

Investigation of the expression of P53 gene in bystander cells after therapeutic ultrasound exposure

Rezaei M¹, Kamran-Samani R¹, Shanei A^{1*}, Kazemi M², Hejazi SH³

1- Department of Medical Physics, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

2- Department of Genetics and Molecular Biology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

3- Department of Parasitology and Mycology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 2019/01/10 | Accepted: 2019/06/1

Abstract:

Background: Bystander effect is defined as biological responses observed in cells that are not exposed to radiation directly but these radiation effects are induced through messages from irradiated cells. One of the non-invasive methods for cancer treatment is ultrasound waves. The therapeutic efficacy of ultrasound waveslike treatment with ionizing radiation can be altered by the bystander effect, so it is necessary to evaluate the bystander effect after ultrasound exposure. In this study, the effect of ultrasound exposure on the expression of P53 gene in neighboring cells has been investigated.

Materials and Methods: The cells were divided into three groups: control (without treatment), target (under direct ultrasound exposure) and the bystander (no radiation, only receiving target cells culture media). In the target group, the cells were exposed to the ultrasound and after one hour their culture medium were transferred to the bystander group. Cell viability and the expression of P53 gene by using the MTT assay and Real-time PCR was analyzed.

Results: The percentage of cell survival in the target group was reduced compared to the control group, but in the bystander group, this difference was not significant. The expression of P53 gene in the bystander group was statistically increased compared to the control group.

Conclusion: The bystander effect is induced after ultrasound exposure and it can increase the level of P53 gene expression in bystander cells.

Keywords: Ultrasound waves, Bystander effect, MTT assay, Real-time PCR, P53 gene

***Corresponding Author:**

Email: A.shanei1397@gmail.com

Tel: 0098 98 313 792 9080

Fax: 0098 98 313 792 9032

Conflict of Interests: *No*

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 4, Pages 344-351

Please cite this article as: Rezaei M, Kamran-Samani R, Shanei A, Kazemi M, Hejazi SH. Investigation of the expression of P53 gene in bystander cells after therapeutic ultrasound exposure. *Feyz* 2019; 23(4): 344-51.

بررسی میزان بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه بعد از تابش امواج فراصوت درمانی

معصومه رضایی^۱، رقیه کامران سامانی^۲، احمد شائنی^{۳*}، محمد کاظمی^۴، سید حسین حجازی^۵

خلاصه:

سابقه و هدف: اثر همسایگی پرتویی، بروز آثار بیولوژیکی در سلول‌هایی است که به‌طور مستقیم تحت تابش پرتو قرار نگرفته‌اند؛ بلکه آثار پرتوی، از طریق پیام‌های صادره از سلول‌های تابش‌دیده در آنها القا می‌شود. یکی از روش‌های غیرتهاجمی درمان سرطان، استفاده از امواج فراصوت می‌باشد. بازده درمانی این روش همانند درمان با پرتوهای یونیزان می‌تواند تحت‌تأثیر اثر همسایگی تغییر کند که این مطلب لزوم بررسی اثر همسایگی ناشی از امواج فراصوت را می‌رساند. در این پژوهش تأثیر تابش امواج فراصوت درمانی بر بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه مورد بررسی قرار گرفته‌است.

مواد و روش‌ها: سلول‌ها به سه گروه کنترل (بدون درمان)، هدف (سلول‌های در معرض تابش امواج فراصوت) و همسایه (سلول‌های تابش‌ندیده و دریافت‌کننده محیط کشت سلول‌های هدف) تقسیم شدند. سلول‌های گروه هدف، تحت تابش فراصوت قرار گرفتند و پس از یک ساعت محیط کشت آنها به سلول‌های گروه همسایه منتقل شد. میزان بقای سلولی و همچنین میزان بیان ژن P53 به‌ترتیب با استفاده از تست MTT و Real-time PCR بررسی شد.

نتایج: درصد بقای سلولی گروه هدف در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت، اما در گروه همسایه این تفاوت معنادار نبود. میزان بیان ژن P53 در گروه همسایه در مقایسه با گروه کنترل افزایش معناداری نشان داد.

نتیجه‌گیری: اثر همسایگی به‌دنبال تابش فراصوت ایجاد شد و آن می‌تواند میزان بیان ژن P53 را در سلول‌های همسایه افزایش دهد.

واژگان کلیدی: امواج فراصوت، اثر همسایگی، تست MTT، Real-time PCR، ژن P53

دو ماه‌نامه علمی-پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۴، مهر و آبان ۹۸، صفحات ۳۴۴-۳۵۱

مقدمه

به‌طوری‌که سلول‌های تابش‌دیده استرس ایجادشده را به دیگر سلول‌ها منتقل می‌کنند و باعث بروز آثار در سلول‌های تابش‌ندیده می‌شوند. از جمله این آثار در سلول‌های همسایه می‌توان به آسیب DNA، تغییر در عملکرد سلول، مرگ سلولی، ناهنجاری‌های کروموزومی، آپوپتوز، تغییر سطح یا فعالیت پروتئین‌ها و آنزیم‌های تنظیم‌کننده اشاره کرد [۲، ۴، ۵]. در حالی‌که مطالعات زیادی بروز اثر همسایگی به‌دنبال تابش پرتوهای یونیزان را اثبات کرده‌اند، اندک مطالعاتی در مورد اثر همسایگی پرتوهای غیریونیزان انجام شده‌است. نتایج بررسی اثر همسایگی در نتیجه تابش امواج غیریونیزان رخداد این پدیده را به اثبات رسانده‌است. در نتیجه می‌توان اصطلاح اثر همسایگی را برای پرتوهای غیریونیزان نیز به‌کار برد. در هایپرترمی مغناطیسی که از امواج غیریونیزان رادیویی کانونی برای درمان استفاده می‌شود، علاوه بر ایجاد مرگ در سلول‌های حاوی نانوذرات مغناطیسی، مکانیسم اثر همسایگی سبب القای مرگ در سلول‌های فاقد این نانوذرات می‌شود [۱]. مطالعه Girotti و همکاران نشان داد استرس ایجادشده در نتیجه تابش نور در حضور حساس‌کننده نوری (فتوداینامیک‌تراپی) در سلول‌های سرطان پروستات از طریق فاکتورهایی از جمله رادیکال NO سبب بروز آثار بیولوژیکی در سلول‌های تابش‌ندیده می‌شود [۶]. امواج فراصوت به‌طور گسترده در اقدامات تشخیصی و نیز روش‌های درمانی از جمله فیزیکی‌تراپی بالینی و تحویل دارو یا

تابش پرتوهای یونیزان به بافت، ضمن بروز آثار پرتوی در سلول‌هایی که تحت تابش مستقیم پرتو بوده‌اند، باعث بروز آثار بیولوژیکی در سلول‌های تابش‌ندیده همسایه می‌شود که به این مکانیسم اثر همسایگی می‌گویند [۳-۱]. در علم رادیوبیولوژی بر مبنای تئوری هدف، لازمه ایجاد آسیب پرتوی در یک سلول، برخورد مستقیم یا غیرمستقیم پرتو با DNA یا دیگر اجزای مهم سلول می‌باشد. ولی مطالعات اخیر نشان می‌دهد رابطه میان پرتو و سلول، پیچیده‌تر از آن است که برخورد پرتو با سلول را الزامی سازد.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۲. دانشجوی دکتری، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۳. دانشیار، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۴. استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران
۵. استاد، گروه قارچ‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

* نشانی نویسنده مسئول:

اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی

دورنویس: ۰۳۱ ۳۷۹۲۹۰۳۲

تلفن: ۰۳۱ ۳۷۹۲۹۰۸۰

پست الکترونیک: A.shane1397@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۳/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۰

افزایش بیان ژن P53 و کاهش میزان عوامل کمک‌کننده به پیشرفت چرخه سلول در سلول‌های همسایه مشاهده شده‌است. باتوجه به آثار ژنتیکی ایجادشده در سلول‌های همسایه توسط پرتوهای یونیزان [۱۸] و همچنین ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول‌های هدف که به‌طور مستقیم تحت تابش امواج فراصوت قرار گرفته‌اند [۱۶]، می‌توان احتمال ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول‌های همسایه میدان تابش امواج فراصوت درمانی را پیش‌بینی نمود. برای رسیدن به این منظور و باتوجه به مطالعات انجام‌شده مبنی بر ایجاد رادیکال‌های آزاد در محیط، توسط شدت‌های ذکرشده به بررسی میزان بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه در شدت‌های مختلف پرداخته و نتایج با سلول‌های کنترل مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

رده سلولی و شرایط کشت

رده سلولی Hela از انستیتو پاستور ایران خریداری شد و درون فلاسک استریل در محیط کشت (GIBCO, RPMI-1640 (Germany) حاوی FBS (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد و آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین (Biosera, France) (۱ mg/ml) و پنی‌سیلین (Biosera, France) (۱۰۰۰ units/ml)، در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد دی‌اکسیدکربن در یک محیط مرطوب، کشت و تکثیر داده شد. بعد از ۴-۳ روز که سلول‌ها به‌صورت تک‌لایه کف فلاسک را پوشاندند، توسط آنزیم تریپسین ۰/۲۵ درصد همراه با Ethylenediaminetetraacetic EDTA (acid) از کف فلاسک جدا شده و پس از شمارش به پلیت‌های ۱۲ چاهک (تعداد 5×10^4 سلول به ازای هر چاهک) جهت انجام آزمایش‌های لازم منتقل شد.

دستگاه فراصوت

امواج فراصوت با استفاده از یک دستگاه فراصوت درمانی (A215؛ شرکت مهندسی پزشکی نوین، تهران و شرکت EMS، Berkshire, Reading، انگلستان) در مد پیوسته با فرکانس ۱ مگاهرتز و حداکثر شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع با ترانس‌دیوسر دارای سطح مقطع ۷ سانتی‌مترمربع، به سلول‌ها تابیده شد. کالیبراسیون دستگاه در یک مخزن آب تصفیه‌شده بدون وجود هوا و هم‌دما با محیط انجام شد. در این مخزن آب، یک صفحه دایره‌ای پلاستیکی که نقش جاذب پرتو فراصوت را بازی می‌کند، وجود دارد که می‌تواند نیروی ناشی از موج فشاری را که به سطح آن وارد می‌شود، تحمل کند. این نیروی جذب‌شده با استفاده از یک

ژن به سلول‌ها استفاده می‌شود [۷]. بروز آثار بیولوژیکی در بافت‌های بدن بعد از تابش امواج فراصوت درمانی به اثبات رسیده‌است [۸]. این امواج بعد از تابش به بدن، بافت‌ها را در معرض یک ارتعاش سریع کم‌دامنه قرار می‌دهند و سبب بروز آثار مکانیکی از جمله حفره‌سازی می‌شوند. گرما و فشار متمرکزشده در محل تخریب حفره‌ها (کاویتاسیون) سبب پیرولیز حلال‌ها شده، منجر به تشکیل رادیکال‌هایی در ناحیه کاویتاسیون می‌شود [۹]. رادیکال‌های آزاد H و OH تولیدشده در نواحی داغ قبل از بازترکیبی با یکدیگر با مولکول‌های حل‌شده در حلال واکنش می‌دهند. تولید رادیکال‌های آزاد در محلول‌های آبی که در معرض تابش پالس‌های فراصوتی با سطوح تشخیصی قرار گرفتند، نیز گزارش شده‌است [۱۰]. در مطالعات با پرتوهای یونیزان مکانیسم انتقال اثر همسایگی از طریق اتصالات بین‌سلولی [۱۱] و نیز آزادسازی فاکتورهای محلول از سلول‌های تابش‌دیده شامل رادیکال‌های آزاد حاوی اکسیژن (ROS)، H_2O_2 و NO بیان شده‌است که به‌طور اساسی در افزایش و کاهش بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها در سلول‌های همسایه تأثیرگذار هستند [۱۲، ۱۳]. همچنین در مقاله مروری نجفی سال ۲۰۱۸ علاوه بر موارد ذکرشده، رادیکال هیدروکسیل (ROH) نیز به‌عنوان عامل انتقال سیگنال‌های همسایگی معرفی شده‌است [۱۴]. باتوجه به نقش اساسی رادیکال‌های آزاد در فرآیند انتقال سیگنال‌های همسایگی پیش‌بینی می‌شود امواج فراصوت درمانی به‌دلیل ایجاد کاویتاسیون و در نتیجه تولید رادیکال‌های آزاد [۱۵] و ایجاد رادیکال هیدروکسیل [۹] قابلیت ایجاد آثار بیولوژیکی در سلول‌های همسایه را داشته باشند. مطالعات متعددی بر روی آثار بیولوژیکی امواج فراصوت درمانی انجام شده‌است که این تحقیقات تأثیر امواج فراصوت در میزان بیان ژن‌ها در سلول‌های تحت تابش را به اثبات رسانده‌است [۱۶]. یکی از ژن‌هایی که با آسیب DNA بیان آن تغییر می‌کند، ژن P53 است. ژن سرکوب‌گر P53 پس از ایجاد آسیب در DNA از طریق مکانیسم‌هایی شامل توقف رشد و تکثیر سلولی و آپوپتوز سبب کنترل رشد سلولی می‌شود. در مطالعه Velculescu مشاهده شد پس از آسیب به DNA سلول‌های توموری، کاهش بیان این ژن باعث رشد بیشتر سلول‌های توموری و نیز ایجاد مقاومت در برابر شیمی‌درمانی و پرتودرمانی در این سلول‌ها شد [۱۷]. در این مطالعه از بررسی اثر همسایگی فراصوت روی رده سلولی Hela که القای سیگنال‌های همسایگی به‌دنبال تابش پرتوهای یونیزان در آن به اثبات رسیده‌است، استفاده شد [۱۸]. در مقالات مروری Hamada و همکاران [۱۹] و همچنین Chaudhry [۲۰] به مطالعات زیادی اشاره شده‌است که در آن‌ها

هدف و همسایه از تست MTT استفاده شد. پس از این که محیط کشت پلیت‌های هدف به پلیت‌های همسایه منتقل شد، میزان بقای سلول‌های هدف بررسی شد و همچنین میزان بقای سلول‌های همسایه، ۲۴ ساعت بعد از دریافت محیط کشت سلول‌های هدف مورد بررسی قرار گرفت. در هر دو گروه پس از تخلیه محیط کشت به ازای هر چاهک، ۳۰۰ میکرولیتر RPMI خالص و ۳۰ میکرولیتر محلول USA MTT (Sigma, USA) ۵ درصد اضافه شد. پس از ۴ ساعت انکوباسیون، محلول MTT تخلیه و به ازای هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر دی‌متیل سولفوکسید (DMSO (Sigma, USA) در خانه‌ها ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در انکوباتور قرار گرفتند، سپس محلول درون هر یک از چاهک‌های پلیت ۱۲ چاهکی به چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شد. در نهایت، با استفاده از اسپکتروفوتومتر (USA, Stat Fax 2100)، تراکم نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از به دست آوردن میزان چگالی نوری (Optical Density) چاهک‌های مختلف با استفاده از رابطه زیر درصد بقای سلولی محاسبه شد.

$100 \times (\text{میانگین چگالی نوری نمونه کنترل} \div \text{میانگین چگالی نوری}$

نمونه مورد آزمون) = درصد بقای سلول

جداسازی RNA و Real-time PCR

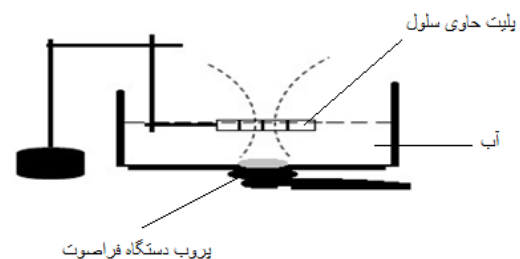
استخراج RNA طبق پروتکل کیت شرکت بایوفکت BioFACT™ Total RNA Prep Kit (Biofact, Korea) و طبق پروتکل شرکت سازنده از تعداد $10^4 \times 15$ سلول به ازای هر زیرگروه صورت پذیرفت و سپس مقدار ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت سنتز cDNA شرکت بایوفکت (2X) (Onestep RT PCR Master Mix kit) و با استفاده از پرایمر oligodT به cDNA تبدیل شد. پرایمرهای طراحی شده برای بررسی ژن‌های P53 و GAPDH در جدول شماره ۱ آمده است. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Real-time polymerase chain reaction) (2X Real-time polymerase chain reaction) (Biofact, Korea) SYBR Green (PCR Master Mix) که شامل GAPDH می‌باشد، ارزیابی شد. ژن GAPDH به عنوان $-\Delta\Delta Ct$ برای بررسی سطح بیان ژن‌های مورد نظر استفاده شد.

برنامه زمانی-دمایی دستگاه ریل-تایم (StepOne Plus™ Real-time PCR) در سه مرحله به صورت زیر تنظیم شد. مرحله اول که منجر به دناتوره شدن DNA الگو و فعال شدن آنزیم پلیمرز می‌شود، در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و مدت ۱۵ دقیقه انجام

سنسور تعادل سونوگرافی اندازه‌گیری می‌شود و میانگین نیروی اعمال شده روی صفحه به توان فراصوتی تبدیل می‌شود.

تابش فراصوت به سلول‌های Hela

پس از این که سلول‌ها، کف فلاسک را به طور کامل پر کردند، با استفاده از تریسین با غلظت ۰/۲۵ درصد از کف فلاسک جدا شده، بعد از شمارش، درون پلیت‌های ۱۲ چاهک کشت داده شدند (5×10^4 سلول به ازای هر چاهک). پلیت‌های گروه هدف به پنج زیرگروه تقسیم شدند که زیرگروه‌های مربوط به پلیت‌های هدف عبارتند از: ۱- گروه کنترل که هیچ تابشی دریافت نکرده‌اند، ۲- گروه تحت تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۰/۵ وات بر سانتی‌مترمربع و در زمان ۱ دقیقه، ۳- گروه تحت تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۱ وات بر سانتی‌مترمربع در زمان ۱ دقیقه، ۴- گروه تحت تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۱/۵ وات بر سانتی‌مترمربع در زمان ۱ دقیقه و ۵- گروه تحت تابش فراصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع در زمان ۱ دقیقه. پنج زیرگروه مربوط به پلیت‌های همسایه به ترتیب دریافت کننده محیط کشت زیرگروه‌های پلیت‌های هدف می‌باشند. در روز تابش دهی محیط کشت پلیت‌های هدف با محیط کشت تازه عوض و اطراف آن‌ها با استفاده از پارافیلیم پوشانده شد. سپس هر کدام از این پلیت‌ها درون حمام فراصوت مطابق شکل شماره ۱ در محدوده میدان نزدیک (Near field) دستگاه فراصوت قرار گرفت و تابش دهی صورت پذیرفت. پس از تابش، پلیت‌ها درون انکوباتور قرار گرفتند. بعد از گذشت ۱ ساعت از زمان تابش امواج فراصوت، محیط کشت پلیت‌های هدف با استفاده از سرنگ تخلیه و پس از عبور از فیلتر سرسرنگی با سایز ۰/۲ میکرون، به منظور جلوگیری از انتقال سلول‌های هدف به پلیت‌های همسایه، انتقال محیط کشت انجام شد.



شکل شماره ۱- شماتیک نحوه تابش دهی سلول‌ها توسط دستگاه فراصوت

MTT assay

برای بررسی میزان بقای سلول‌های Hela در گروه‌های

سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه ادامه یافت. مرحله پایانی نیز جهت ترسیم منحنی تفکیک یا منحنی ذوب انجام شد.

گرفت. در مرحله دوم، واکنش تکثیر DNA در ۴۰ سیکل و با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه و دمای ۶۰ درجه

جدول شماره ۱- پرایمرهای لازم برای دو ژن P53 و GAPDH

نام ژن	Transcript ID	ردیف بازی
GAPDH	NM_001256799.2	forward primer 5- TGGTATCGTGAAGGACTC- 3 reverse primer 5- AGTAGAGGCAGGGATGATG- 3
P53	NM_000546.5	forward primer 5- TCTGACTGTACCACCATCCACTA- 3 reverse primer 5- CAAA ACGCACCTCAA AGC- 3

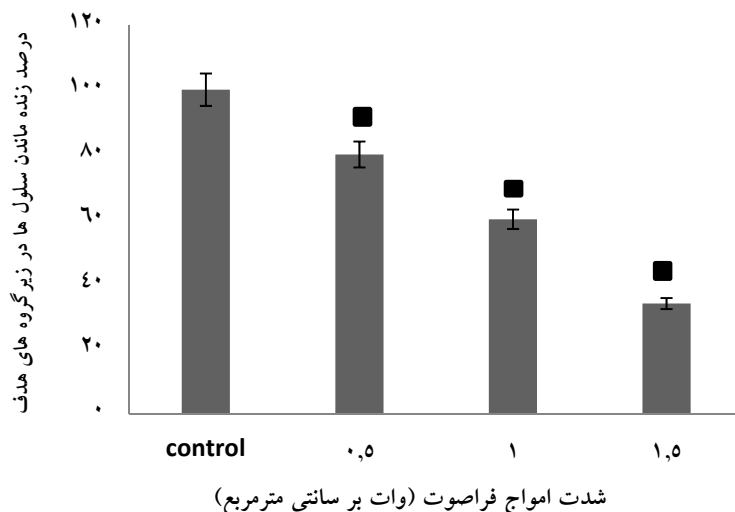
تحلیل داده‌ها

تمامی مراحل آزمایش ۳ بار تکرار شد و داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار به دست آمدند. آزمون آماری One sample kolmogorov-smirnov نشان داد کلیه داده‌ها از توزیع طبیعی برخوردارند. بنابراین برای بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار میان زیرگروه‌ها در هر مجموعه از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه استفاده شد. زمانی که نتیجه این آزمون نشان داد بین زیرگروه‌ها اختلاف معناداری وجود دارد ($P < 0/05$)، برای مقایسه زیرگروه‌ها با گروه کنترل از آزمون داننت (Dunnett's test) استفاده شد. نرم‌افزار آماری مورد استفاده SPSS ویرایش ۲۲ (SPSS Inc, Chicago, IL) بود.

نتایج

میزان بقای سلول‌های هدف در شدت‌های مختلف تابش فراصوت
سنجش میزان بقای سلولی در سلول‌های هدف در شدت‌های مختلف با تست MTT انجام شد. امواج فراصوت با شدت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ وات بر سانتی‌مترمربع و زمان ۱ دقیقه بر سلول‌ها تابیده شد. همان‌گونه که شکل شماره ۲ نشان می‌دهد، بیشترین میزان مرگ در شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع اتفاق افتاده است. باتوجه به شکل شماره ۲ میزان بقا در شدت ۰/۵ وات بر

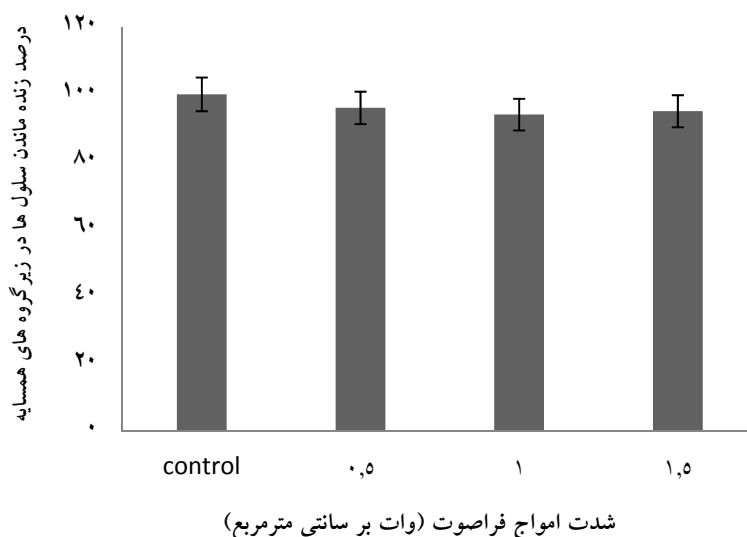
سانتی‌مترمربع برابر با ۸۰ درصد است که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار می‌باشد ($P < 0/001$). میزان بقا در شدت ۱ وات بر سانتی‌مترمربع برابر با ۶۰ درصد ($P < 0/001$)، شدت ۱/۵ وات بر سانتی‌مترمربع برابر با ۳۴ درصد ($P < 0/001$) و در شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع برابر با ۵ درصد ($P < 0/001$) می‌باشد. هنگام تابش‌دهی به سلول‌ها جهت جلوگیری از مرگ سلولی ناشی از اثرات گرمایی امواج فراصوت، دمای محیط با استفاده از دماسنج اندازه‌گیری شد. بدین صورت که قبل از اعمال تابش به سلول‌ها، یک پلیت حاوی تنها محیط کشت، در حمام فراصوت در محدوده میدان نزدیک دستگاه قرار داده شد. سپس تحت تابش شدت‌های فراصوت ذکر شده قرار گرفت. هم‌زمان با تابش، یک دماسنج نیز درون حمام فراصوت قرار گرفته بود که تغییرات دمایی ایجاد شده را نشان می‌داد. با تابش امواج فراصوت با شدت ۲ وات بر سانتی‌مترمربع افزایش دما تا حدود ۴۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد و به دلیل این‌که تابش امواج فراصوت با این شدت با افزایش دما همراه بود و هدف ما در این مطالعه بررسی تغییر بیان ژن P53 در اثر ایجاد کاویتاسیون بود، این گروه از نمونه‌های اصلی جهت بررسی بیان ژن حذف شد. مقایسه میزان بقا در سلول‌های هدف با گروه کنترل نشان‌دهنده تأثیر افزایش شدت امواج فراصوت در مرگ سلولی می‌باشد.



شکل شماره ۲- درصد زنده ماندن سلول ها در زیرگروه های هدف در شدت های مختلف امواج فراصوت. علامت مربع نشان دهنده وجود تفاوت معنادار با گروه کنترل و error bar بیانگر انحراف معیار است.

۱ دقیقه برابر ۹۵ درصد، در شدت ۱ وات بر سانتی مترمربع و زمان ۱ دقیقه برابر با ۹۳ درصد و در شدت ۱/۵ وات بر سانتی مترمربع و زمان ۱ دقیقه برابر با ۹۷ درصد می باشد. عدم وجود تفاوت معنادار در میزان بقای سلولی بین سلول های همسایه و گروه کنترل بیانگر این است که محیط کشت سلول های هدف سبب القای مرگ سلولی در سلول های همسایه نشده است.

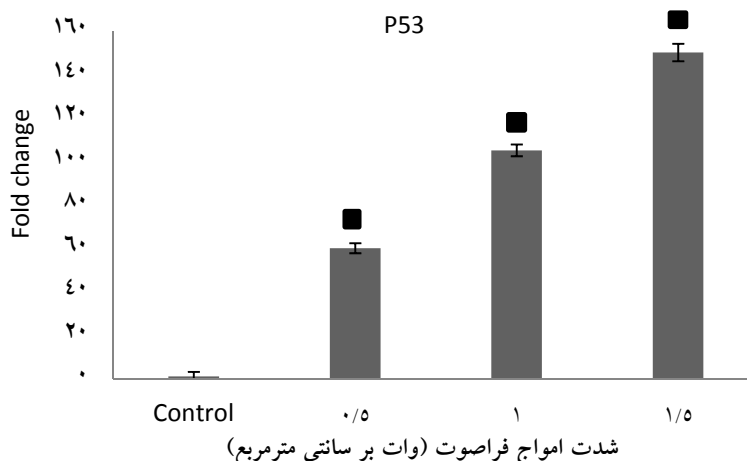
میزان بقای سلولی در سلول های همسایه در شدت های مختلف تابش فراصوت شماره ۳ به شکل شماره ۳ میزان بقای سلولی در سلول های تیمار شده با محیط کشت سلول های هدف که تحت تابش فراصوت قرار گرفته اند، نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری ندارد ($P > 0.05$). میزان بقا در شدت ۰/۵ وات بر سانتی مترمربع و زمان



شکل شماره ۳- درصد زنده ماندن سلول ها در زیرگروه های همسایه در شدت های مختلف امواج فراصوت. error bar بیانگر انحراف معیار است. میزان بیان ژن P53 در سلول های همسایه

سانتی مترمربع ۶۰ برابر و در شدت ۱ وات بر سانتی متر مربع ۱۰۵ برابر کنترل است و این مقادیر در مقایسه با بیان ژن در گروه کنترل، قابل توجه می باشد.

باتوجه به شکل شماره ۴ میزان بیان ژن P53 در سلول های همسایه نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان می دهد ($P < 0.05$). میزان بیان این ژن در شدت ۱/۵ وات بر سانتی مترمربع برابر با ۱۵۰ برابر کنترل می باشد، در حالی که مقدار آن در شدت ۰/۵ وات بر



شکل شماره ۴- میزان بیان ژن P53 در زیرگروه‌های همسایه با شدت‌های مختلف امواج فراصوت. علامت مربع نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار با گروه کنترل و error bar بیانگر انحراف معیار است.

P53 در گروه همسایه نشان‌دهنده وجود مکانیسمی (تولید رادیکال‌های آزاد) در محیط می‌باشد که احتمالاً در مهار رشد و تکثیر سلول‌های توموری نقش مثبتی را ایفا می‌کند.

نتیجه‌گیری

استفاده از امواج فراصوت که به‌عنوان یکی از روش‌های درمانی برای برخی از سرطان‌ها تلقی می‌شود، ضمن ایجاد بروز آسیب در سلول‌های موجود در میدان تابش فراصوت می‌تواند به سلول‌های خارج از این میدان نیز سیگنال‌های بیولوژیکی ارسال کند که این مسئله سبب بروز آثاری از جمله بالا رفتن بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه می‌شود. ژن P53 می‌تواند سبب توقف رشد و تکثیر سلولی و همچنین القای آپوپتوز شده، این فرآیند می‌تواند احتمالاً سبب کنترل رشد و تکثیر سلول‌های خارج از میدان تابش شود. در واقع تابش فراصوت در سلول‌های توموری که در پیرامون تومور هستند و در حقیقت جزء حجم مشخص تومور Gross Tumor Volume (GTV) تلقی نمی‌شوند نیز اثر گذاشته، باعث بروز تغییرات ژنتیکی در آن‌ها می‌شود. این مسئله باعث می‌شود میدان بیولوژیکی فراصوت بزرگ‌تر از میدان تابش واقعی باشد. در صورت بروز این پدیده انتظار می‌رود بازده درمان فراصوت تغییر پیدا کند. این مطالعه یک بررسی پایه بوده و به‌تنهایی منجر به ارائه یک راهکار بالینی نمی‌شود و برای نتیجه‌گیری جامع نیاز به انجام مطالعات گسترده در این زمینه با تعداد بیشتری رده‌های سلولی توموری و نرمال و نیز مطالعات در مدل حیوانی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله قسمتی از کار پایان نامه کارشناسی ارشد است

بحث

پس از انجام تست Real-time PCR در سلول‌های همسایه مشاهده شد که میزان بیان این ژن در شدت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل افزایش داشته‌است. هرچه شدت امواج فراصوت تابیده بر گروه هدف بیشتر باشد، میزان تغییر بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه بیشتر می‌شود. در مطالعه Koturbash و همکاران در سال ۲۰۰۸ با تابش پرتو یونیزان بر قسمتی از سر موش و پوشاندن بقیه بدن با شیلد سربی اثر همسایگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان ژن P53 در بافت طحال که به‌عنوان بافت همسایه در نظر گرفته شده بود، افزایش یافت. بررسی‌ها نشان داد بالا رفتن سطح P53 در طحال ناشی از پراگندگی یا حفاظت نادرست عضوهای دیگر نمی‌باشد، بلکه ناشی از وجود اثر همسایگی پرتوهای یونیزان و تأثیر آن بر بیان ژن سرکوبگر P53 می‌باشد [۲۱]. برخی از مطالعات دیگر نیز نشان‌دهنده تغییر بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه است، برای مثال در مطالعه‌ای که بر روی سلول‌های اپی‌تلیال ریه موش انجام شد، افزایش بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه بعد از تابش با استفاده از ذرات آلفا گزارش شد. همچنین Olsson و همکاران با مطالعه اثر همسایگی در مدل *in vitro* بر روی رده سلولی HepG2 متوجه افزایش بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه شدند [۵]. نتایج این مطالعه افزایش بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه را اثبات می‌کند که این مسئله نشان می‌دهد سلول‌های هدف، تحت تابش فراصوت، سیگنال‌هایی در محیط ایجاد کرده‌اند و زمانی که محیط حامل این سیگنال‌ها به سلول‌های گروه همسایه که هیچ‌گونه تابشی دریافت نکرده‌اند منتقل می‌شود بر روی سلول‌های همسایه اثر گذاشته، سبب تغییر بیان ژن P53 می‌شود. افزایش بیان ژن

پزشکی اصفهان به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات لازم تشکر و قدردانی می‌شود.

که از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به خاطر حمایت مالی و همچنین آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم

References:

- [1] Calatayud MP, Asin L, Tres A, Goya GF, Ibarra MR. Cell bystander effect induced by radiofrequency electromagnetic fields and magnetic nanoparticles. *Curr Nanosci* 2016; 12(3): 372-7.
- [2] Boyd M, Ross SC, Dorrens J, Fullerton NE, Tan KW, Zalutsky MR, et al. Radiation-induced biologic bystander effect elicited in vitro by targeted radiopharmaceuticals labeled with α -, β -, and Auger electron-emitting radionuclides. *J Nucl Med* 2006; 47(6): 1007-15.
- [3] Burdak-Rothkamm S, Rothkamm K. Radiation-induced bystander and systemic effects serve as a unifying model system for genotoxic stress responses. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2018; 42(5): 221-8.
- [4] Marin A, Martin M, Linan O, Alvarenga F, López M, Fernández L, et al. Bystander effects and radiotherapy. *Rep Pract Oncol Radiother* 2015; 20(1): 12-21.
- [5] Olsson MG, Nilsson EC, Rutardóttir S, Paczesny J, Pallon J, Akerstrom B. Bystander cell death and stress response is inhibited by the radical scavenger α 1-microglobulin in irradiated cell cultures. *Radiat Res* 2010; 174(5): 590-600.
- [6] Bazak J, Fahey JM, Wawak K, Korytowski W, Girotti AW. Bystander effects of nitric oxide in anti-tumor photodynamic therapy. *Cancer Cell Microenviron* 2017; 4(1).
- [7] Chen Z, Xie MX, Wang XF, Lu Q. Different effects of therapeutic ultrasound parameters and culture conditions on gene transfection efficiency. Chinese. *J Cancer Res* 2008; 20(4): 249-54.
- [8] Miller DL, Smith NB, Bailey MR, Czarnota GJ, Hynynen K, Makin IRS, et al. Overview of therapeutic ultrasound applications and safety considerations. *J Ultrasound Med* 2012; 31(4): 623-34.
- [9] Sazgarnia A, Shanei A. Evaluation of acoustic cavitation in terephthalic acid solutions containing gold nanoparticles by the spectrofluorometry method. *Int J Photoenergy* 2012; 37(6): 105-10.
- [10] Kaufman GE. Mutagenicity of ultrasound in cultured mammalian cells. *Ultrasound Med Biol* 1985; 11(3): 497-501.
- [11] Hei TK. Cyclooxygenase-2 as a signaling molecule in radiation-induced bystander effect. *Mol Carcinog* 2006; 45(6): 455-60.
- [12] Han W, Chen S, Yu K, Wu L. Nitric oxide mediated DNA double strand breaks induced in proliferating bystander cells after α -particle irradiation. *Mutat Res* 2010; 684(1): 81-9.
- [13] Yakovlev VA. Role of nitric oxide in the radiation-induced bystander effect. *Redox Biol* 2015; 6: 396-400.
- [14] Yahyapour R, Motevaseli E, Rezaeyan A, Abdollahi H, Farhood B, Cheki M, et al. Mechanisms of Radiation Bystander and Non-Targeted Effects: Implications to Radiation Carcinogenesis and Radiotherapy. *Curr Radiopharm* 2018; 11(1): 34-45
- [15] Barati AH, Mokhtari -Dizaji M, Mozdarani H, Bathaei SZ, Hassan ZM. Free hydroxyl radical dosimetry by using 1 MHz low level ultrasound waves. *Iran J Radiat Res* 2006; 3(4): 163-9.
- [16] Furusawa Y, Hassan MA, Zhao QL, Ogawa R, Tabuchi Y, Kondo T. Effects of therapeutic ultrasound on the nucleus and genomic DNA. *Ultrason Sonochem* 2014; 21(6): 2061-8.
- [17] Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the P53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996; 42(6): 858-68.
- [18] Souza RP, Bonfim-Mendonca PS, Ratti BA, Kaplum V, Bruschi ML, Nakamura CV, et al. Oxidative Stress Triggered by Apigenin Induces Apoptosis in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer-Derived Cell Lines. *Oxid Med Cell Longev* 2017; 15(1): 18-25.
- [19] Hamada N, Matsumoto H, Hara T, Kobayashi Y. Intercellular and intracellular signaling pathways mediating ionizing radiation-induced bystander effects. *J Radiat Res* 2007; 48(2): 87-95.
- [20] Chaudhry MA. Bystander effect: biological endpoints and microarray analysis. *Mutat Res* 2006; 597(1): 98-112.
- [21] Koturbash I, Loree J, Kutanzi K, Koganow C, Pogribny I, Kovalchuk O. In vivo bystander effect: cranial X-irradiation leads to elevated DNA damage, altered cellular proliferation and apoptosis, and increased P53 levels in shielded spleen. *Int J Rad Oncol Biol Phys* 2008; 70(2): 554-62.