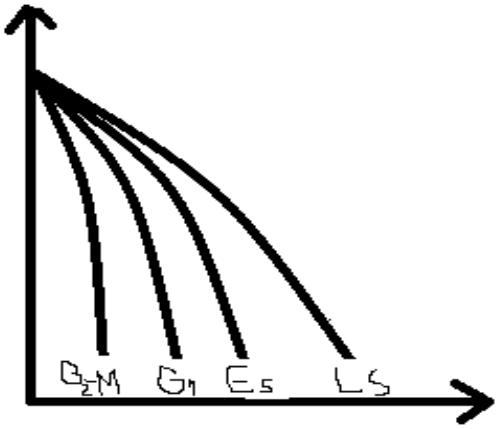
ناهمگونی از ویژگیهای سلول توموری است.یعنی مرحله ای داریم که سلولها هرکدام در یک فازی اند.ما همگونی در فازها نداریم و تنوع در سلولها زیاد است.و اگر بخواهیم یک مجموعه سلولی را دوز دهیم منحنی به دست آمده از میانگین حساسیت هاست و برای اندازه گیری به مشکل بر میخوریم.مگر اینکه سلولها را هم فاز کنیم و همه سلولها را در یک فاز خاص قرار دهیم و بعد دوز دهیم،که هم فاز کردن سلولها کار مشکلی است.که اینها همه فرایندهای invitro هستند.در invivo چنین فرایندی امکان پذیر

نیست که همگونی ایجاد کنیم.در invitro یکی از روشهایی که وجود دارد روش خرمن میتوزی یا mitosis harvest است که یکی از ویژگیهایی است که در کشت اتفاق می افتد.اگر سلولها را در یک ظرف کشت سلول بکارید.اگر این سلولها را زیر میکروسکوپ نگاه کنید لابه لای این سلولها سلولهای گوی شکل و dense میبینید که در واقع سلولهایی هستند که در فاز میتوز اند.

سلول وقتی در حال تقسیم است خود را جمع میکند،شبیه به یک گلوله میشود و بعد یک شکاف ایجاد و تقسیم میشود و بعد دوباره به کف می چسبند.تفاوت این سلولها با بقیه این است که بقیه سلولها با تمام سطح به کف چسبیده اند ولی این گوی ها به دلیل شکلشان سطح اتکای کمی دارند و راحت تر جدا میشوند.حالا اگر این ظرف سلول را آرام ضربه بزنیم سلولها کنده شده ولی بقیه سلولها به کف می چسبند بعد مدیوم را که حاوی سلولهای در فاز میتوز اند و داخل سانتریفوژ ریخته و بعد جدا کرده و بعد دوباره آنها را می کاریم.نتیجه این کار سلولهایی هستند که همه با هم،فاز میتوز را شروع کرده اند و در مرحله میتوز اند و با هم وارد فازهای دیگر میشوند و این فرایند تا چند سیکل ادامه پیدا میکند تا اینکه دوباره بعضی سلولها از فاز تقسیم خارج میشوند و در فاز G0 قرار میگیرند.یک سری از سلولها به روند خود ادامه میدهند،یک سری متوقف میشوند و بعد ناهمگونی رخ میدهد.بنابراین با این روش میتوان یک همگونی موقتی ایجاد کرد.در این روش زمان فازها خیلی مهم است.یعنی بدانیم که طول G1 و S و G2 چقدر است.یعنی قبلا با یک متد خاص اندازه گیری شوند.چون در سلولهای مختلف این زمان متفاوت است که روشهای مختلفی برای اندازه گیری این زمان وجود دارد.

یکی دیگر از روشهای یکسان سازی استفاده از دارویی به نام Hydroxiurea است که میتواند ایجاد یکنواختی کند.این ماده میتواند سلولها را در انتهای فاز G1 متوقف کند.درنتیجه سلولهایی که به G1 نرسیدند پشت G1 متوقف میشوند و سلولهایی که از G1 رد شده اند چرخه سلولی را یک دور میزنند و بعد پشت G1 متوقف میشوند.و بعد میتوان دارو را شست و سلولها وارد فازهای بعدی میشوند.این روش نیز در invitro انجام میشود.چون این دارو سمی است نمیتوان در invivo انجام داد.

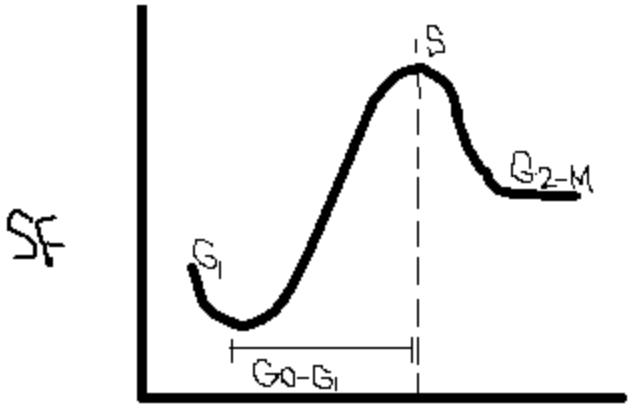
چند پتری دیش آماده کرده و سلولهایی که اکثرا در یک فاز هستند،مثلا میتوز، در آنها میریزیم.برای اندازه گیری تاثیر،دیش اول را دوز میدهیم.بنابر این تاثیر گرفته شده برای مرحله G1 است.در فاصله ای که دوز دادیم سلولها وارد مرحله S شدند بعد ظرف دوم را دوز میدهیم.با این فرض که فاصله G1 و S و G2 و... را میدانیم.بعد صبر میکنیم تا سلولها در مرحله S قرار بگیرند،بعد دوباره دوز میدهیم و منحنی بقا را رسم میکنیم.بعد G2 و بعد M.برای این کار حتما باید طول را بدانیم و به این ترتیب ما یک سری منحنی بقا به دست می آوریم.



منحنی اول برای G2M،منحنی دوم G1،منحنی سوم early S (ابتدای S) و منحنی چهارم برای end S میباشند.حساسترین مرحله مرحله G2M است که نشان میدهد نسبت به فازهای دیگر از حساسیت بالاتری برخوردار است.G1 نسبت به G2M مقاومتر و نسبت به S حساستر است.ابتدای S نسبت به دو منحنی قبلی مقاومتر و نسبت به end S حساستر است و انتهای S از همه مقاومتر است.بنابر این با توجه به این منحنی میزان موفقیت در درمان را میتوانیم حدس بزنیم در اینجا G2M را به عنوان فاز موفقیت در درمان در نظر میگیریم.در نتیجه میتوان حدس زد که چه فازی را اگر دوز دهیم تاثیر بیشتری میبینیم.اینکه چرا G2M حساسترین است و S مقاومترین به تغییراتی که در سلول اتفاق می افتد مربوط است.

یکی از تارگتهای حساس ما کروموزومها هستند و نسبت به تشعشع بسیار حساس اند.با دیدن تغییرات از یک میتوز تا میتوز بعدی در کروموزوم در می یابیم که در مرحله S محتوای کروموزومها دو برابر میشود.بنابر این حساسیت هم بیشتر میشود و در مرحله G1 محتوا اضافه تر میشود.در S به دلیل وجود مولکولهای سولفیدریل که جزو مولکولهایی هستند که تاثیر پرتودهی را کاهش میدهند،یکی از علل افزایش مقاومت در سلول این مولکولها هستند.این اختلاف،اطلاعات خوبی دارد اما مشکلی که دارد ناهمگونی است.در واقع در چرخه سلولی از سه مرحله G0-G1 و S و G2-M تشکیل شده است.یکی از مشکلات درمان این است که نمیدانیم سلول در چه فازی است.بنابراین اگر دوز هم بدهیم درست است که سلولهایی که در فاز G2-M هستند صدمه جدی تری میبینند اما نمیدانیم چند تا از سلولها در فاز G2-M هستند.نمیدانیم چه نسبتی از فازها در مجموعه سلولی وجود دارند.در نتیجه اطلاعاتمان از مجموعه سلولی اطلاعات ناقصی است که نمیتوان با استناد به آن دوز را کاهش داد.مشکل دوم این است که چه طور میتوان این تغییرات را اندازه گیری کرد.چطور میتوان فهمید چه نسبتی از سلولها در چه فازی هستند.در صورتیکه بدانیم جهت رشد تومور به سمت سلولهای حساس است میتوان به کاهش دوز فکر کرد.

منحنی تفاوت در حساسیت به شکل زیر نیز هست.



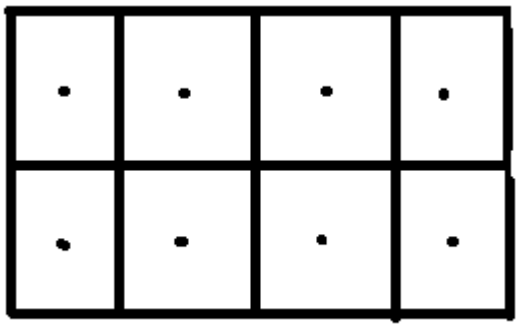
ستون عمودی SF و ستون افقی زمان بین میتوزها را نشان میدهد.با نگاه به این منحنی میتوان دریافت که در مرحله G0-G1 حساسیت نسبی وجود دارد.در ابتدای G1 حساسیت نسبی وجو دارد که به تدریج مقاومت زیاد میشود و در انتهای S به max مقاومت میرسد و بعد دوباره از انتهای S تا G2-M مقاومت شکسته شده و حساسیت زیاد میشود.در نتیجه مرحله S دامنه مقاومت است.در ابتدا به تدریج زیاد میشود و در انتها به max میرسد.در ابتدای G1 یک مقاومت وجود دارد که به تدریج این دامنه به حساسیت میرسد،بعد دوباره مقاومت شروع میشود.در انتهای G1 حساسیت،ابتدای S مقاومت بیشتر است که در انتهای S به max میرسد و در G2-M منطقه حساسیت است.بنابراین G1 هم میتواند منطقه حساس باشد ولی در G1 تفاوت در حساسیت وجود دارد یعنی در ابتدای G1 حساسیت کمتر و در انتها حساسیت بیشتر است.

با توجه به تفاوت حساسیت آیا تاثیر اکسیژن در بازه های مختلف فاز سلولی متفاوت است؟

اکسیژن باید در زمان خاصی حضور داشته باشد که در غیر این صورت عملا تاثیری ندارد.اکسیژن در همه فازها تاثیر یکسان دارد و فرقی نمیکند که در چه فازی قرار گرفته باشد ولی تاثیر انرژی در فازها،متفاوت است.منحنی بالا برای ایکس و گاما است.در منحنی نوترون تغییرات کمتر است.حساسیت در نوترون هم وجود دارد اما به شدت ایکس و گاما نیست.ولی آلفا در فازها هم تغییری ندارد یعنی فرقی ندارد تابش آلفا را در چه فازی بدهیم و در فازهای مختلف تاثیر یکسانی دارد.همانطور که OER=1 دارد تاثیر انرژی در فازهای مختلف هم میتواند برابر باشد که علت آن میزان و شدت است،چون میزان صدمه بالاست فرق ندارد که انرژی در چه فازی داده شود.یکی از علل درمان با high energyها به این دلیل است که وابسته به فاز نیست.در حالی که ایکس و گاما وابسته به فاز اند.

از کجا بفهمیم سلولها در چه فازی هستند؟با مشاهده سلولها در زیر میکروسکوپ فازها تشخیص داده نمیشوند.قدیمی ترین روشی که در این خصوص وجود دارد Auto radiography هست.این روش سابقه کاربرد طولانی دارد.امروزه هم ممکن است با توجه به نوع کار و نوع هدف محقق استفاده شود.اساس کار این روش آنالوگهای تیمین است.که هرچیزی میتواند باشد مانند ۱۲۵Iudr

روش کار:اگر در یک ظرف کشت سلولها را کشت دهیم،بعد محلول ludr را وارد ظرف کنیم و بعد سلولهایی که در فاز سنتز اند چون آنالوگ تیمین اند فقط در فاز S عمل میکنند در نتیجه سلولهایی که در فاز S اند این آنالوگ را برداشت میکنند.مرحله دوم استفاده از Chamber slide است. chamber slide یک لام شیشه ای است که روی آن یک لایه لاستیکی چسبانده اند که این لایه لاستیکی یک دیواره ایجاد میکند که وقتی مدیوم را داخلش میریزیم،مدیوم بیرون نریزد.



شکل چمبر

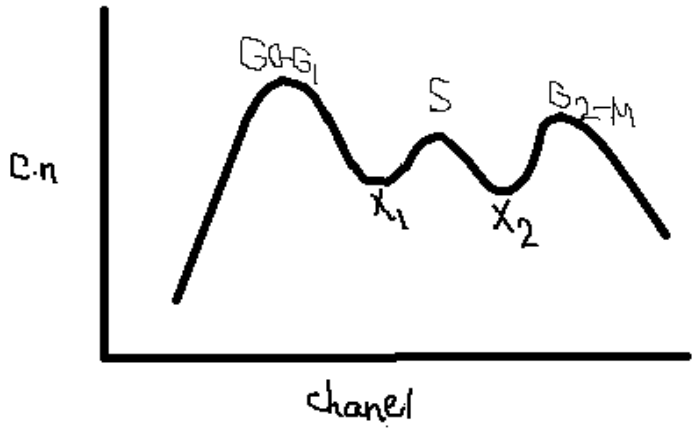
بنابر این داخل chamberها سلول را میکاریم و داخلش را از مدیوم پر میکنیم و بعد دارو را میریزیم در نتیجه سلولهایی که در فاز s اند دارو را برداشت میکنند که به این کار flash labling میگویند یعنی نشان دار کردن سریع به این معنی که در یک فاصله زمانی چند ساعته دارو را ریخته و بعد میشورند.بعد سلولها را در یک مرحله از محلول الکلی عبور میدهند تا جداره سلولی پاره شود که باعث خارج شدن مایع سلولی میشود که به لام میچسبد.بعد بع تاریکخانه منتقل شده و بعد اسلایدها را داخل امولسیون(که روی فیلم رادیوگرافی کشیده میشود و مایع است).بنابراین سطح اسلاید کاملا توسط امولسیون گرفته شده و میگذاریم تا در تاریکخانه خشک شود و بعد داخل ظروف ضدنور چیده شده و بعد در دمای ۴درجه میگذارند.از ۴۸-۹۶ ساعت باقی میمانند و بعد دوباره به تاریکخانه منتقل شده و فرایند پروسسینگ انجام میدهیم بعد اسلایدها را زیر شیر آب گرفته تا داروها کاملا شسته شوند و بعد از ترکیبات رنگی مثل فوشین استفاده میکنند که رنگ بنفش تولید میکند.بعد از رنگ آمیزی روی لام گذاشته و زیر میکروسکوپ قرار میدهند.لاین سلولی به شکل یک سری سلولهایی است که به شکل گرد اند و روی آن یک سری نقطه هایی است که black grain نام دارند.بنابراین ما سلولهایی داریم که ممکن است روی آنها هزاران black grain باشد،روی بعضی کمتر و روی بعضی هیچ نباشد.سلولهایی که black grain دارند در واقع سلولهایی هستند که ماده رادیواکتیو برداشت کرده اند.وقتی با امولسیون پوشیده شدند انرژی خارج شده،امولسیون را اکسپوز کرده و بعد تصویر ایجاد کرده است.این یعنی سلولهایی که در فاز S اند.میتوان همین کار را با تومور کرد.یک ویال ۱۲۵را تزریق میکنیم.محلول وارد تومور شده و سلولهایی که در چرخه اند و در فاز S هستند آن را برداشت کرده و آنهایی که خارج از چرخه اند برداشت نمیکنند.بعد تومور را خارج کرده به آزمایشگاه میبرند،شستشو میدهند و بعد در نیتروژن مایع قرار داده و کاملا منجمد میشود و بعد آنرا داخل دستگاهی قرار داده که این خاصیت را دارد که توانایی لایه لایه برش دادن دارد.دستگاه لیتوتوم تیغه تیزی دارد که با تنظیم کردن میتواند

برشهای میکرونی دهد.در حالت انجماد برشها را میدهد و بعد لام را گرم میکنند و به تومور میچسبانند،چون لام گرم است،تومور سرد به لام میچسبد و بعد تکرار مراحل قبلی که توضیح داده شد.

بنابراین با شمارش و درصدگیری میتوان فهمید چه مقدار از مجموعه سلولی که داریم black grain دارندو مثلا فلان درصد از سلولها در فاز S اند.یکی از مهمترین مشکلات این روش آلودگی ای هست که با ماده رادیواکتیو در خود فرد و محیطی که در آن کار میکند ایجاد میشود.مشکل دوم زمان بر بودن کار است.آماده کردن سلولها و فرو بردن در امولسیون و ... که همگی زمان بر هستند.مشکل سوم اینکه وقتی سلولها را روی لام قرار میدهیم،هنگام مشاهده black grainها،پراکنگی ای از نقاط تیره،در آن مجموعه سلولی مشاهده خواهیم کرد که میتواند ناشی از آرتیفکتهای پروسسینگ هم باشد که شمارش را دچار مشکل میکند.تشخیص دقیق اینکه نقاط سیاه black grain است یا آرتیفکت کاملا مشخص نیست.اوتورادیوگرافی یکی از روشهایی است که در تعیین فازها هم مورد استفاده قرار میگیرد ولی اینکه هر فاز چقدر زمان میبرد را به ما نمیگوید.

روش متداول مورد استفاده Flow cytometry است و flow cytometer دستگاهی است که این کار را انجام میدهد.

روش کار: از لوله مویینی تشکیل شده که اجازه عبور بیش از یک سلول را نمیدهد.بنابراین سلولهایی که از آن عبور میکنند حتما باید تک سلولی باشند و یک لیزر و دتکتور هم داریک که عین همین تشکیلات در cell counterها هم هست.سلول قبل از اینکه ظاهر شود باید آماده شود.برای آماده شدن از ترکیب propedium iodine(PI) که PI یک ترکیب فلوئورسنت قرمز رنگ است که وقتی آنرا وارد سلول میکنیم کروموزوم را به رنگ قرمز در می آورد.هرقدر محتوای کروموزومی بیشتر باشد مقدار برداشت PI هم افزایش می یابد.این ماده این قابلیت را دارد که وقتی لیزر با آن برخورد میکند از خود نور قرمز رنگ ساطع میکند.بنابراین دتکتورها نور قرمز را با شدتهای مختلف ثبت میکند.به سری دتکتورها chanel گفته میشود.اطلاعات دتکتورها به سیستم کامپیوتری منتقل میشود و سیستم اطلاعات را به یک منحنی تبدیل میکند.



شکل منحنی بستگی به پراکندگی مجموعه سلولی دارد.آنچه در غالب سلولها مشاهده میشود این است که بیشترین peak مربوط به G0-G1 است.بعد G2-M و S بین این دو است.Cell number به ما میگوید از یک مجموعه سلولی چقدر G0-G1،چقدر S و چقدر G2-M است و ما میفهمیم که trend یا تمایل مجموعه به کدام سمت است.به سمت حساسیت،به سمت مقاومت یا حالتی برابر دارد و در تعیین دوز کمک کننده است.که در اینصورت به سلولهای حساس دوز بالا نمیدهیم و به سلولهای مقاوم دوز پایین نمیدهیم و دوز کاملا کنترل شده است و تاثیر روی سلولهای نرمال کمتر شود.ویژگی دیگر این روش این است که میتواند طول هر فاز را هم مشخص کند.نقطه ضضعف این روش این است که سیستم بر اساس مقدار،نوع و محتوای کروموزومی فاز را تشخیص میدهد.بر اساس رابطه بین نور و محتوای کروموزومی فازها را تشخیص میدهد.نقطه ضعف این است که در تشخیص دقیق دو نقطه x1 و x2که روی نمودار بالا مشخص شده اشتباه میکند.یعنی اینکه نمیداند نقطه۱،G1 است یا S و یا نقطه۲ S است یا G2.و ممکن است درصدی از S که میدهد واقعی نباشد بنابراین خیلی دقیق نیست.اگر بخواهیم دقیقا S را بدانیم از روش دیگری استفاده میکنیم.

در این روش سلولها را میکاریم،رشد میکنند و بعد از cold ludr استفاده میکنیم که ید رادیواکتیو نیست و فقط در S برداشت میشود.بعد از شستشو دادن،با PI رنگ آمیزی و بعد از فلوئورسنت دیگری استفاده میکنند به نام FITC،که سبزرنگ است و Anti ludrBudr هم میگویند.یعنی این فلوئورسنت سبزرنگ هرجا مولکول ludr ببیند به آن میچسبد.بنابراین وقتی سلولها در حال عبور اند یک سری از سلولها رنگ قرمز تولید میکنند،یک سری هم رنگ سبز.اگز سبزها را از قرمزها کم کنیم سلولهایی که در فاز S هستند به دست می آید و میتوان تفکیک کامل انجام داد و trend را دریافت.این روش مستلزم ماده رادیواکتیو نیست،آلودگی ندارد،اطلاعات را سریع میدهد،اطلاعات آنالیز شده دقیق است،طول فازها را میدهد و تمام فازها را میدهد ولی در روش قبل فقط S دتکت میشد یعنی فقط میگفت که آیا در فاز S هست یا نیست و اینکه چه نسبتی در فازهای دیگر هستند را نمیگفت.

در کار با ماده رادیواکتیو مشکلات جدی وجود داردحتی اگر درِ ظرف حاوی ید،باز باشد،ید تصعید شده و فرد این ید را دریافت و استنشاق کرده و در تیروئید جمع میشود و تیروئید منبع تابش میشود.(گایگر وسیله ای است که مقدار اکتیویته را اندازه گیری میکند.)آلودگی محیطی مواد رادیواکتیو بسیار جدی است.

روش دیگر روش Imono chemistry است.استفده از آنتی بادی هایی که مواد مختلفی ازشون داریم که یکی از آنها Ki67 است که این ماده یک آنتی بادی است که روی آنتی ژنی عمل میکند که در سلولهایی که در چرخه هستند موجود میباشد،نه سلولهایی که در خارج چرخه اند(در G0).سلولهایی که در چرخه اند آنتی ژنی دارند که این آنتی بادی به آنتی ژن میچسبد و رنگ سلول را قهوه ای میکند یعنی بعد که فرایند بازسازی را انجام میدهیم و سلولها را برای مشاهده آماده میکنیم، میبینیم که بعضی سلولها به رنگ قهوه ای در آمده اند.این سلولها سلولهایی هستند که در چرخه بوده اند درنتیجه میتوان نسبت سلولهایی که خارج چرخه بوده اند به دست آوریم که این خیلی مهم است چون G0ها سلولهایی مقاوم نسبت به تشعشع

هستند بنابراین اگر در مجموعه نسبت زیادی از سلولها G0 باشند این مستلزم دوز بالایی است.این روش در پاتولوژی هم کاربرد دارد که اگر مثلا در گزارش پاتولوژی آمده باشد:Ki67=80% یعنی ۸۰% سلولها فعال اند که این یک مارکر در پاتولوژی است.ولی این روش فاز را مشخص نمیکند و نمیگوید که سلولها در کدام فاز هستند.فقط میگوید که چقدر از آنها فعال هستند.

همچنین میتوان چند روش را باهم روی سلول،به صورت دابل یا تریپل مارکر اجرا کرد.در کارهای پاتولوژیک به یک مارکر اکتفا نمیکنند.مثلا از روش اتورادیوگرافی همراه با روش Ki67 استفاده کرد.که این کار حسنی که دارد این است که میتوان سلولهایی که در چرخه هستند و ید را برداشتند و قاعدتا به رنگ قهوه ای در آمده اند را تشخیص داد که این سلولها هم black grain دارند هم به رنگ قهوه ای درآمده اند.اگر سلولهایی باشند که black grain ندارند و به رنگ قهوه ای هم درنیامده اند سلولهایی هستند که احتمالا در فاز G0 هستند البته میتواند استثنائاتی هم وجود داشته باشد یعنی میتوان سلولهایی داشت که black grain ندارند ولی به رنگ قهوه ای درآمده اند یعنی در هر فازی بوده اند به غیر از S. یا اینکه سلولهایی هستند که black grain دارند ولی به رنگ قهوه ای درنیامده اند که ممکن است سلول بعد از دریافت انرژی از بین رفته باشد و چون از بین رفته دیگر روش دوم اثری روی آن نداشته است.

سلولی نداریم که چرخه را شروع کند و آن را تمام نکند.

اگر black grainها از ۳۰ عدد به پایین باشد احتمال آرتیفکت بیشتر است ولی اگر از ۳۰ به بالا باشد سلولها lable شده اند.