دزیمتری مولکولی پرتو گاما با استفاده از تغییرات طیفی هموگلوبین

رفیعی، جواد*

سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده مواد و سوخت هسته‌ای

چکیده:

دزیمتری پرتوهای پرانرژی نظیر پرتو ایکس و گاما از اهمیت بالایی برخوردار است. میزان دز جذبی با استفاده از دزیمترهای فیزیکی اندازه گیری شده و با تقریب و ضرایب خاصی در بافت‌های بدن لحاظ می‌شود که همواره با خطا همراه است. در این مطالعه، هموگلوبین بعنوان یک بیومارکر بالقوه جهت دزیمتری پرتو گاما انتخاب گردید. برهمکنش پرتو گاما با هموگلوبین بصورت برون تن در محدوده دز ۲-۶۳ Gy با استفاده از طیف جذبی UV-Vis بررسی شده و تغییرات پیک سورت در حوالی ۴۱۲ nm جهت دزیمتری پرتو گاما پیشنهاد گردید. همچنین، روند تغییرات نواحی مختلف طیفی هموگلوبین در مواجهه با پرتو گاما می‌تواند بعنوان شاخص اثر پرتو گاما بر بدن، مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *پرتو گاما، هموگلوبین، دزیمتر مولکولی، طیف جذبی، پیک سورت*

Molecular dosimetry of gamma radiation using spectral changes of hemoglobin

Rafiei, Javad

Nuclear Science & Technology Research Institute, Materials & Nuclear Fuel Research School

Abstract:

Radiation dosimetry of X and gamma rays is especially important because the increasing application of these two high-energy electromagnetic radiation in medicine. The common measurement of absorbed dose is carried out using physical changes of specific materials due to the amount of energy received, which is always accompanied by errors when it is used to biological tissues. In this study, hemoglobin was suggested as a biomarker for gamma radiation dosimetry. The interaction of gamma ray with hemoglobin in the range of 2-63 Gy was studied in-vitro. UV-Vis spectrophotometry and peak intensity variation and Soret band displacement at about 412 nm were proposed for gamma radiation dose measurement. Also, the variation of different spectral regions of hemoglobin in exposure to gamma radiation could be used to investigate the interaction of gamma ray with different biomolecules in the body.

Keywords: Gamma radiation, hemoglobin, molecular dosimeter, UV-Vis spectrum, Soret band

مقدمه :

با توجه به استفاده روزافزون از رادیوایزوتوپ‌ها و منابع پرانرژی امواج ایکس و گاما در تشخیص و درمان بیماری‌ها، برآورد دقیق اثرات جانبی آنها در بافت‌های مختلف ضروری است. اهمیت دزیمتری اختصاصی مولکول‌ها و بافت‌های زیستی بدان حد است که عمده دزیمترها بر اساس مشابهت آنها با بافت‌های بدن دسته بندی شده و ارزش گذاری می‌شود[۱]. دزیمترهای ترمولومینسانس دسته‌ای از دزیمترها را تشکیل می‌دهد که براساس ترکیب بلوری شان و مشابهت با بافت پرتودهی شده بصورت گسترده جهت دزیمتری پرتوهای یونیزان بکار می‌رود[۲]. یکی از روش‌های دزیمتری بر اساس تشکیل ترکیبات و حدواسطهای رادیکالی نظیر هیدروکسیل و پراکسیدهیدروژن در محیط‌های آبی بوده که برگرفته از تاثیر غیرمستقیم پرتو یونیزان بر بافت می‌باشد[۳]. در این میان استفاده از مولکول‌های زیستی بعنوان بیومارکر جهت تخمین بهتر دز دریافتی بسیار حائز اهمیت است. دزیمتری مولکولی که برپایه استفاده از بیومارکرهای زیستی می‌باشد در برآورد میزان خطر عوامل و ترکیبات مختلف در سرطانزایی استفاده می‌شود[٤]. انتخاب بیومارکر مناسب جهت برآورد میزان دز دریافتی از منابع پرتوزا و میزان ریسک اثر پرتو بر بدن، یکی از فاکتورهای اساسی و اولیه در دزیمتری مولکولی پرتو می‌باشد. هموگلوبین (Hb) بعنوان یکی از بیوماکرومولکول‌های مهم با توزیع همه گیر در بدن و ساختار مولکولی ویژه، میتواند گزینه مناسبی برای این امر باشد. ساختار کلی هموگلوبین در تمامی موجودات زنده یکسان بوده و شامل دو بخش اصلی است: بخش پلی پپتیدی و گروه پروستتیک هیم. طیف جذبی هموگلوبین ناشی از دو بخش موجود و ارتباط این دو بخش بوده که با جذب پرتو دچار تغییر شده و الگو و شدت این تغییرات در دزیمتری مولکولی می‌تواند استفاده شود. در این پژوهش، هموگلوبین بصورت برون تن با استفاده از پرتو گاما حاصل از چشمه کبالت-٦٠ پرتودهی می‌شود و الگو و شدت تغییرات طیفی با توجه به میزان دز دریافتی مطالعه می‌گردد. تغییرات شدت جذب نواحی مختلف با افزایش دز جذبی در محدوده ٦٣ Gy-٢ ثبت شده و میزان خطی بودن نواحی طول موجی مختلف بررسی می‌شود. همچنین، امکان استفاده از نواحی مختلف طیفی جهت دزیمتری پیشنهاد می‌گردد.

روش کار :

هموگلوبین انسانی بر اساس پروتکل آزمایشگاه بیوشیمی فیزیک دانشگاه تهران، از خون یک انسان بالغ سالم استخراج شده و تخلیص گردید[٥]. خلوص شیمیایی آن با استفاده از روش الکتروفورز ژل و مقایسه با نمونه هموگلوبین سیگما تائید شد. سپس، محلول هموگلوبین در بافر فسفات ٥٠ mM رقیق شده و طیف جذبی آن با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis در ناحیه ٨٠٠ nm-٢٠٠ تهیه شد. نواحی مختلف طیفی با کروموفورهای موجود در ساختار Hb تطبیق داده شد.

پرتودهی نمونه با استفاده از چشمه کبالت-٦٠ در فاصله مشخص از چشمه با آهنگ دز ٢٠ گری در ساعت انجام شد. دز دریافتی نمونه ها ٦٣ Gy-٢ بوده که با افزایش مدت زمان پرتودهی حاصل شد.

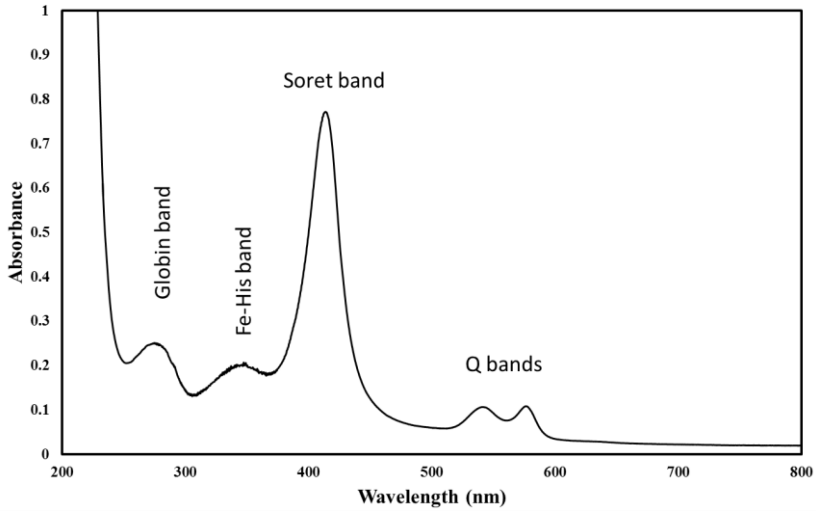
تجهیزات استفاده شده شامل دستگاه الکتروفورز ژل، اسپکتروفوتومتر UV-Vis (GBC, Cintra 6, Australia)، چشمه کبالت-۶۰ (gamma beam, GB150 type B, Atomic Energy of Canada) مستقر در پژوهشکده مواد و سوخت بعنوان منبع پرتو گاما بود. آهنگ دز با استفاده از دزیمتر TLD، توسط مرکز SSDL کرج تعیین گردید.

مواد شیمیایی بکار رفته در استخراج و تخلیص هموگلوبین و نمک‌های استفاده شده در تهیه بافر، از شرکت مرک[1] تهیه شد. هموگلوبین شاهد جهت تعیین خلوص هموگلوبین استخراج شده، از شرکت سیگما[2] خریداری گردید.

محلول ۳ میکرومولار هموگلوبین در بافر فسفات (۵۰ mM، pH ۷/٤) تهیه شده و در ویال‌های دو میلی لیتری قرار داده شد. در هر سری آزمایش، یک نمونه بعنوان شاهد در بیرون از محفظه پرتودهی قرار داده شد. نمونه‌ها به ترتیب در محفظه پرتودهی قرار داده شده و در مدت زمان مشخص پرتودهی گردید. میزان دز دریافتی با استفاده از شدت دز اندازه‌گیری شده و طول زمان پرتودهی محاسبه گردید. سپس، نمونه ها از محفظه برداشته شده و در حمام یخ قرار داده شد. پس از خاتمه عمل، طیف جذبی نمونه‌ها تهیه شد و تغییرات نواحی مختلف بر حسب میزان دز دریافتی ترسیم گردید. رابطه خطی میزان تغییرات طیفی نواحی مختلف با مقدار دز دریافتی، بعنوان معیاری از همبستگی ساختار با دز دریافتی بوده و امکان استفاده از ناحیه طیفی مذکور و ساختارهای مشابه در دزیمتری پیشنهاد گردید.

نتایج :

طیف جذبی هموگلوبین در محلول بافر فسفات، بدون پرتودهی بعنوان طیف شاهد تهیه گردید (شکل ۱).

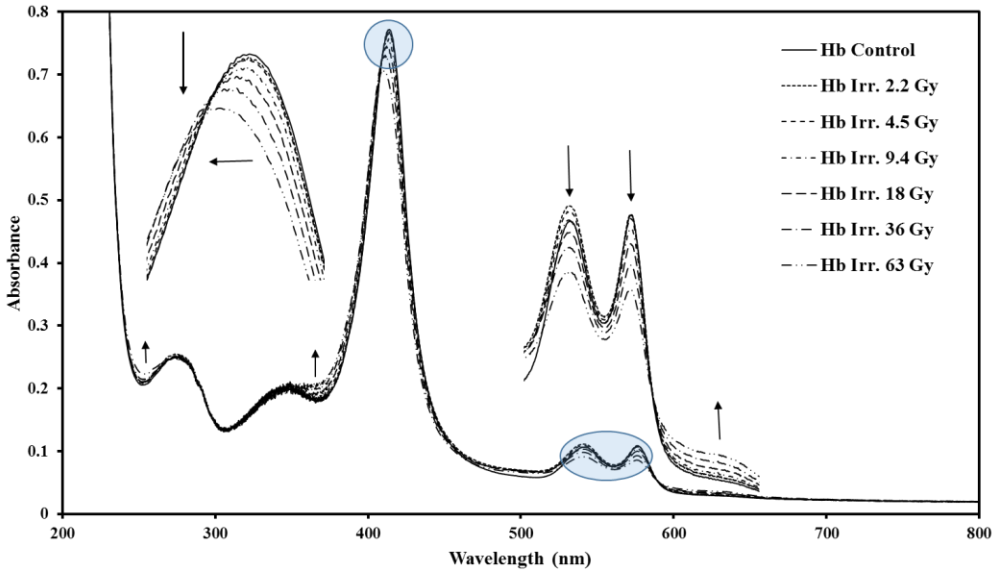


شکل ۱: طیف جذبی هموگلوبین در ناحیه nm ۸۰۰-۲۰۰

[1] Merck
[2] Sigma

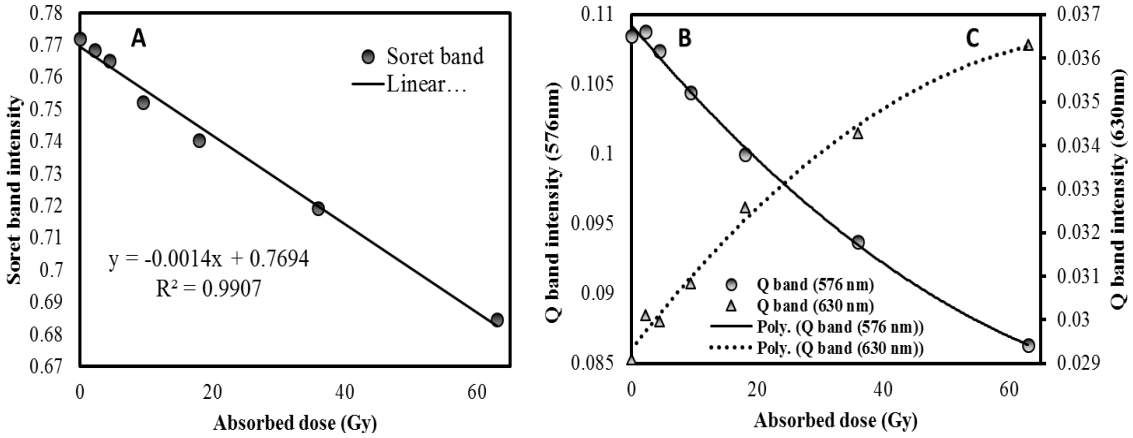
هموگلوبین دارای پنج پیک اصلی بوده که به ترتیب در ۲۷۸، ۳۵۰، ۴۱۲، ۵۴۱ و ۵۷۷ نانومتر دیده می‌شود. پیک ۴۱۲ nm بعنوان پیک سورت و جفت پیک ۵۴۱ nm و ۵۷۷ تحت عنوان Q بند مربوط به انتقالات الکترونی π به π* بوده و مشخصه هموگلوبین اکسی است. پیک ۲۷۸ nm از آمینواسیدهای آروماتیک نشات می‌گیرد و پیک ۳۵۰ nm مربوط به اتصال Fe گروه هیم به هیستیدین زنجیره پلی پپتیدی است.

نمونه هموگلوبین با آهنگ دز ثابت و زمان‌های مختلف، پرتودهی شده و طیف جذبی تهیه شد (شکل ۲). با افزایش دز جذبی، شدت پیک‌های سورت و Q بند کاهش یافته و در عین حال سه ناحیه طیفی در حوالی ۶۳۰ nm، ۳۶۹ و ۲۵۵ افزایش نشان داد.



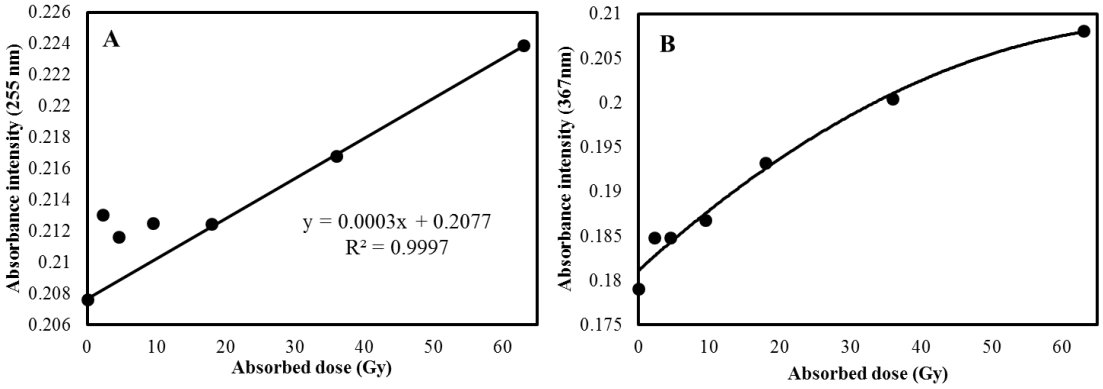
شکل ۲: طیف جذبی هموگلوبین پرتو دیده با پرتو گاما با دز ۲ تا ۶۳ گری

آهنگ تغییرات شدت پیک‌های سورت و ناحیه Q بند نسبت به دز جذبی نشان داده شده و نمودارهای منطبق با این نقاط ترسیم گردید(شکل ۳).



شکل ۳: نمودار تغییرات شدت جذب نواحی طیفی هموگلوبین پرتودیده با دز ۲-۶۳ Gy (A) تغییرات شدت پیک سورت، (B) و (C) به ترتیب تغییرات ناحیه Q بند در ۵۷۶ و ۶۳۰ nm

علاوه بر نواحی طیفی سورت و Q بند بعنوان دو ناحیه مشخصه ترکیبات هیم‌دار، تغییرات شدت جذب در طول موج ۳٦۷ nm بعنوان مشخصه پایداری ساختار کلی هموگلوبین و ناحیه ۲۵۵ nm بعنوان پیک مشخصه تغییرات محیطی ناشی از حضور ترکیبات فعال رادیکالی ترسیم گردید (شکل ٤).



شکل ٤: نمودار تغییرات شدت جذب علیه دز جذبی در طول موج ۲۵۵ nm (A) و ۳٦۷ nm (B)

بحث و نتیجه‌گیری :

برهمکنش پرتو گاما با هموگلوبین منجر به تغییرات ساختاری هموگلوبین می‌گردد که این تغییرات ساختاری با استفاده از کروموفورهای موجود در بخش‌های مختلف ساختار، قابل ردیابی و اندازه گیری است. تفاوت رفتار پرتو با گروه سخت هیم نسبت به گروه نرم پلی پپتیدی در نتایج بدست آمده کاملاً مشخص است. اثر متفاوت پرتو بر بخش‌های مختلف و نیز روند تغییرات نواحی مختلف طیفی در مواجهه با پرتو گاما، میتواند جهت شناسایی و تفکیک پرتوهای مختلف و یا منابع مختلف پرتویی بکار رود. همچنین، نمودار تغییرات شدت جذب علیه دز جذبی چنانچه خطی باشد می‌تواند بعنوان بیومارکر مولکولی دز جذبی، مورد استفاده قرار گیرد.

به منظور انتخاب طول موج مناسب جهت دزیمتری پرتو، مکانیسم اثر پرتو گاما بر هموگلوبین بصورت مختصر ذکر شده و در ادامه، طول موج‌های مختلف مقایسه شده و طول موج مناسب معرفی می‌گردد. تغییرات طیفی محلول هموگلوبین در مواجهه با دزهای مختلف پرتو گاما در شکل ۲ نشان داده شده است، در این شکل، پیک سورت بعنوان پیک اصلی، با افزایش دز جذبی به سمت طول موج‌های کوتاهتر جابجا شده و شدت آن متناسب با افزایش دز پرتو، کاهش یافته است. جابجایی پیک سورت و کاهش جذب آن همراه با افزایش جذب ناحیه طول موجی ۳٦۷ nm بعنوان مشخصه های اصلی خروج هیم از پاکت هیدروفوب گلوبین می‌باشد. علاوه بر پیک سورت، جفت پیک ناحیه Q بند با دو پیک α و β که مختصه اصلی حالت اکسی هموگلوبین است، با افزایش دز کاهش یافته و پیک جدیدی در ٦۳۰ nm مربوط به حالت مت هموگلوبین پدیدار شده است که با افزایش دز، شدت آن افزایش یافته است. در مت هموگلوبین علیرغم

حالت اکسی، Fe(II) به Fe(III) تغییر اکسایش می‌دهد. در شکل ۳ روند تغییر و تبدیل اکسی به مت با افزایش دز پرتو نشان داده شده است. در این شکل، شیب کاهش اکسی بیشتر از شیب افزایش مت بوده که بیانگر تبدیل بخشی از اکسی هموگلوبین به مت بوده و بخش دیگر اکسی، از مسیرهای دیگر نظیر تبدیل به حالت داکسی و تخریب کامل هیم پیش رفته است. ناحیه گلوبین در ۲۷۸ nm مربوط به آمینواسیدهای آروماتیک تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین، با افزایش دز پرتو، تغییر چندانی نشان نداده است (شکل ۲) که حاکی از برهمکنش ناچیز پرتو گاما با زنجیره پلی پپتیدی می‌باشد و حال آنکه تغییرات شدید طیفی گروه هیم، نشانگر برهمکنش ترجیهی پرتو گاما با گروه هیم بوده است[٦].

نمودارهای B و C شکل ۳، روند تغییرات شدت جذب در ناحیه Q بند را در دو طول موج ٥٧٦ nm و ٦٣٠ نشان می‌دهد. روند کاهش جذب در ٥٧٦ nm و افزایش آن در ٦٣٠ nm، تا محدوده دز ٤٠ Gy خطی بوده که با افزایش دز، از حالت خطی خارج شده است. میزان انحراف از حالت خطی در طول موج ٦٣٠ بیشتر از ٥٧٦ می باشد. از میان پیک‌های موجود در طیف جذبی هموگلوبین، پیک سورت بدلیل خطی بودن تغییرات شدت جذب با دز پرتو، گزینه مناسبی جهت مقاصد دزیمتری است. اگرچه بررسی حدود پایین و بالای دز جذبی جهت تعیین حدود خطی ضروری است. سایر نواحی طیفی هموگلوبین، جهت بررسی‌های کیفی نظیر نوع پرتو می‌تواند استفاده گردد.

علاوه بر نواحی طیفی هموگلوبین، پیک دیگری در ناحیه ۲۵۵ nm رشد کرده است. این ناحیه مربوط به ترکیبات فعال اکسیژنی نظیر پراکسید هیدروژن می‌باشد که با عبور پرتوهای یونیزان از محیط‌های آبی تولید می‌گردد. روند افزایش ترکیبات فعال اکسیژنی در دزهای بالاتر خطی بوده که استفاده از این ناحیه طیفی بعنوان دزیمتر را در دزهای بالاتر ممکن می‌نماید.

مراجع :

[1] K. Arshak and O. Korostynska, “Gamma Radiation Dosimetry Using Tellurium Dioxide Thin Film Structures,” *Sensors*, Vol. 2, No. 8, pp. 347–355, 2002.

[2] V. Kortov, “Materials for thermoluminescent dosimetry: Current status and future trends,” *Radiat. Meas.*, Vol. 42, No. 4–5, pp. 576–581, 2007.

[3] M. Shourian, H. Tavakoli, H. Ghourchian, and H. Ra, “Detection and dosimetry of gamma ray emitted from thallium-201 and technetium-99m based on chemiluminescence technique,” *Radiat. Meas.*, Vol. 45, pp. 906–910, 2010.

[4] N. Deborah, “Molecular Dosimetry,” *Anal. Chem.*, Vol. 65, No. 7, pp. 353–355, 1993.

[5] L. Fotouhi, S. Yousefinejad, N. Salehi, A. A. Saboury, N. Sheibani, and A. A. Moosavi-Movahedi, “Application of merged spectroscopic data combined with chemometric analysis for resolution of hemoglobin intermediates during chemical unfolding,” *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, Vol. 136, Part C, pp. 1974–1981, 2015.

[6] J. Rafiei, K. Yavari, and A. A. Moosavi-Movahedi, “Preferential role of iron in heme degradation of hemoglobin upon gamma irradiation,” *Int. J. Biol. Macromol.*, Vol. 103, pp. 1087–1095, 2017.