

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 شانی^۳، محمد کاظمی^۴، سید حسین حجازی^۵

خلاصه:

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

مواد و روش‌ها: سلول‌ها به سه گروه کنترل (بدون درمان)، هدف (سلول‌های در معرض تابش امواج فراصوت) و همسایه (سلول‌های تابش ندیده 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 به ترتیب باستفاده 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 به‌دبان تابش پرتوهای یونیزان 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 ۳۵۱-۳۴۴

به‌طوری که سلول‌های تابش دیده استرس ایجاد شده را به دیگر سلول‌ها منتقل می‌کنند و باعث بروز آثار در سلول‌های تابش ندیده 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 حالی که مطالعات زیادی بروز اثر همسایگی به‌دبان تابش پرتوهای یونیزان را اثبات کرده‌اند، اندک مطالعاتی در مورد اثر همسایگی پرتوهای غیریونیزان انجام شده است. نتایج بررسی اثر همسایگی درنتیجه تابش امواج غیریونیزان رخداد این پدیده را به اثبات رسانده است. درنتیجه می‌توان اصطلاح اثر همسایگی را برای پرتوهای غیریونیزان نیز به کار 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 قادر این نانوذرات می‌شود [۱]. مطالعه Girotti و همکاران نشان داد استرس ایجاد شده درنتیجه تابش نور در حضور حساس‌کننده نوری (فتودینامیک‌ترایپ) در سلول‌های سرطان پروستات از طریق فاکتورهایی از جمله رادیکال NO سبب بروز آثار بیولوژیکی در سلول‌های تابش ندیده می‌شود [۶]. امواج فراصوت به‌طور گسترده در اقدامات تشخیصی و نیز روش‌های درمانی از جمله فیزیکال‌ترایپ بالینی و تحويل دارو یا

مقدمه

تابش پرتوهای یونیزان به بافت، ضمن بروز آثار پرتونی در سلول‌هایی که تحت تابش مستقیم پرتو بوده‌اند، باعث بروز آثار بیولوژیکی در سلول‌های تابش ندیده همسایه می‌شود که به این مکانیسم اثر همسایگی می‌گویند [۱-۳]. 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 پزشکی، دانشگاه 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

* لشانی نویسنده مسئول:

اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی، دانشکده پزشکی، گروه فیزیک پزشکی
تلفن: ۰۳۱ ۳۷۹۲۹۰۸۰-۰۳۲
دوزنیوس: ۰۳۱ ۳۷۹۲۹۰۳۲

پست الکترونیک: A.shanei1397@gmail.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۱۳۹۸/۳/۱۱
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۰

افزایش بیان ژن P53 و کاهش میزان عوامل کمک کننده به پیشرفت چرخه سلول در سلول های همسایه مشاهده شده است. با توجه به آثار ژنتیکی ایجاد شده در سلول های همسایه توسط پرتو های یونیزان [۱۸] و همچنین ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول های هدف که به طور مستقیم تحت تابش امواج فرا صوت قرار گرفته اند [۱۶]، می توان احتمال ایجاد تغییرات ژنتیکی در سلول های همسایه میدان تابش امواج فرا صوت درمانی را پیش بینی نمود. برای رسیدن به این منظور و با توجه به مطالعات انجام شده مبنی بر ایجاد رادیکال های آزاد در محیط، توسط شدت های ذکر شده به بررسی میزان بیان ژن P53 در سلول های همسایه در شدت های مختلف پرداخته و نتایج با سلول های کنترل مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

رده سلولی و شرایط کشت

رده سلولی Hela از انتستیتوپاستور ایران خریداری شد و درون فلاسک استریل در محیط کشت (GIBCO, RPMI-1640) درصد و ۱۰ (Fetal Bovine Serum) FBS حاوی Germany آنتی بیوتیک های استرپتومایسین (Biosera, France) ۱ mg/ml و بینی سیلین (Biosera, France) ۱۰۰۰ units/ml، در انکوپاتور ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵ درصد دی اکسید کربن در یک محیط مروطوب، کشت و تکثیر داده شد. بعد از ۳-۴ روز که سلول ها به صورت تک لایه کف فلاسک را پوشاندند، توسط آنزیم تریپسین Ethylenediaminetetraacetic EDTA درصد همراه با ۰/۲۵ از کف فلاسک جدا شده و پس از شمارش به پلیت های ۱۲ چاهک (تعداد 5×10^4 سلول به ازای هر چاهک) جهت انجام آزمایش های لازم منتقل شد.

دستگاه فرآصوت

امواج فراصوت بالاستفاده از يك دستگاه فراصوت درمانی A215) EMS، شركت مهندسي پژوهشگي نوين، تهران و شركت Berkshire Reading انگلستان) در مد پيوسته با فرکانس ۱ مگاهرتز و حداكثر شدت ۲ وات بر سانتي متر مربع با ترانسلديوسير دارای سطح مقطع ۷ سانتي متر مربع، به سلول ها تابيده شد. كالibrاسيون دستگاه در يك مخزن آب تصفيه شده بدون وجود هوا و هدمها با محيط انجام شد. در اين مخزن آب، يك صفحه دائريه اى پلاستيكى که نقش جاذب پرتو فراصوت را بازي می کند، وجود دارد که می تواند نيروى ناشی از موج فشارى را که به سطح آن وارد مي شود، تحمل کند. اين نيروى جذب شده بالاستفاده از يك

ژن به سلول‌ها استفاده می‌شود [۷]. بروز آثار بیولوژیکی در بافت‌های بدن بعد از تابش امواج فراصلوت درمانی به اثبات رسیده است [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 متمن‌کرنشده در محل تخریب حفره‌ها (کاویتاسیون) سبب پیرویز ححال‌ها 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 حل شده در ححال واکنش می‌دهند. تولید رادیکال‌های آزاد در محلول‌های آبی که در معرض تابش پالس‌های فراصوتی با سطوح تشخیصی قرار گرفته‌اند، نیز گزارش شده است [۱۰]. در مطالعات با پرتوهای یونیزان مکانیسم انتقال اثر همسایگی از طریق اتصالات بین سلولی [۱۱] و نیز آزادسازی فاکتورهای محلول از سلول‌های تابش‌دیده شامل رادیکال‌های آزاد حاوی اکسیژن (ROS)، H_2O_2 و NO بیان شده است که به طور 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 ذکر شده، رادیکال هیدروکسیل (ROH) نیز به عنوان عامل انتقال سیگناال‌های همسایگی معرفی شده است [۱۴]. با توجه به نقش اساسی رادیکال‌های آزاد در فرآیند انتقال سیگناال‌های همسایگی پیش‌بینی قابلیت ایجاد آثار بیولوژیکی در سلول‌های همسایه را داشته می‌شود امواج فراصلوت درمانی به دلیل 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 فراصلوت درمانی انجام شده است که این تحقیقات تأثیر امواج فراصلوت در میزان بیان ژن‌ها در سلول‌های تحت تابش را به اثبات رسانده است [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 مکانیسم‌های 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 میزان این ژن باعث رشد پیشتر سلول‌های توموری و نیز ایجاد مقاومت در برابر شیمی‌درمانی و پرتو درمانی در این سلول‌ها شد [۱۷]. در این مطالعه از بررسی اثر همسایگی فراصلوت روی رده سلولی Hela که القای سیگناال‌های همسایگی به دنبال تابش پرتوهای یونیزان در آن به اثبات رسیده است، استفاده شد [۱۸]. در مطالعات مروری Hamada و همکاران [۱۹] و همچنین [۲۰] به مطالعات زیادی اشاره شده است 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 ۳۰ (Sigma, USA) USA MTT محلول (Sigma, USA) 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 هریک از چاهک‌های پلیت ۱۲ چاهکی به چاهک‌های پلیت ۹۶ چاهکی منتقل شد. درنهایت، با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Stat Fax 2100)، تراکم نوری چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. پس از بدست آوردن میزان چگالی نوری (Optical Density) چاهک‌های مختلف با استفاده از رابطه زیر درصد بقای سلولی محاسبه شد.

$$\times 100 \times (\text{میانگین چگالی نوری نمونه کنترل} - \text{میانگین چگالی نوری نمونه مورد آزمون}) / \text{درصد بقای سلول}$$

Real-time PCR و RNA جداسازی

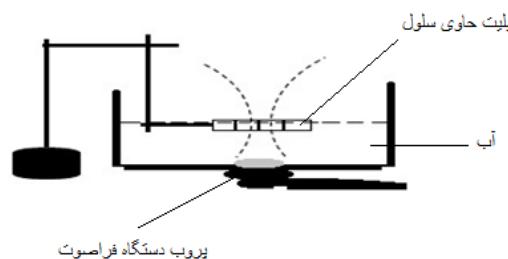
استخراج RNA طبق پروتکل کیت شرکت بایوفکت BioFACT™ Total RNA Prep Kit (Biofact, Korea) طبق پروتکل شرکت سازنده از تعداد 15×10^4 سلول به ازای هر زیرگروه صورت پذیرفت و سپس مقدار ۵ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از کیت سترا cDNA شرکت بایوفکت ۲X (Onestep RT PCR Master Mix kit) پرایمر oligoT به cDNA تبدیل شد. پرایمرهای طراحی شده برای بررسی ژن‌های P53 و GAPDH در جدول شماره ۱ آمده‌است. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Real-time polymerase chain reaction (PCR Master Mix) (Biofact, Korea) که شامل SYBR Green می‌باشد، ارزیابی شد. ژن GAPDH به عنوان ژن کنترل یا ژن خانه‌دار می‌باشد و از رابطه $\Delta\Delta Ct$ برای بررسی سطح بیان ژن‌های موردنظر استفاده شد.

برنامه زمانی-دمازی دستگاه ریل تایم-PCR (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 پلیمراز 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 فرماصوتی تبدیل می‌شود.

تابش فرماصوت به سلول‌های Hela

پس از این که سلول‌ها، کف فلاسک را به طور کامل پر کردند، با استفاده از تریپسین با غلظت $0.25\text{ mg}/\text{ml}$ درصد از کف فلاسک جدا شده، بعد از شمارش، درون پلیت‌های ۱۲ چاهک کشت داده شدند (10×5 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 فرماصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت 0.5 W/cm^2 وات بر سانتی‌مترمربع و در زمان ۱ دقیقه، ۳- گروه تحت تابش فرماصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت ۱ وات بر سانتی‌مترمربع در زمان ۱ دقیقه، ۴- گروه تحت تابش فرماصوت با فرکانس ۱ مگاهرتز و شدت 0.5 W/cm^2 وات بر سانتی‌مترمربع در زمان ۱ دقیقه و ۵- گروه تحت تابش فرماصوت 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 تابش‌دهی محیط کشت پلیت‌های هدف با محیط کشت تازه عوض و اطراف آنها با استفاده از پارافیلم پوشانده شد. سپس هر کدام از این پلیت‌ها درون حمام فرماصوت مطابق شکل شماره ۱ در محدوده میدان نزدیک (Near field) دستگاه فرماصوت قرار گرفت و تابش‌دهی صورت پذیرفت. پس از تابش، پلیت‌ها درون انکوباتور قرار گرفتند. بعد از گذشت ۱ ساعت از زمان تابش امواج فرماصوت، محیط کشت پلیت‌های هدف با استفاده از سرنگ تخلیه و پس از عبور از فیلتر سرسنگی با سایز $0.2\text{ }\mu\text{m}$ ، به منظور جلوگیری از انتقال سلول‌های هدف به پلیت‌های همسایه، انتقال محیط کشت انجام شد.



شکل شماره ۱- شماتیک نحوه تابش‌دهی سلول‌ها توسط دستگاه فرماصوت

MTT assay
برای بررسی میزان بقای سلول‌های Hela در گروه‌های

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

گرفت. در مرحله دوم، واکنش تکثیری DNA در ۴۰ سیکل و با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد 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'- TGGTATCGTGGAAAGGACTC- 3 reverse primer 5'- AGTAGAGGCAGGGATGATG- 3 |
| P53 | NM_000546.5 | forward primer 5'- TCTGACTGTACCACCATCCACTA- 3 reverse primer 5'- CAAA ACGCACCTCAA AGC- 3 |

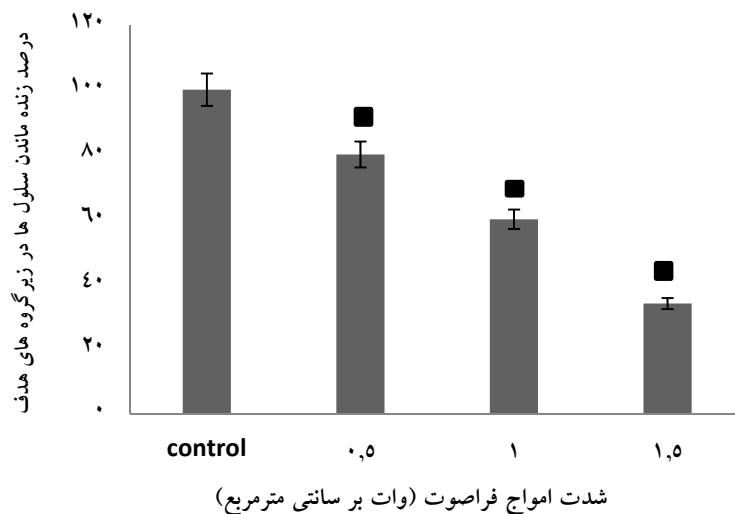
سانتی متر مربع برابر با ۸۰ درصد است که در مقایسه با گروه کنترل اختلاف معنادار می‌باشد ($P<0.001$). میزان بقا در شدت ۱ وات بر سانتی متر مربع برابر با ۶۰ درصد ($P<0.001$)، شدت ۱/۵ وات بر سانتی متر مربع برابر با ۳۴ درصد ($P<0.001$) و در شدت ۲ وات بر سانتی متر مربع برابر با ۵ درصد ($P<0.001$) می‌باشد. هنگام تابش دهی به سلول‌ها جهت جلوگیری از مرگ سلولی ناشی از اثرات گرمایی امواج فرماصوت، دمای محیط بالاستفاده از دما منج اندازه گیری شد. بدین صورت که قبل از اعمال تابش به سلول‌ها، یک پلیت حاوی تنها محیط کشت، در حمام فرماصوت در محدوده میدان نزدیک دستگاه قرار داده شد. سپس تحت تابش شدت‌های فرماصوت ذکر شده قرار گرفت. همزمان با تابش، یک دما منج نیز درون حمام فرماصوت قرار گرفته بود که تغییرات دمایی ایجاد شده را نشان می‌داد. با تابش امواج فرماصوت با شدت ۲ وات بر سانتی متر مربع افزایش دما تا حدود ۴۰ درجه سانتی گراد مشاهده شد و بدلیل این که تابش امواج فرماصوت با این شدت با افزایش P53 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 فرماصوت در مرگ سلولی می‌باشد.

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 ویرش ۲۲ (IL SPSS Inc) بود.

نتایج

میزان بقا سلول‌های هدف در شدت‌های مختلف تابش فرماصوت سنجش میزان بقا سلولی در سلول‌های هدف در شدت‌های مختلف با تست MTT انجام شد. امواج فرماصوت با شدت‌های ۱/۵، ۱ و ۲ وات بر سانتی متر مربع و زمان ۱ دقیقه بر سلول‌ها تأییده شد. همان‌گونه که شکل شماره ۲ نشان می‌دهد، بیشترین میزان مرگ در شدت ۲ وات بر سانتی متر مربع اتفاق افتاده است. با توجه به شکل شماره ۲ میزان بقا در شدت ۰/۵ وات بر

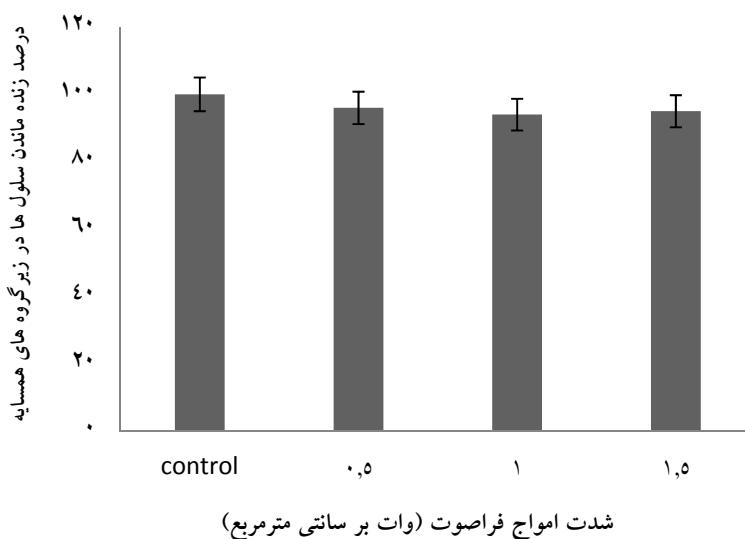


شکل شماره ۲- درصد زنده‌ماندن سلول‌ها در زیرگروه‌های هدف در شدت‌های مختلف امواج فراصوت. علامت مرتع نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار با گروه کنترل و بیانگر \pm انحراف معیار است.

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 می‌باشد. عدم وجود تفاوت معنادار در میزان بقای سلولی بین سلول‌های همسایه و گروه کنترل بیانگر این است که محیط کشت سلول‌های هدف سبب القای مرگ سلولی در سلول‌های همسایه نشده است.

میزان بقای سلولی در سلول‌های همسایه در شدت‌های مختلف تابش فردا

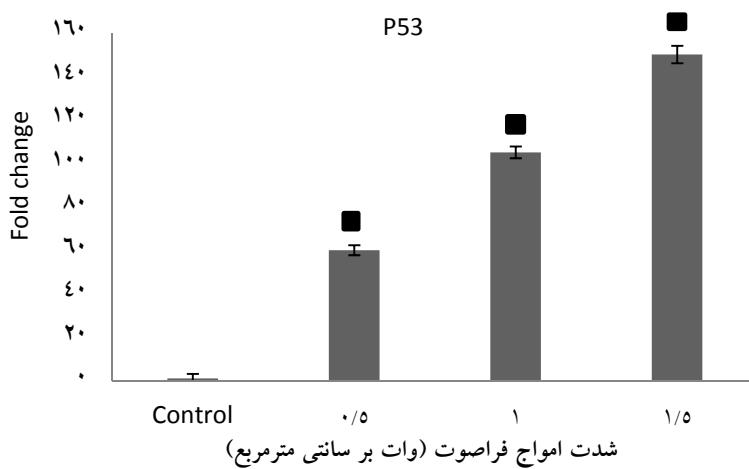
با توجه به شکل شماره ۳ میزان بقای سلولی در سلول‌های تیمارشده با محیط کشت سلول‌های هدف که تحت تابش فردا قرار گرفته‌اند، نسبت به گروه کنترل تفاوت معناداری ندارد ($P>0.05$). میزان بقا در شدت ۰/۵ وات بر سانتی مترمربع و زمان



شکل شماره ۳- درصد زنده‌ماندن سلول‌ها در زیرگروه‌های همسایه در شدت‌های مختلف امواج فردا. علامت مرتع نشان‌دهنده وجود تفاوت معنادار با گروه کنترل و بیانگر \pm انحراف معیار است. میزان بیان ژن P53 در سلول‌های 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 می‌باشد.

با توجه به شکل شماره ۴ میزان بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری نشان می‌دهد ($P<0.05$). میزان بیان این ژن در شدت ۱/۵ وات بر سانتی مترمربع برابر با ۱۵۰ برابر کنترل می‌باشد، در حالی‌که مقدار آن در شدت ۰/۵ وات بر



شکل شماره ۴- میزان بیان ژن P53 در زیرگروه‌های همسایه با شدت‌های مختلف امواج فراصوت. علامت مریع 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 به عنوان 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 به تنهایی 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 ژن در شدت‌های مختلف نسبت به گروه کنترل افزایش داشته است. هرچه شدت امواج فراصوت تا پایه 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 یونیزهای بر قسمتی از سرموش و پوشاندن بقیه بدن با شیلد سربی اثر همسایگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد بیان ژن P53 در بافت طحال که به عنوان بافت همسایه در نظر گرفته شده بود، افزایش یافت. بررسی‌ها نشان داد بالارفتن سطح P53 در طحال ناشی از پراگندگی یا حفاظت نادرست عضوهای دیگر نمی‌باشد، بلکه ناشی از وجود اثر همسایگی پرتوهای یونیزهای 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 اپی‌تیالی ریه موش انجام شد، افزایش بیان ژن P53 در سلول‌های همسایه بعد از تابش باستفاده از ذرات آلفا گزارش شد. همچنین Olsson و همکاران با مطالعه اثر همسایگی در مدل *in vitro* با مطالعه اثر همسایگی در مدل 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 هیچ گونه تابشی دریافت نکرده‌اند منتقل می‌شود بر روی سلول‌های همسایه اثر گذاشته، سبب تغییر بیان ژن P53 می‌شود. افزایش بیان ژن

پژوهشکی اصفهان به خاطر در اختیار گذاشتن امکانات لازم تشرک و
قدرتمندی می شود.

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 a-, b-, 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, Shafei 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, Mottevaseli 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, Mozdaran 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-Mendonça 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.

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