

Investigation of morphological behavior of large vessel human endothelial cells during radiation therapy based on cytoskeleton imaging

Alireza Mohammadkarim¹, Manijhe Mokhtari-Dizaji^{2*}, Ali Kazemian³, Hazhir Saberi⁴,
Mohammad Mehdi Khani⁵, Seyed Mohammad Tabatabaei⁶, Mohsen Bakhshandeh⁷

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Professor, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- Associated Professor, Radiotherapy Oncology Research Center, Cancer Institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Radiology, Imam Khomeini Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 5- Assistant Professor, Department of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, School of Advanced Technologies in Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 6- Ph.D. Candidate, Cardiovascular Engineering Lab, Faculty of Biomedical Engineering, Amir kabir University of Technology, Tehran, Iran
- 7- Associated Professor, Radiology Technology Department, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Medical Physics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: mokhtarm@modares.ac.ir

Received: 04/Jun/2017, Accepted: 27/Jul/2017

Abstract

Objective: Pathological changes to endothelial cells of the vessel wall may lead to vascular stenosis. In this study, we investigate damages that appear following radiotherapy in two states, single fraction and fractionation irradiation, as an effective sign of cytoskeletal and nuclei structure of vascular wall endothelial cells.

Methods: We irradiated human vein endothelial cells (HUVECs) with a Cobalt-60 therapy machine at radiation doses of 0, 2, 4, and 8 Gy. We stained the skeletal structure of the membrane and nuclei within 24 h after irradiation. This cell line received fractionation radiation therapy at doses from 0 to 8 Gy, in sub-fractions of 2 Gy, after which we stained the cytoskeleton. Morphological parameters such as area and perimeter of the cells and nuclei were determined, and we evaluated the cell shape index (CSI) for cells from each group.

Results: Increasing the irradiation dose from 0 to 8 Gy led to a significant decrease of CSI (approximately 56%) and a significant increase of nuclei shape index (approximately 85%; $p < 0.05$). The cells' areas and nuclei doubled ($p < 0.05$). CSI parameter significantly decreased approximately 23% (4.5 times lower) during the radiotherapy fraction after application of the 8 Gy compared with control group cells.

Conclusion: After irradiation, we observed broken the membrane filaments that resulted in a new configuration, which led to increased cell and nuclei sizes along with alterations in the cell shape. Radiation therapy led to dose-dependent changes in morphological behavior response of the endothelial cells. Hence, it would be considered as a prognostic factor for behavior of healthy vascular cells in the process of radiotherapy.

Keywords: Endothelial cells, Cytoskeleton, Morphology, Radiation therapy

بررسی رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال عروق بزرگ انسانی در فرآیند پرتودرمانی بر مبنای تصویربرداری اسکلت سلولی

علیرضا محمد کریم^۱، منیژه مختاری دیزجی^{۲*}، علی کاظمیان^۳، هژیر صابری^۴، محمدمهدی خانی^۵، سید محمد طباطبایی^۶، محسن بخشنده^۷

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، مرکز تحقیقات رادیوتراپی انکولوژی، انستیتو کانسر، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه رادیولوژی، بیمارستان امام خمینی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۵- استادیار، گروه مهندسی بافت، دانشکده فناوری های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۶- دانشجوی دکتری تخصصی، آزمایشگاه مهندسی قلب و عروق، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران
- ۷- دانشیار، گروه تکنولوژی پرتوشناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه فیزیک پزشکی

Email: mokhtarm@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۵/۰۴

دریافت مقاله: ۹۶/۰۳/۱۴

چکیده

هدف: هر گونه تغییر پاتولوژیک در سلول‌های اندوتلیال دیواره عروق، می‌تواند موجب تصلب شریان شود. در این مطالعه میزان آسیب پرتودرمانی در دو حالت تابش‌دهی یک باره و تقطیع تابش به‌عنوان یک عامل مؤثر روی اسکلت سلول و هسته اندوتلیال دیواره عروق بررسی می‌شود.

مواد و روش‌ها: سلول‌های اندوتلیال ورید انسانی تحت تابش‌دهی یک باره دوزهای تابشی ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ گری با استفاده از ماشین درمانی کبالت-۶۰ قرار گرفتند. طی مدت ۲۴ ساعت بعد از تابش‌دهی، ساختار اسکلتی غشا و هسته آن‌ها رنگ‌آمیزی شد. همچنین، پرتودرمانی تقطیعی روی رده سلولی مذکور با اعمال محدوده دوزهای بین ۰ تا ۸ گری با گام‌های افزایشی ۲ گری در هر جلسه اعمال شد. پس از تابش، ساختار اسکلتی سلول‌ها رنگ‌آمیزی شد. پارامترهای ریخت‌شناسی شامل تغییر سطح و محیط سلول و هسته استخراج و بر اساس آن، شاخص شکل سلولی برای سلول‌های هر گروه حاصل شد.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد، با افزایش دوز از ۰ تا ۸ گری، کاهش معنی‌دار ۵۶ درصد در شاخص شکل سلول و افزایش معنی‌دار ۸۵ درصد در شاخص هسته سلول‌ها حاصل شد ($P < ۰/۰۵$)، هر چند مساحت سلول و هسته ۲ برابر می‌شود ($P < ۰/۰۵$). در مقایسه شاخص شکل سلولی (مساحت سلول) در پرتودهی تقطیع تابش به ازای دوز اعمالی ۸ گری کاهش معنی‌دار ۲۳ درصد (۴/۵ برابر) را نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P < ۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با تابش پرتو، فیلامان‌های غشا شکسته شده و پیکربندی جدیدی ایجاد می‌شود که موجب افزایش و تغییر شکل معنی‌دار ابعاد سلول و هسته خواهد شد. فرآیند پرتودرمانی منجر به تغییر در پاسخ رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال به ازای اعمال مقادیر مختلف دوز می‌شود و این امر می‌تواند به‌عنوان هشدار در رفتار سلول‌های سالم عروقی در فرآیند پرتودرمانی محسوب شود.

کلیدواژگان: سلول‌های اندوتلیال، اسکلت سلولی، ریخت‌شناسی، پرتودرمانی

مقدمه

لایه داخلی عروق مشتمل بر یک ردیف از سلول‌های اندوتلیال است که سمت درونی آن در تماس با سلول‌های خونی قرار می‌گیرد [۱]. این سلول‌ها به‌طور مداوم در معرض تحریکات بیومکانیکی و بیوشیمیایی خون قرار دارند و ایجاد آسیب در اجزای آن‌ها می‌تواند با تصلب شراین که شایع‌ترین بیماری دیواره شریانی است، در ارتباط باشد [۲]. تنگی شریان نیز به وقوع تغییرات فیزیکی در سلول‌های اندوتلیال دیواره عروق نسبت داده می‌شود. تصلب شراین به عارضه‌ای اطلاق می‌شود که در اثر تنگی شریان، عبور خون با مشکل مواجه شود که این امر در دیواره داخلی عروق با قطر متوسط و بزرگ حادث می‌شود [۳]. ردیفی از سلول‌های اندوتلیال در کنار هم لایه اندوتلیوم را تشکیل می‌دهند. اندوتلیوم به‌طور مداوم حامل‌های مربوط به انتقال مواد بین جریان خون و رگ را فراهم می‌نماید و نقش فعال‌سازی عملکرد فیزیولوژیکی رگ را عهده‌دار است. همچنین لایه اندوتلیوم به تغییرات محیطی در ماتریس خارج سلولی واکنش متناسب را نشان می‌دهد تا عملکرد طبیعی سیستم عروقی حفظ شود [۴-۶]. سلول‌های اندوتلیال از لحاظ ساختاری سلول‌های چسبنده و دوکی شکل هستند [۴]. شکل ظاهری یک سلول، متأثر از ساختار اسکلتی آن سلول است [۷، ۸]. آن‌طور که مطالعات گذشته نشان داده‌اند، اعمال هر مؤلفه فیزیکی خارجی به سلول‌ها که منجر به ایجاد تغییر معنی‌دار در اسکلت سلولی شود، تغییرات معنی‌داری را نیز در پارامترهای مرتبط با ریخت‌شناسی ایجاد می‌نماید [۹-۱۱].

یکی از پارامترهای اساسی در بررسی‌های ریخت‌شناسی سلول‌ها، شاخص شکل سلولی (Cell Shape Index: CSI) است که برای هر سلول از رابطه (۱) تعیین می‌شود [۷]:

$$CSI = \frac{4\pi S}{P^2} \quad (1)$$

S و P به‌ترتیب مساحت و محیط سلول است. مقدار پارامتر فوق برای هر سلول بین صفر تا یک است. با نزدیک شدن مقدار این پارامتر به عدد صفر، شکل ظاهری سلول به

رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال در فرآیند پرتودرمانی

حالت بیضی‌وار متمایل به خط کشیده نزدیک می‌شود. حال آن که با نزدیک شدن مقدار این شاخص به عدد ۱، سلول پهن شده و به شکل دایروی میل می‌کند.

عروق در بدن عموماً به‌عنوان بافت سالم در پرتودرمانی محسوب می‌شوند که در حین درمان تحت تابش پرتوهای اولیه و پراکنده قرار می‌گیرند و در اغلب موارد پرتوگیری آن‌ها اجتناب‌ناپذیر است [۳، ۱۲، ۱۳]. به‌طور کلی مطالعات سلولی که تا به امروز به‌منظور بررسی تأثیر پرتوهای یونیزان بر خصوصیات رفتاری سلول‌های اندوتلیال عروق بزرگ صورت گرفته است را می‌توان در دو قالب طبقه‌بندی نمود. در مطالعات دسته اول، محققین بقای سلول‌ها را در طول اعمال دوزهای مختلف پرتودرمانی و پاسخ سلول‌های اندوتلیال به پرتو را در شرایط مختلف تعیین نموده‌اند [۱۴، ۱۵]. مطالعات دسته دوم، بررسی کیفی ساختار اسکلتی سلول‌های اندوتلیال مختلف پس از دریافت دوزهای مختلف پرتوهای یونیزان را گزارش نموده است [۴، ۵، ۱۶]. همچنین، بررسی‌های گذشته نشان دادند رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های سرطانی سنگفرشی سر و گردن (Head and neck squamous cell carcinoma: HNSCC) در پی پرتودرمانی تغییر می‌نماید و این قبیل تغییرات در تک سلول‌های پرتوگیری نموده می‌تواند به‌عنوان نشانه‌ای از تغییر در منحنی بقای سلول‌های تابش‌گیری نموده محسوب شود [۹]. لیکن با وجود اهمیت بررسی کمی پارامترهای ریخت‌شناسی سلول‌ها به‌عنوان مقیاسی قابل اعتماد در برآورد پاسخ احتمالی سلول‌ها به پرتودرمانی، این مهم همواره در مورد سلول‌های اندوتلیال مورد غفلت واقع شده است.

نظر به این که تاکنون برآوردی از نقش آثار حاد ناشی از اعمال پرتوهای یونیزان بر رفتار ریخت‌شناسی اندوتلیوم گزارش نشده است، بنابراین در این مطالعه در ابتدا پارامترهای ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال به ازای تابش مقادیر مختلف دوزهای پرتوهای یونیزان بررسی می‌شود. این بررسی‌ها بر مبنای تصویربرداری از تغییر در اسکلت سلولی به انجام

می‌رسد. در ادامه، نظر به این که پرتودرمانی بالینی عموماً در قالب تقطیع تابش با دوزهای تابشی ۲ گری انجام می‌شود [۱۷]، بنابراین تعیین رفتار ریخت‌شناسی این سلول‌ها در فرآیند تقطیع تابش نیز بررسی و یافته‌های حاصل تجزیه و تحلیل می‌شود.

در این مطالعه، تأثیر پرتودرمانی تقطیعی ۸ گری با گام‌های ۲ گری بر تغییر رفتار ریخت‌شناسی سلول و هسته بررسی می‌شود. به علاوه با نتایج حاصل از تابش یک باره دوزهای ۰-۸ گری مقایسه می‌شود. با مقایسه نتایج حاصل از پرتودرمانی یک باره و پرتودرمانی تقطیعی بر ساختار اسکلت سلولی، امکان بررسی تأثیر احتمالی فرصت ترمیم، اختلال چرخه سلول میان جلسات متوالی تابش و فراهم خواهد شد.

مواد و روش‌ها

این مطالعه طی نامه‌ای به شماره ۵۲۵/۶۵۷۰ در تاریخ ۹۳/۱۰/۱۴ به تأیید کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه تربیت مدرس رسیده است.

کشت سلولی

رده سلول‌های اندوتلیال HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) که چرخه میتوزی آن‌ها حدوداً ۳۰ ساعت است، از انستیتو پاستور تهران تهیه شد. محیط کشت این سلول‌ها DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) (Sigma-Aldrich) (آمریکا) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS Fetal Bovine Serum) (Sigma-Aldrich، آلمان) است و برای نگهداری آن‌ها با شرایط نزدیک به درون بدن، از انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد گاز CO₂ که ساخته شرکت New Brunswick کشور آمریکا بود، استفاده شد. همچنین در هر مرحله به منظور جداسازی سلول‌ها از کف فلاسک، از تریپسین - EDTA (Trypsin Ethylenediaminetetraacetic acid) ۲۵ درصد (Sigma-Aldrich، آمریکا) استفاده شد.

پرتودهی با تابش فوتون‌های درمانی یونیزان

در مطالعات زیست‌شناسی پرتویی، بهترین زمان به منظور تابش‌دهی سلول‌های اندوتلیال انسانی HUVEC بین پاساژ چهارم تا هفتم است؛ چرا که عملاً بعد از پاساژ هفتم، شرایط پاسخ‌دهی مناسب این رده سلولی به علت پاساژهای مداوم، کاهش می‌یابد [۴]. در این مطالعه به منظور ایجاد شرایط یکسان فیزیکی برای تمامی نمونه‌های گروه‌های مختلف، سلول‌ها پس از پاساژ پنجم برای تابش‌دهی آماده‌سازی شدند. در تمامی روزهای بین دو پاساژ سلولی، روند طبیعی تکثیر سلول‌ها که در فلاسک‌های مخصوص کشت سلول‌های چسبنده در داخل انکوباتور نگهداری می‌شدند، توسط میکروسکوپ معکوس (Eclipse TE2000، ژاپن) ملاحظه می‌شد در طول تابش‌دهی‌ها تمامی گروه‌های سلولی در شرایط یکسان محیطی از قبیل شرایط دمایی قرار داشتند. برای این منظور سلول‌های مربوط به تمامی گروه‌ها به داخل پلیت‌های شش خانه ریخته شدند. پیش از انتقال سلول‌ها به درون پلیت‌های شش خانه، در انتهای خانه‌های پلیت یک لامل قرار داده شد تا در ادامه روی سلول‌های مرتبط با آن لامل‌ها رنگ آمیزی صورت پذیرد.

به منظور لحاظ نمودن عمق بیشینه دریافت روز، ۰/۵ سانتی‌متر محیط کشت روی هر یک از پلیت‌ها ریخته شد. پلیت‌های شش خانه به دقت توسط پارافیلیم بسته‌بندی شد و تحت تابش دستگاه درمانی کبالت-۶۰ بیمارستان شهدای تجریش با انرژی میانگین ۱/۲۵ مگا الکترون ولت (مدل Theratron 780C، کانادا) قرار گرفت. این دستگاه از نوع هم‌مرکز با شعاع دوران ۸۰ سانتی‌متر است. آهنگ دوز خروجی این دستگاه برای میدان ۲۰×۲۰ سانتی‌متر مربع در عمق ۱ سانتی‌متر در زمان انجام تحقیق حدود ۰/۸۸ گری بر دقیقه است. لازم به ذکر است پرتودرمانی بالینی بیماران نیز با دستگاه فوق بر منوال همین شرایط انجام می‌شد. به منظور جلوگیری از اثر پس پراکندگی پرتوها، به هنگام تابش‌دهی سلول‌ها، چند صفحه پرسپکس (Perspex) [فانتوم پلی استیرن (Polystyrene phantom) معادل بافت] زیر ظرف حاوی

رنگ‌آمیزی سلول‌ها و تصویربرداری از ساختار اسکلتی

به‌منظور فرآیند رنگ‌آمیزی سلول‌ها، بعد از آخرین پاساژ، سلول‌های هر گروه بر روی دو لامل فاقد پوشاننده (Coating) در بین هر شش خانه، کشت داده می‌شود. سپس سلول‌ها تثبیت (Fix) شده نموده و مراحل رنگ‌آمیزی انجام می‌شود. مراحل تثبیت نمودن و رنگ‌آمیزی غشا با استفاده از Alexa Fluor 488 phalloidin (Invitrogen، آمریکا) مطابق با آن چه پیشتر توسط گابریس (Gabrys) و همکارانش به اجرا گذاشته شده بود [۱۹]، در گروه‌های مختلف تابش یک باره و پرتودرمانی تقطیعی انجام شد. همچنین با به‌کارگیری Dapi (Sigma-Aldrich، آمریکا)، مراحل رنگ‌آمیزی هسته سلول‌ها با افزایش دوز اعمالی توسط روشی که توسط رامبوتس (Rombouts) و همکارانش تشریح شده است [۵]، انجام شد. به‌منظور مشاهده پیکربندی غشای سلول و رشته‌های اکٲین آن از تصویربرداری میکروسکوپ کانفوکال (TCS SP5 (Confocal microscopy) Leica Microsystem، آلمان) با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، در انستیتو پاستور ایران استفاده شد. همچنین به‌منظور رصد تغییرات ایجاد شده در ساختار هسته، از میکروسکوپ فلورسنت (Nikon 80i، ژاپن) با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر، مستقر در گروه بیوفیزیک دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس استفاده شد. تصاویر به‌دست آمده در هر مرحله به‌منظور تعیین پارامترهای ریخت‌شناسی استفاده شد.

تعیین پارامترهای ریخت‌شناسی

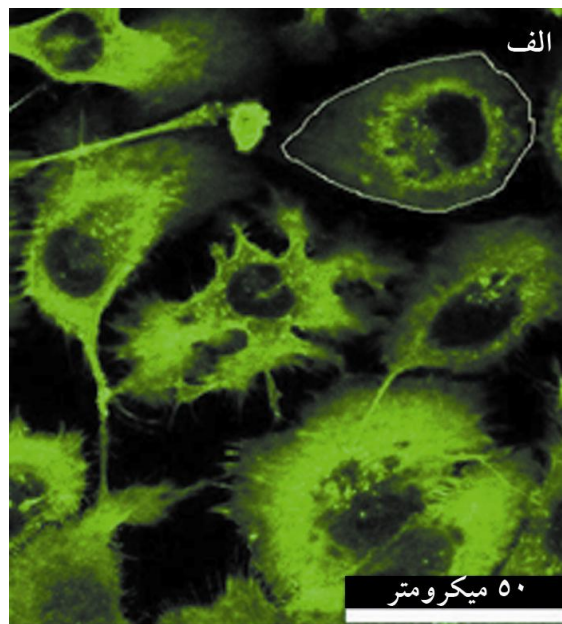
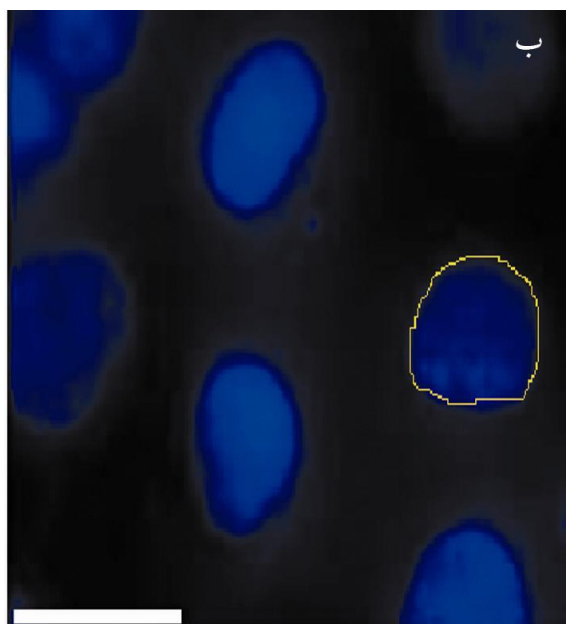
با استفاده از تصاویر به‌دست آمده، پارامتر شاخص شکل سلولی در هر گروه تعیین شد. به‌منظور تعیین پارامتر شاخص شکل سلولی در پی اندازه‌گیری محیط و مساحت هر سلول، از رابطه (۱) استفاده شد. بدین منظور، با استفاده از نرم‌افزار Image J (NIH، آمریکا) با ترسیم مناسب دور محیط تک تک سلول‌ها مشخص شد و محیط و مساحت هر سلول و هسته

سلول‌ها قرار داده می‌شود. در صورت عدم استفاده از این فانتوم‌ها، پرتوهای ناشی از پراکندگی کامپتون (Campton) به‌صورت بازگشتی به سلول‌های چسبیده به کف ظرف باز تابانیده شده و در نتیجه دوزی متفاوت با میزان دوز مورد نظر به سلول‌ها خواهد رسید. در این پژوهش برای جلوگیری از این امر، به میزان ۵ سانتی‌متر فانتوم لایه‌ای صفحات پرسپکس زیر ظرف تحت تابش قرار داده شد. این فانتوم‌ها شرایط جذب پرتویی معادل آب دارند و با به‌کارگیری این فانتوم‌ها به هنگام تابش دهی، دوز مورد نظر توسط سلول‌های چسبیده به ته ظرف دریافت می‌شود.

پرتودرمانی سلول‌ها با شرایط فیزیکی اندازه میدان 30×30 سانتی‌متر مربع و فاصله چشمه تا سطح ۸۰ سانتی‌متری توسط ماشین درمانی کبالت-۶۰ به اجرا درآمد. در طول مطالعه پرتودرمانی، با دوزهای ۰، ۲، ۴، ۶ و ۸ گری به‌صورت تابش یک جا و همین‌طور با همین مقادیر دوز به‌صورت تقطیع دوز ۲ گری انجام شد. در این بخش شرایط انتقال و نگهداری سلول‌های تمامی گروه‌ها یکسان در نظر گرفته شد. برای این که کم‌ترین شوک محیطی ممکن به سلول‌ها وارد شود، زمان به نحوی تنظیم شد که سلول‌ها بیش از ۴۰ دقیقه خارج انکوباتور نمانند. به گونه‌ای که در بررسی‌های مقدماتی تغییر معنی‌داری در رفتار سلول‌های گروه‌های مشهور به شاهد و کنترل ایجاد نشد. مدت زمان بین مدت زمان بین دو تقطیع تابش مانند پرتودرمانی بالینی، حدود ۲۴ ساعت است. دلیل آن که تنها تا دوز ۸ گری به‌عنوان دوز تابشی مورد نظر در این مطالعه انتخاب شد این امر است که بنا بر یافته‌های پیشین، رده سلولی سالم به‌کارگیری شده در پی دریافت دوزهای بالاتر از ۸ گری در مسیر مرگ سلولی برنامه ریزی شده (Apoptosis) قرار می‌گیرد و در این حالت نمی‌توان پارامترهای ریخت‌شناسی را با عملکرد اندوتلیال‌ها از منظر زیست‌شناسی مرتبط دانست [۱۴]. سلول‌ها پس از هر مرحله تابش و پس از باز نمودن پارافیلیم‌های هر پلیت، مجدداً در داخل انکوباتور قرار داده شد.

استخراج شد. این مرحله برای تصاویر فیبرهای اکتین غشا و هسته (شکل ۱) در گروه‌های سلولی مورد مطالعه نیز اجرا شد. به‌منظور کاهش خطای ناشی از ترسیم نمودن دستی، در این مرحله مطابق با شکل ۱ صرفاً سلول‌هایی برای بررسی پارامترهای ریخت‌شناسی انتخاب شدند که حدود محیط آن‌ها

کاملاً مشخص بود و هم پوشانی با سایر سلول‌ها نداشته باشند. همچنین، فرآیند ترسیم نمودن هر سلول حداقل سه مرتبه اجرا شد و مقدار میانگین مربوط به هر پارامتر گزارش شد. در ادامه با به‌کارگیری رابطه مذکور، شاخص شکل سلول و هسته برای هر گروه سلولی کنترل و تحت تابش، برآورد شد.



شکل ۱ الف) کانتور دور محیط غشای یک سلول اندوتلیال روی تصاویر حاصل از میکروسکوپ کانفوکال با مقیاس ۵۰ میکرومتر، ب) ترسیم دور هسته یک سلول اندوتلیال روی تصویر حاصل از میکروسکوپ فلورسنت با مقیاس ۳۰ میکرومتر

برآورد نمونه و تحلیل آماری

با انجام مطالعه راهنما، در ابتدا در هر گروه ۵ سلول به‌صورت راهنما (Pilot) به‌منظور بررسی میزان همبستگی نتایج انتخاب شدند. در ادامه برآورد نمونه بر مبنای آنالیز آماری ANOVA (one way Analysis of variance) با سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و توان آزمون ۰/۹۰ انجام شد. لازم به ذکر است به‌منظور حاصل شدن نتایجی با درستی بالاتر، تا حد امکان تعداد نمونه‌هایی بیش از آن چه در محاسبات برآورد نمونه استخراج شده بود، برای هر گروه انتخاب شد. به گونه‌ای که در هر گروه حداقل ۱۰ سلول به‌عنوان نمونه بررسی شد. پس از اطمینان از توزیع نرمال مقادیر پارامترهای ریخت‌شناسی

با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف (Kolmogorov-Smirnov)، نتایج به‌صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد. مقایسه گروه‌ها با روش آماری ANOVA با سطح اطمینان ۹۵ درصد به کمک نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ (IBM، آمریکا) انجام شد.

نتایج

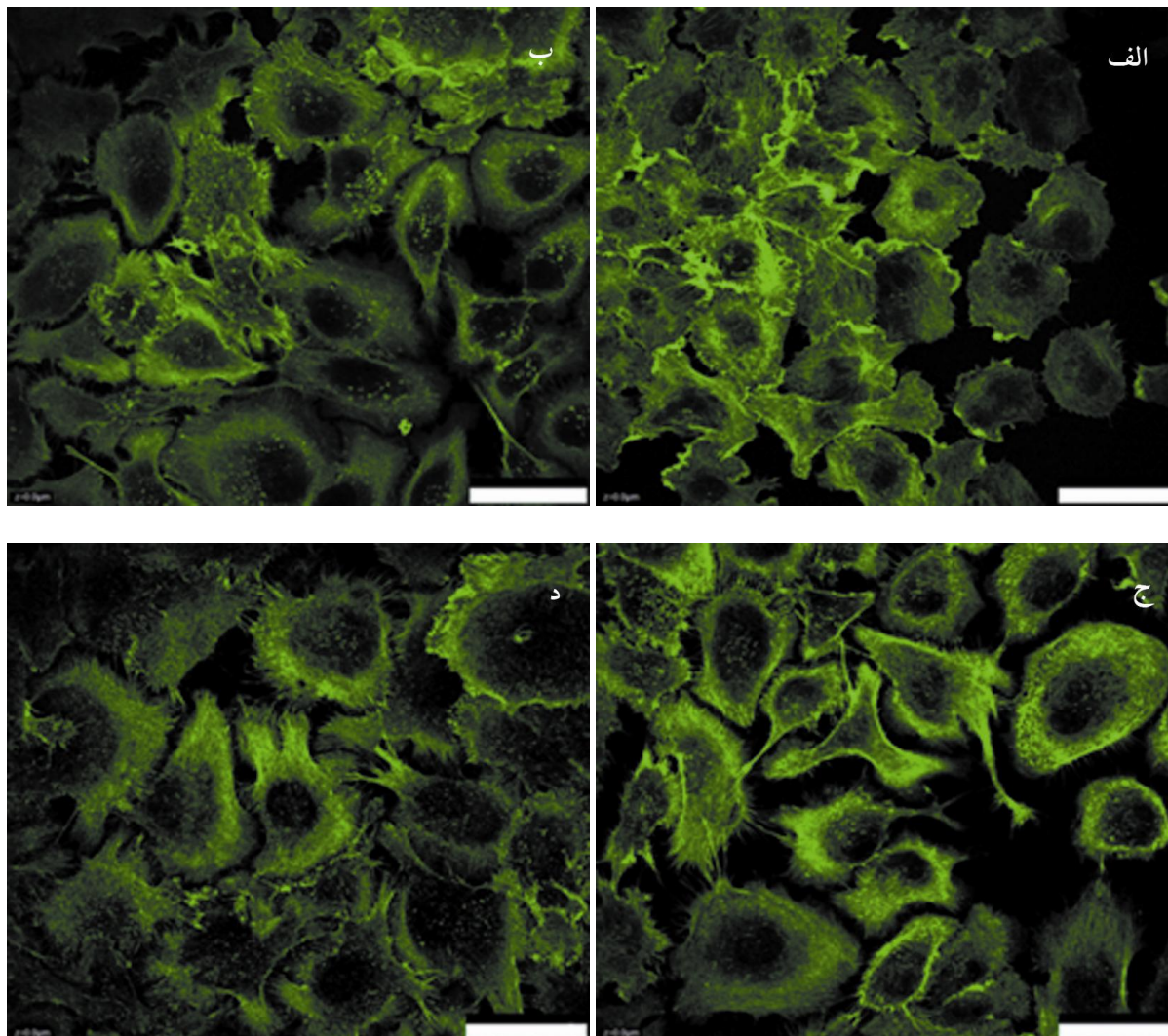
نتایج ریخت‌شناسی در طول تابش یک باره

بررسی تغییرات ایجاد شده در ساختار غشا و هسته سلول‌ها در طول تابش با دوزهای ۰، ۲، ۴ و ۸ گری نشان

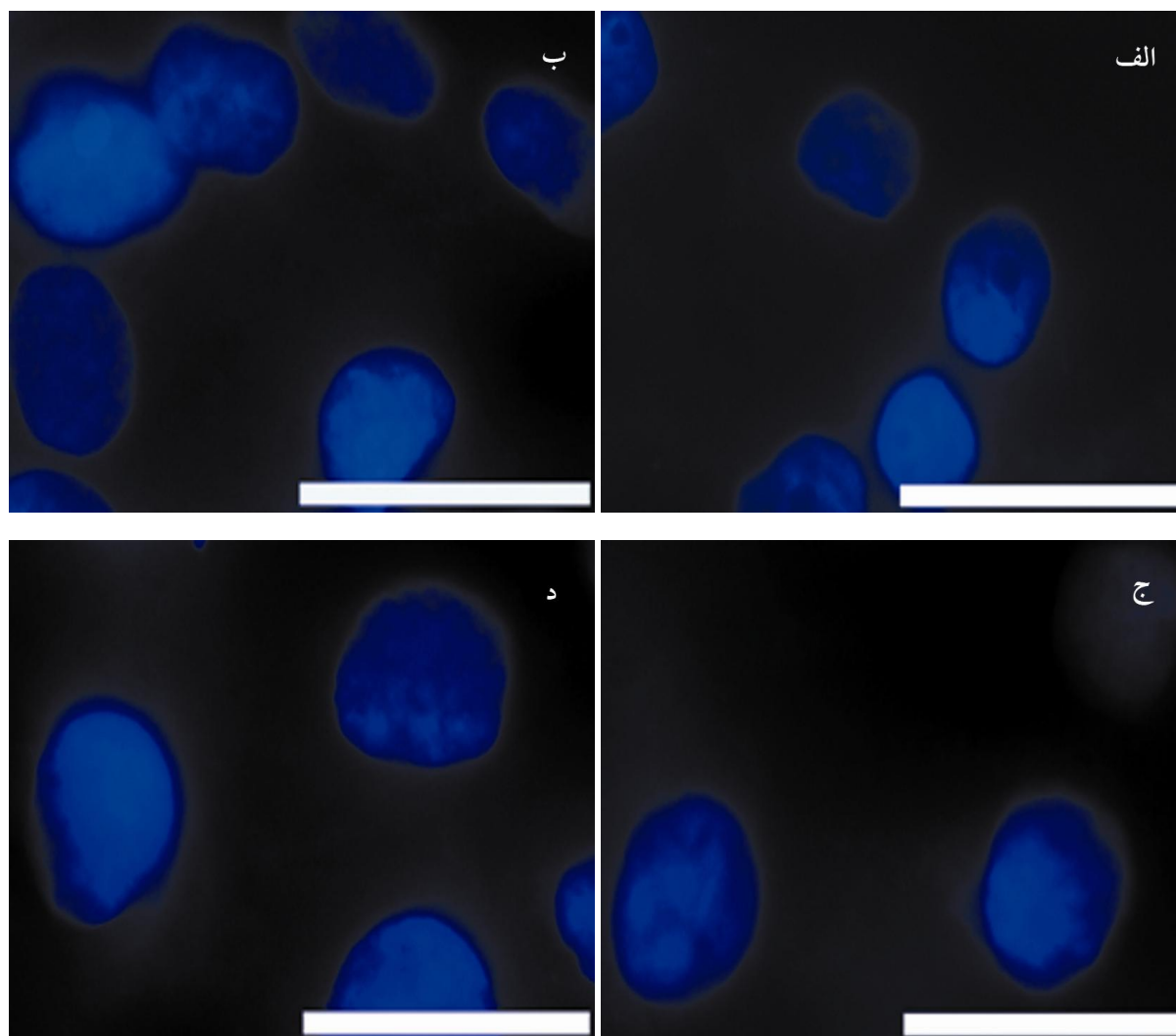
رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال در فرآیند پرتودرمانی

سلول‌های اندوتلیال، اندازه هسته در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل بزرگ‌تر می‌شود (شکل ۳). از این رو تغییر در پیکربندی فیلامان‌ها موجب افزایش اندازه هسته و در پی آن افزایش اندازه سلول به عنوان آثار عمده پرتوهای یونیزان بر اسکلت سلول‌های اندوتلیال قابل ملاحظه است.

می‌دهد، پس از تابش، فیلامان‌های اکترین غشای سلول‌ها که در خاصیت کششی سلول‌ها نقش ایفا می‌کنند، شکسته شده و به رشته‌های ریز در کنار هم دیگر تبدیل شده‌است. این رشته‌های ریز متراکم شده و پیکربندی جدید در ساختمان اسکلتی سلول‌ها به وجود آورده است (شکل ۲). با اعمال پرتو به



شکل ۲ تغییر ساختار فیبرهای اکترین در غشای سلول‌های اندوتلیال پس از قرار گرفتن در معرض تابش یک باره دوزهای: (الف) ۰ گری، (ب) ۲ گری، (ج) ۴ گری و (د) ۸ گری (Error bar ۵۰ میکرون)



شکل ۳ تغییرات ایجاد شده در ساختار هسته در سلول‌های اندوتلیال پس از قرار گرفتن در معرض تابش یک باره دوزهای: (الف) ۰ گری، (ب) ۲ گری، (ج) ۴ گری و (د) ۸ گری (error bar ۳۰ میکرون)

نتایج بررسی شاخص شکل سلولی به همراه پارامترهای مساحت و محیط سلول و هسته در گروه‌های مختلف کنترل (صفر گری) و تابش‌دهی یک باره (۲، ۴، ۶ و ۸ گری) برای ساختار اسکلتی کل سلول و هسته، در جدول ۱ ارائه شده است. در جدول ۱، پارامترهای مساحت و محیط سلول‌ها و نیز هسته با افزایش دوز پرتو تحت یک بار تابش، به صورت معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند (عدد P کمتر از ۰/۰۵). به گونه‌ای که به ازای دوز ۸ گری، مساحت و محیط غشای سلول

به ترتیب ۲/۰۰ و ۲/۲۰ برابر میانگین گروه کنترل شد. مساحت و محیط هسته نیز به ترتیب به ۱/۸۵ و ۱/۳۱ برابر میانگین گروه کنترل می‌رسد. کاهش معنی‌دار شاخص شکل سلولی (۵۶ درصد) با افزایش میزان دوز جذبی، بیانگر این حقیقت است که پهنای سلول‌های اندوتلیال در پی دوزهای بالاتر پرتوهای یونیزان به شکل معنی‌داری کاهش یافته و به تدریج از ریخت‌شناسی پهن و دایروی به ریخت خطی و کشیده نزدیک می‌شوند. افزایش شاخص شکل هسته (۸۵ درصد) با تابش ۸

رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال در فرآیند پرتودرمانی

پرتودرمانی به همراه تغییر شکل هسته سلول‌ها به سمت پهن و دایروی از منظر ریخت‌شناسی معرف افزایش میزان دوز جذبی دریافتی سلول‌ها است.

گری نسبت به کنترل، تایید کننده افزایش ابعاد هسته است. افزایش ابعاد سلول‌ها و تبدیل شکل سلول به حالت خطی و کشیده، پس از یک بار تابش و دریافت دوزهای مختلف

جدول ۱ میانگین (انحراف معیار) پارامترهای مستخرج از تصاویر رنگ‌آمیزی اسکلت سلولی غشا و هسته سلول‌های اندوتلیال در پی تابش یک باره در پرتودرمانی؛ نتایج تحلیل آماری با عدد P کوچک‌تر از ۰/۰۵ آمده است.

پارامتر	صفر گری	۲ گری	۴ گری	۸ گری	عدد P-
مساحت سلول	۱۲۹۰/۱۵	۱۷۲۸/۹۳	۱۵۶۷/۴۲	۲۵۹۷/۶۰	۰/۰۰۷
(میکرومتر مربع)	(۲۸۲/۸۱)	(۱۰۲۴/۱۴)	(۹۱۴/۰۱)	(۳۸۸/۱۳)	
محیط سلول	۱۴۸/۰۹	۱۸۳/۲۹	۲۱۶/۸۴	۳۲۷/۰۰	۰/۰۰۰
(میکرومتر)	(۱۵/۷۰)	(۵۷/۲۸)	(۵۵/۷۹)	(۴۰/۴۲)	
شاخص شکل سلول	۰/۷۳	۰/۶۰	۰/۴۵	۰/۳۲	۰/۰۰۰
	(۰/۰۶)	(۰/۱۳)	(۰/۱۳)	(۰/۰۹)	
مساحت هسته	۱۸۸/۸۷	۲۱۷/۲۲	۲۵۶/۹۰	۳۴۸/۷۱	۰/۰۰۰
(میکرومتر مربع)	(۴۹/۶۹)	(۲۵/۷۱)	(۳۲/۳۳)	(۳۸/۱۴)	
محیط هسته	۵۳/۱۱	۵۵/۷۰	۵۹/۸۶	۶۹/۳۶	۰/۰۰۲
(میکرومتر)	(۹/۵۰)	(۲/۶۳۸)	(۳/۳۶)	(۴/۱۲)	
شاخص شکل هسته	۰/۴۹	۰/۸۸	۰/۹۰	۰/۹۱	۰/۰۰۰
	(۰/۱۴)	(۰/۰۳)	(۰/۰۳)	(۰/۰۲)	

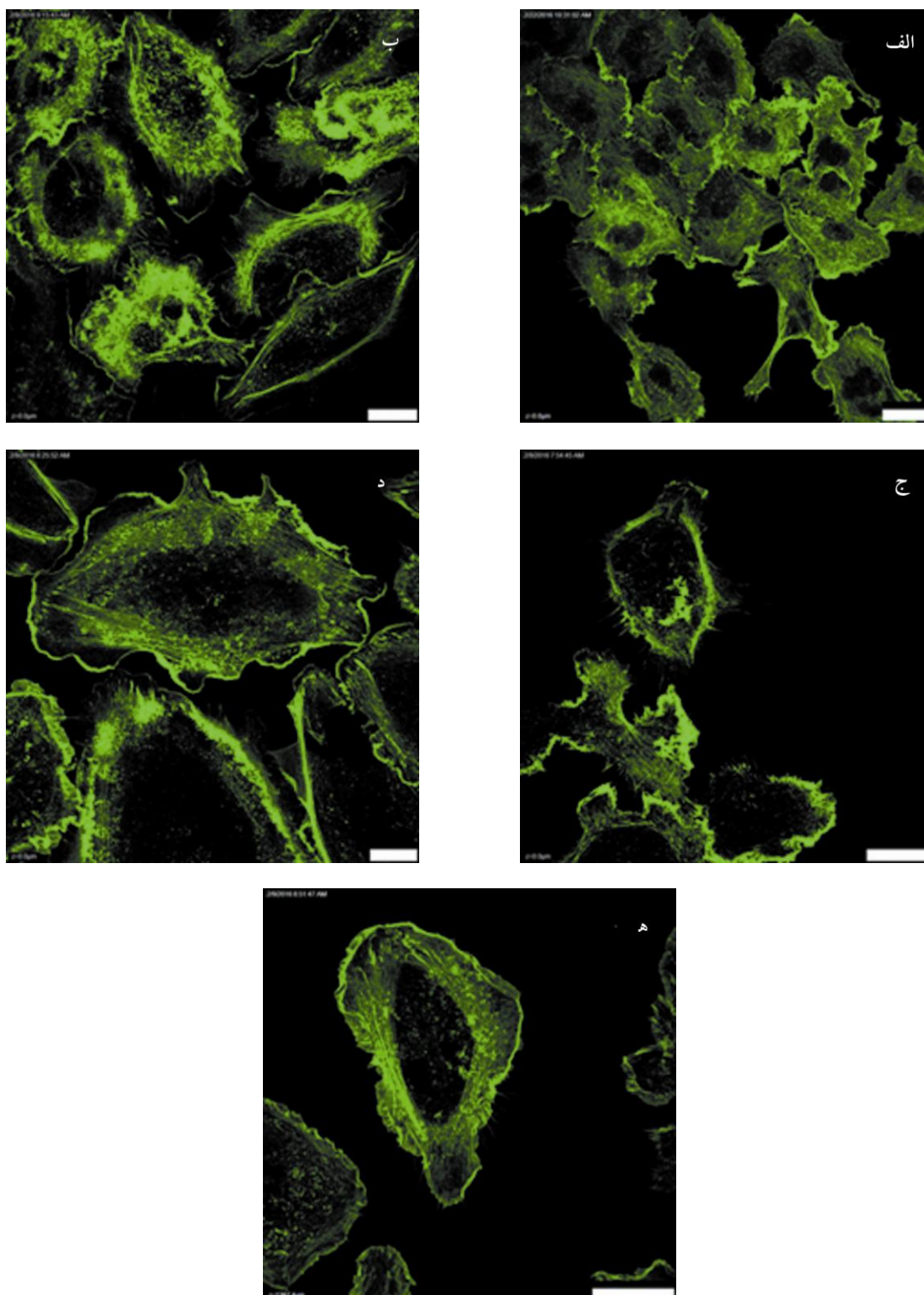
افزایش یافته است (جدول ۲).

شاخص شکل سلول به همراه پارامترهای مساحت و محیط سلول‌ها پس از تقطیع تابش بر ساختار اسکلتی غشای سلول در جدول ۲ آمده است. افزایش معنی‌دار مساحت و محیط سلول در پی افزایش دوز پرتو مشاهده شد (عدد P کم تر از ۰/۰۵). با تابش تقطیع ۸ گری، مساحت و محیط غشای سلول به ترتیب ۴/۵ و ۲/۵ برابر گروه کنترل می‌شود. کاهش معنی‌دار شاخص شکل سلولی (۲۳ درصد) با افزایش میزان دوز جذبی اعمالی به روش تقطیع تابش نشان می‌دهد که ریخت سلول از نمای پهن و دایروی به ریخت خطی و کشیده نزدیک می‌شود (عدد P کمتر از ۰/۰۵).

نتایج ریخت‌شناسی سلول پس از پرتودرمانی

تقطیعی

در شکل ۴ تغییرات ایجاد شده در ساختار اسکلتی غشای سلول‌ها پس از تابش تحت دوزهای تقطیعی ۲، ۴، ۶ و ۸ گری با گام‌های ۲ گری که در هر مرحله دوز جذبی به سلول اضافه می‌شود، قابل مشاهده است. در پی اعمال پرتو در هر مرحله به سلول‌های اندوتلیال، تغییر رفتار فیلامان‌های اکئین به ازای هر مرحله تقطیع تابش، مشابه با تابش یک باره حاصل شد، ولی ابعاد سلول بعد از تابش‌گیری تقطیعی ۶ و ۸ گری به صورت مشهودی نسبت به سایر گروه‌های تابش دیده،



شکل ۴ تغییر ساختار فیبرهای اکترین در غشای سلول‌های اندوتلیال پس از تابش تقطیعی با دوزهای: (الف) کنترل، (ب) ۲ گری، (ج) ۴ گری، (د) ۶ گری و (هـ) ۸ گری (error bar ۲۵ میکرون)

رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال در فرآیند پرتودرمانی

جدول ۲ میانگین (انحراف معیار) پارامترهای مستخرج از تصاویر رنگ‌آمیزی اسکلت سلول‌های اندوتلیال حین فرآیند تقطیع تابش در پرتودرمانی؛ نتایج تحلیل آماری با عدد P کوچک‌تر از ۰/۰۵ آمده است.

پارامتر	۲ گری	۴ گری	۶ گری	۸ گری	عدد-P
مساحت سلولی (میکرومتر مربع)	۱۷۲۸/۹۳ (۱۰۲۴/۱۴)	۳۷۴۱/۹۴ (۹۰۱/۹۷)	۷۵۷۵/۶۶ (۱۶۵۹/۵۱)	۷۷۳۷/۴۳ (۳۱۲۵/۰۱)	۰/۰۰۰
محیط سلولی (میکرومتر)	۱۸۳/۲۹ (۵۷/۲۸)	۲۸۲/۶۸ (۳۱/۹۴)	۴۵۵/۴۴ (۶۳/۸۶)	۴۵۶/۲۰ (۱۱۸/۹۷)	۰/۰۰۰
شاخص شکل سلولی	۰/۶۰ (۰/۱۳)	۰/۵۸ (۰/۰۴)	۰/۴۷ (۰/۱۲)	۰/۴۶ (۰/۰۸)	۰/۰۰۰

بحث

رامبوتس و همکاران [۵]، ۴ ساعت بعد از اعمال دوز ۵ گری، میانگین نسبت افزایش اندازه سلول HUVEC به سلول‌های گروه کنترل ۱/۱۶ برابر و نسبت افزایش اندازه هسته سلول‌ها به سلول‌های گروه کنترل ۱/۴ برابر برآورد کردند. هر چند گزارشی از محیط و مساحت سلول‌ها ارایه نکردند. در تحقیق حاضر، با توجه به عدم تقارن شکل سلول‌ها میزان افزایش مساحت و محیط سلول‌ها به ازای تابش‌گیری با دوزهای مختلف در مقایسه با گروه کنترل گزارش شد. بر این مبنا طی ۲۴ ساعت بعد از اعمال دوز ۸ گری به سلول‌ها، میانگین محیط و مساحت سلول‌ها به ترتیب به ۲/۰۱ و ۲/۲۰ برابر سلول‌های گروه کنترل افزایش یافت. ضمناً میانگین محیط و مساحت هسته به ترتیب به ۱/۸۵ و ۱/۳۱ برابر هسته گروه کنترل افزایش یافت. نکته جالب توجه دیگر این که مقایسه بین نتایج مربوط به اندازه و مساحت سلول‌های تابش‌گیری نموده در دو حالت پرتودرمانی در یک مرحله و تقطیع تابش نشان دادند که افزایش اندازه سلول به ازای دوز تابشی یکسان در حالت پرتودرمانی تقطیعی به شکل قابل ملاحظه‌ای از حالت پرتودرمانی یک باره بیشتر است که این امر را می‌توان به تأخیری که در فرآیند ترمیم DNA و ساختار اسکلت سلولی در دوزهای بالاتر از ۲/۵ گری در رده سلولی HUVEC به وجود می‌آید [۵]، مرتبط دانست. نتایج حاصله از تغییرات ریخت‌شناسی سلول‌های تحت

پرتو بر مبنای تغییر ساختار اسکلتی آن‌ها در پی دریافت پرتوهای یونیزان نشان می‌دهد که پیکربندی سلول‌ها در پی دریافت پرتو در هر مرحله با افزایش دوز به سمت کشیده شدن تمایل می‌یابد. اما از طرفی هسته سلول‌های تحت پرتو، نسبت به سلول‌های گروه کنترل به شکل مشهودی به سمت کروی‌تر شدن می‌روند.

بر مبنای گزارش‌های پیشین، بررسی سلول‌های متعلق به رده سلولی HUVEC بیانگر این حقیقت بوده‌است که به هنگام اعمال دوز ۵/۹ گری، تکثیر سلول‌های این رده سلولی به نصف کاهش پیدا می‌کند و همچنین سلول‌ها در ۲۴ ساعت بعد از پرتوگیری سفت‌تر می‌شوند [۱۵]. به منظور تحلیل علت تغییر در ساختار اسکلتی رده سلولی استفاده شده در این تحقیق، می‌بایست رفتار سلول‌ها پس از پرتوگیری تجزیه و تحلیل شود. در این ارتباط نتایج پژوهش‌هایی که شارما (Sharma) و همکاران در سال ۲۰۱۳ [۴] و نیز کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۱۴ [۱۶] انجام داده‌اند، نشان می‌دهد که با افزایش میزان دوز اعمالی به رده سلولی HUVEC، میزان نفوذپذیری سلول‌ها به نحو قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌یابد. این امر می‌تواند سلول را مهیای پذیرش آسیب نماید و از این رو ساختار اسکلت سلولی را در معرض تغییر و بازسازی قرار دهد. بنابراین در تحقیق حاضر، با توجه به این که به سلول‌ها فرصت لازم طی ۲۴ ساعت بعد پرتودهی داده شده است تا پروتئین‌های آسیب دیده، ساخته شود، این پروتئین‌ها قابلیت انتخاب نمودن مولکول‌هایی را از محیط خارج از سلول‌های

اندوتلیال می‌یابد که با توجه به نفوذپذیری بیشتر ایجاد شده در سلول، تغییر ساختار اسکلتی سلول را سبب می‌شود. بر مبنای بررسی‌های سایر محققین، با تابش‌دهی با پرتوهای یونیزان، پروتئین‌های مؤثر در ساختار اسکلت سلولی نظیر پروتئینی که اتصال‌گر فیلامان‌ها در موقعیت‌های مکانی تنگ بین فیبرهای اکترین است (VE-cadherin) ساخته می‌شود و مولکول‌های مسبب چسباندگی اتصالات به یکدیگر (Junctional adhesion molecules: JAMs) که فیبرهای اکترین را به اجزای سیتوپلاسم به صورت چسبنده با یکدیگر قرار می‌دهند، القا می‌شود. همچنین مولکولی که موجب چسبندگی سلول‌های اندوتلیال به یکدیگر است (Platelet endothelial cell adhesion molecule: PECAM-1) نیز علاوه بر پروتئین‌های قبلی القا می‌شود [۴]. در سلول‌های اندوتلیال رده سلولی HUVEC، در پی اعمال پرتوهای یونیزان، سطح ژن مربوط به مولکول چسباندنده سلول‌های عروقی (vascular cell adhesion molecule 1: VCAM1) نیز به صورت قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌یابد [۱۶]. همچنین آسیب به اندوتلیال‌ها در پی پرتوگیری می‌تواند به آترواسکلروز پرتویی (Radiative atherosclerosis) منتهی شود. به این نحو که با افزایش نفوذپذیری سلول اندوتلیال، مولکول‌های چسبنده نظیر سایتوکین (Cytokine) و عوامل رشدی نظیر عامل رشد انتقالی بتا (Transforming growth factor beta: TGF- β) ترشح می‌شوند که موجب فعال‌سازی پاسخ التهابی حاد می‌شود. حال آن که در بلند مدت تغییرات به وجود آمده منجر به رسوب کلاژن و تکثیر مایع فیروبلاست می‌شود و آترواسکلروز پرتویی پدیدار می‌شود. عموماً تکثیر مایع فیروبلاست به تنگ شدن مجرای پرتوگیری نموده می‌انجامد [۱۹]. موارد ذکر شده همگی می‌تواند در تغییر ساختار اسکلتی سلول‌های تابش دیده مؤثر باشد.

در این تحقیق شکسته شدن فیلامان‌های اکترین بعد از تابش‌گیری و تجمع بیشتر فیبرهای تنشی در کنار یکدیگر در غشا، در کنار افزایش قابل ملاحظه اندازه سلول و اندازه هسته

طی ۲۴ ساعت بعد از پرتودرمانی در سلول‌های اندوتلیال عروق بزرگ ملاحظه شد. از طرف دیگر مشاهدات گزارش شده در تحقیق گابریس و همکاران [۱۹] در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که در پی تابش‌دهی با پرتوهای یونیزان، تغییر در ساختار میکروتوبول‌های حاضر در غشا تنها برای سلول‌های اندوتلیال مویرگی صورت می‌پذیرد و رده سلولی HUVEC چنین رفتاری را از خود در برابر پرتودرمانی نشان نمی‌دهد. در آن پژوهش مطرح شد که با رنگ‌آمیزی میکروتوبول‌ها برای سلول‌های اندوتلیال عروق بزرگ و کوچک، تغییر در ساختار اندوتلیوم مویرگی بلافاصله بعد از تابش و ۲۴ ساعت بعد از تابش مشاهده می‌شود. در حالی که چنین امری در سلول‌های اندوتلیال عروق بزرگ‌تر مشاهده نشد. دلیل این امر می‌تواند به مقاومت بیش‌تر عروق بزرگ‌تر در پی پرتودرمانی نسبت به عروق کوچک و مویرگ‌ها نسبت داده شود [۲۰].

یافته‌های تحقیق حاضر نشان داد که اندازه کل سلول‌های اندوتلیال و هسته آن‌ها با اعمال پرتوهای یونیزان افزایش می‌یابد. نتایج بیانگر این امر بودند که آهنگ افزایش ابعاد سلول‌ها به ازای دوز یکسان، در پرتودرمانی تقطیعی بیش از پرتودهی یک باره است. لازم به ذکر است تحقیقی که توسط گوجرال (Gujral) و همکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام شد، نشان داده است که ضخامت اینتیمای (Intima-media) شریان بیماران نیز بعد از پرتودرمانی تقطیعی، افزایش معنی‌داری را نسبت به حالت قبل از آغاز تابش‌دهی‌ها داراست [۲۱]. با توجه به این که سلول‌های اندوتلیوم معطوف به لایه اینتیمای است، بنابراین نتایج بررسی حاضر در ارتباط با افزایش ابعاد سلول در پرتودرمانی تقطیعی می‌تواند هم راستا با نتایج تحقیق یادشده قلمداد شود.

هدف اصلی از انجام تحقیق حاضر، بررسی فرضیه تغییر رفتار پارامترهای ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال انسانی در پی پرتودرمانی بود که این امر بر مبنای یافته‌های پژوهش حاضر به اثبات رسید. لیکن بررسی‌ها در بخش مواد و روش‌ها از روش ترسیم نمودن دستی سلول‌ها استفاده شد که این روش

سلولی بین دو جلسه تابش‌دهی است. به‌طور کلی، یافته‌های این تحقیق بیانگر ایجاد تغییرات نامطلوب در پیکربندی سلول‌های اندوتلیال از منظر ریخت‌شناسی است که این امر می‌تواند پیش‌آهنگی برای آسیب‌های بعدی محسوب شود. نظر به این که عروق بزرگ بدن اغلب در پرتودرمانی‌های بالینی نیز به‌عنوان اندام در خطر منظور نمی‌شوند، بنابراین انجام بررسی رفتار فیزیولوژیکی عروق اصلی در بدن و آسیب‌های احتمالی وارده بر آن‌ها در پی پرتوگیری پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

این تحقیق قسمتی از رساله دکتری رشته فیزیک پزشکی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس است و اعتبار مالی آن از معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

علیرغم صرف زمان و دقت بالا توسط کاربر، از خطای ناشی از اشتباه انسانی مصون نیست و این امر می‌تواند به‌عنوان یک محدودیت لحاظ شود. از این رو پیشنهاد می‌شود که در مطالعات آینده تا حد امکان روش‌هایی که سهم خطای انسانی را به حداقل می‌رساند، در بررسی پارامترهای ریخت‌شناسی سلول‌ها در پی پرتودرمانی طراحی شده و به‌کار گرفته شود. مقایسه نتایج حاصل از تابش‌دهی یک باره دوز ۸ گری و تقطیع تابش ۸ گری نشان داد که در پی پرتودرمانی تقطیعی سلول‌های اندوتلیال از منظر ریخت‌شناسی به سلول‌های گروه کنترل به نسبت شباهت بیشتری دارند. کاهش شاخص شکل سلول نسبت به گروه کنترل در دو حالت پرتودهی یک باره (۵۶ درصد) و تقطیع پرتودهی (۲۳ درصد) برای دوز تابشی ۸ گری نشان می‌دهد، که در پرتودهی تقطیعی، سلول‌ها فرصت ترمیم ساختمان اسکلتی و بازسازی به ریخت ظاهری اولیه را می‌یابند که این امر نشانه‌ای از وقوع ترمیم ساختار اسکلتی

منابع

- [1] Holzapfel GA, Gasser TC, Ogden RW. A new constitutive framework for arterial wall mechanics and comparative study of material models. *Journal of Elasticity and the Physical Science of Solids* 2000; 61(1): 1-48.
- [2] Gujral DM, Shah BN, Chahal NS, Senior R, Harrington KJ, Nutting CM. Clinical features of radiation-induced carotid atherosclerosis. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 2014; 26(2): 94-102.
- [3] Gujral DM, Chahal N, Senior R, Harrington KJ, Nutting CM. Radiation-induced carotid artery atherosclerosis. *Radiother Oncol* 2014; 110(1): 31-8.
- [4] Sharma P, Templin T, Grabham P. Short term effects of gamma radiation on endothelial barrier function: uncoupling of PECAM-1. *Microvasc Res* 2013; 86: 11-20.
- [5] Rombouts C, Aerts A, Beck M, De Vos WH, Van Oostveldt P, Benotmane MA, Baatout S. Differential response to acute low dose radiation in primary and immortalized endothelial cells. *Int J Radiat Biol* 2013; 89(10): 841-50.
- [6] Theret DP, Levesque MJ, Sato M, Nerem RM, Wheeler LT. The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements. *J Biomech Eng* 1988; 110(3): 190-9.
- [7] Thakar RG, Ho F, Huang NF, Liepmann D, Li S. Regulation of vascular smooth muscle cells by micropatterning. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 307(4): 883-90.
- [8] Ghazanfari S, Tafazzoli-Shadpour M, Shokrgozar MA. Effects of cyclic stretch on proliferation of mesenchymal stem cells and

- their differentiation to smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388(3): 601-5.
- [9] Eke I, Cordes N. Radiobiology goes 3D: how ECM and cell morphology impact on cell survival after irradiation. *Radiother Oncol* 2011; 99(3): 271-8.
- [10] Alford PW, Nesmith AP, Seywerd JN, Grosberg A, Parker KK. Vascular smooth muscle contractility depends on cell shape. *Integr Biol (Camb)* 2011; 3(11): 1063-70.
- [11] Gadhari N, Charnley M, Marelli M, Brugger J, Chiquet M. Cell shape-dependent early responses of fibroblasts to cyclic strain. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833(12): 3415-3425.
- [12] Garcez K, Lim CC, Whitehurst P, Thomson D, Ho KF, Lowe M, Sykes A, Lee LW, Yap B, Slevin N. Carotid dosimetry for T1 glottic cancer radiotherapy. *Br J Radiol* 2014; 87(1038): 20130754.
- [13] Vitolo V, Millender LE, Quivey JM, Yom SS, Schechter NR, Jereczek-Fossa BA, Milani F, Orecchia R, Xia P. Assessment of carotid artery dose in the treatment of nasopharyngeal cancer with IMRT versus conventional radiotherapy. *Radiother Oncol* 2009; 90(2): 213-20.
- [14] El Kaffas A, Al-Mahrouki A2, Tran WT2, Giles A3, Czarnota GJ. Sunitinib effects on the radiation response of endothelial and breast tumor cells. *Microvasc Res* 2014; 92: 1-9.
- [15] Bischof M, Abdollahi A, Gong P, Stoffregen C, Lipson KE, Debus JU, Weber KJ, Huber PE. Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 60(4): 1220-32.
- [16] Kim KS, Kim JE, Choi KJ, Bae S, Kim DH. Characterization of DNA damage-induced cellular senescence by ionizing radiation in endothelial cells. *Int J Radiat Biol* 2014; 90(1): 71-80.
- [17] Han D, Hao S, Tao C, Zhao Q, Wei Y, Song Z, Li B. Comparison of once daily radiotherapy to 60 Gy and twice daily radiotherapy to 45 Gy for limited stage small-cell lung cancer. *Thorac Cancer* 2015; 6(5): 643-8.
- [18] Ren XC, Wang QY, Zhang R, Chen XJ, Wang N, Liu YE, Zong J, Guo ZJ, Wang DY, Lin Q. Accelerated hypofractionated three-dimensional conformal radiation therapy (3 Gy/fraction) combined with concurrent chemotherapy for patients with unresectable stage III non-small cell lung cancer: preliminary results of an early terminated phase II trial. *BMC Cancer* 2016; 16: 288.
- [19] Gabryś D, Greco O, Patel G, Prise KM, Tozer GM, Kanthou C. Radiation effects on the cytoskeleton of endothelial cells and endothelial monolayer permeability. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007; 69(5): 1553-62.
- [20] Taunk NK, Haffty BG, Kostis JB, Goyal S. Radiation-induced heart disease: pathologic abnormalities and putative mechanisms. *Front Oncol* 2015; 5: 39.
- [21] Gujral DM, Shah BN, Chahal NS, Bhattacharyya S, Hooper J, Senior R, Harrington KJ, Nutting CM. Carotid intima-medial thickness as a marker of radiation-

رفتار ریخت‌شناسی سلول‌های اندوتلیال در فرآیند پرتودرمانی

induced carotid atherosclerosis. Radiother

Oncol 2016; 118(2): 323-9.