بررسی و تعیین دوز پرتوهای گامای چشمه کبالت -۶۰ جهت غیر فعال ساختن لنفوسیتهای خون محیطی

دکتر علیرضا شیرازی I

***هاجر خادم شریعت** II

سید ربیع مهدوی III

دکتر فرهاد سمیعی IV

دکتر جمشید حاجتی V

دکتر کامران علی مقدم VI

چکیده

بیماری واکنش علیه میزبان (GVHD = Graft-vs.-Host Disease) یک مشکل حاد کلینیکی است که در برخی موارد به دنبال انتقال خون و فراوردهای آن رخ می‌دهد. آمار مرگ و میر ناشی از این واکنش بسیار بالا بوده و در بیش از ۹۰٪ موارد منجر به مرگ بیمار می‌شود. رایج‌ترین و مهمترین شیوه پیشگیری از وقوع GVHD، غیر فعال ساختن لنفوسیتهای خون اهدایی و جلوگیری از تکثیر آنها در بدن میزبان است که این کار بطور عمده با استفاده از پرتوهای گاما صورت می‌گیرد. با وجود تحقیقات بسیار در این زمینه، دوز لازم برای فعال ساختن کامل سلولهای لنفوسیتی مشخص نیست. در این مطالعه تأثیر پرتوهای گامای حاصل از چشمه کبالت ـ ٦٠ (دستگاه تله تراپی کبالت، انرژی متوسط پرتو گاما: ۱/۲۵ Mev) روی درصد حیات(viability) و قدرت همانند سازی لنفوسیتها مورد بررسی قرار گرفت که طی آن سلولهای لنفوسیتی از خون محیطی افراد طبیعی جدا شده و تحت تابش رده‌های دوز ٤٠٠٠-٥٠٠ سانتی‌گری از پرتو گاما قرار گرفتند. درصد حیات سلولها پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت در هر رده از دوز با روش رنگ سنجی تترازولیوم برآورد شد. میزان تکثیر لنفوسیتها در پاسخ به میتوژن فیتوهماگلوتینین با ۲ روش BrdU و MTT مورد ارزیابی قرار گرفت. به موازات افزایش دوز تابشی، کاهش درصد حیات و کاهش قدرت تکثیر سلولها مشاهده گردید که این افت در دوزهای بالاتر و دوره کشت طولانی‌تر کاملاً محسوس بوده است. مقدار Do برآورد شده با روش رنگ سنجی تترازولیوم در حد ۱/٤٤ گری می‌باشد. تجزیه و تحلیل یافته‌ها با روش t-test ، تفاوت آماری معنی‌داری را بین تکنیکهای تکثیری به کار رفته نشان نداد (P> ۰/۰۵) بدین معنی که در هر دو روش کاهش مشابهی در درصد تکثیر سلولهای پرتو دیده ایجاد شده بود. با توجه به فعالیت همانندسازی ناچیز سلولها در رده‌های بالای پرتودهی، گستره دوز تابشی مورد نیاز به منظور غیرفعال ساختن لنفوسیتهای خون در محدوده ٤٠٠٠-٣٠٠٠ سانتی گری توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: ۱ – بیماری واکنش علیه میزبان ۲ – روش متیل تیازول تترازولیوم ۳ – برومو دی اکسی یوریدین ۴ – میتوژن فیتوهماگلوتینین ۵ – پرتودهی خون

این مقاله خلاصه‌ای است از پایان نامه خانم هاجر خادم شریعت جهت دریافت مدرک کارشناسی ارشد فیزیک پزشکی به راهنمایی دکتر علیرضا شیرازی و مشاوره دکتر جمشید حاجتی، دکتر فرهاد سمیعی و دکتر کامران علی‌مقدم، سال ۱۳۸۱.

I) استادیار گروه فیزیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

II) کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشجوی دوره دکتری، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران(*مولف مسئول)

III) کارشناس ارشد فیزیک پزشکی، دانشجوی دوره دکتری دانشگاه تهران، مربی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی بابل.

IV) استادیار گروه رادیوتراپی ـ انکولوژی، فوق تخصص AFSA، انستیتو کانسر بیمارستان امام‌خمینی، خیابان باقرخان. دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

V) استادیار گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

VI) استادیار و فوق تخصص خون و انکولوژی، بیمارستان شریعتی، بزرگراه جلال آل احمد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی تهران.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

مقدمه

بیماری واکنش پیوند علیه میزبان(GVHD) یک مشکل نادر و جدی کلینیکی است که پس از انتقال خون و فراوردهای آن در برخی از گیرندههای حساس رخ میدهد.

مشخصات ظاهری این پاسخ ایمونولوژیکی به صورت تب، راش پوستی، اسهال و درگیری گرههای لنفاوی است(۱). GVHD حاد بین ٤ تا ۳۰ روز پس از انتقال خون کامل، گلبولهای سرخ، فراوردهای پلاکتی یا گرانولوسیتی و پلاسمای تازه بروز میکند و آمار مرگ و میر ناشی از آن به علت التهاب، تشخیص دیرهنگام و سرکوب شدید مغز استخوان بسیار بالا(۹۰٪) میباشد(۲و۳).

این واکنش بطور مشخص در چند گروه خاص از گیرندگان خون و فراوردهای سلولی آن گزارش شده است(٦-٤) که عبارتند از: کودکان و نوزادان مبتلا به نقصهای مادرزادی سیستم ایمنی، انتقال خون داخل رحمی یا تعویض خون نوزاد هنگام تولد و انتقال خون به بیمارانی که درمان سرکوب کننده سیستم ایمنی دریافت کرده بودند (شیمی درمانی یا رادیو تراپیهای سنگین).

بیماری GVHD به دنبال انتقال لنفوسیتهای فعال و تکثیر شونده بیگانه و همانندسازی این سلولها در بدن میزبان رخ میدهد.

علاوه بر تعداد و قابلیت زیست (viability) لنفوسیتهای آلاینده خون اهدایی، پاسخ سیستم ایمنی بدن بیمار و درجه سازگاری ایمونولوژیکی بین دهنده و گیرنده نیز در بروز واکنش GVHD مؤثر است(۳و ۷).

اقدامات درمان و دارویی در اغلب موارد برای نجات بیماران مبتلا به GVHD مؤثر نبوده و به مرگ بیمار منتهی میشود، به همین دلیل پیشگیری از وقوع آن از اهمیت خاصی برخوردار میباشد(۸).

در حال حاضر در سراسر جهان تنها روش مؤثر و متداول برای جلوگیری از GVHD، پرتودهی خون و فراوردههای آن با اشعه گاما است(۳، ٥و ۹). اما با توجه به اینکه ماهیت تأثیرگذاری پرتوهای X و گاما بر مواد بیولوژیکی کاملاً مشابه میباشد، میتوان از یک چشمه Cs- ۱۳۷ یا Co- ٦۰(گسیلکننده گاما) یا یک سیستم مولد پرتو X برای این منظور استفاده کرد.

متأسفانه دوز لازم برای غیرفعال ساختن لنفوسیتهای خون بطور دقیق مشخص نیست(۱).

در این تحقیق با استفاده از روش رنگسنجی تترازولیوم (MTT) اثراشعه گاما روی درصد حیات (viability) سلولهای لنفوسیتی پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت برآورد شد و میزان غیرفعال ساختن و ممانعت از تکثیر سلولها به دنبال پرتوگیری در پاسخ به میتوژن فیتوهماگلوتینین با ۲ روش مختلف بروموديداکسییوریدین (BrdU) و متیل تیازول تترازولیوم(MTT) مورد ارزیابی قرار گرفت.

هدف از این مطالعه، بررسی تابع دوز ـ پاسخ و تخمین دوز لازم برای فعال ساختن و ممانعت از تکثیر سلولها بوده است.

روش بررسی

جداسازی سلولها از خون محیطی: سلولهای لنفوسیتی مطابق روش استاندارد موجود و بدین صورت جدا شدند(۱۰). ابتدا خون وریدی افراد طبیعی با استفاده از هپارین گرفته شد و پس از رقیق شدن به نسبت ۱ به ۲ با محلول بافر هنکز (Hanks ،Sigma)، روی فایکول (Ficoll-Hypaque ،Sigma) منتقل گردید تا سلولهای تک هستهای آن جدا شود. سلولهای جدا شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شد و پس از ۲ بار شستشو توسط بافر با غلظت $۲/٥\times۱۰^{٦}$cell/ml در محیط کشت کامل حاوی ۹۰٪ از ماده کشت

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

(RPMI 1640، Sigma) و ۱۰٪ سرم جنین گوساله(FCS، Sigma)، پنی‌سیلین (۱۰۰U/ml)، استرپتومایسین(۱۰۰mg/ml) و ال ـ گلوتامین(۲mM) قرار گرفت.

ـ پرتودهی: نمونه‌های سلولی در لوله‌های دردار پلاستیکی(حجم ۱/۵ میلی‌لیتر) استریل تحت تابش پرتو گامای حاصل از چشمه ۶۰ -Co (Theratron 780، Canada) با آهنگ پرتودهی ۵/۴۰Gy/min قرار گرفتند. پرتودهی در فاصله ۸۰ سانتیمتر از چشمه و از ۲ میدان قدامی و خلفی انجام شد.

گستره دوزهای تابشی برای تعیین درصد حیات سلولها در محدوده ۴۰-۵ گری و با فواصل ۵ گری بوده است.

بررسی پاسخ تکثیری در هر یک از روشهای MTT و BrdU با ۴ رده دوز تابشی ۱۰، ۲۰، ۳۰و ۴۰ گری صورت گرفت.

به منظور تعیین مقدار D_0 سلولهای لنفوسیتی، از ۳ رده تابشی ۱/۵، ۳و ۵ گری استفاده گردید.

در هر یک از آزمونهای انجام شده یک نمونه کنترل نیز در نظر گرفته شد.

ـ روش MTT: نمونه‌ها پس از پرتوگیری به میکروپلیت استریل ۹۶ خانه‌ای ته گرد (Nunc) انتقال یافته و به مدت ۲۴ و ۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباتور مرطوب حاوی CO_2 ۵٪ و دمای $37^{\circ}c$ کشت داده شدند.

به منظور کنترل تکرارپذیری آزمون، ۶ چاهک برای هر رده از دوز تابشی در نظر گرفته شد.

در روش MTT تغییر رنگ زرد به بنفش اساس تمایز بین سلولهای زنده و مرده می‌باشد و مقدار دانسیته نوری (Optical Density) هر چاهک مشخص کننده میزان این تبدیل رنگ ناشی از فعالیت دهیدروژناز میتوکندری‌های سلولهای زنده است(۱۱).

محلول تترازولیوم از حل کردن ۲/۵mg پودر ام.ت.ت.(MTT، Sigma) در یک میلی‌لیتر بافر (PBS، Sigma) به دست آمد.

این محلول با عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر از عوامل آلاینده پاک شد که به مدت ۴ هفته در تاریکی قابل نگهداری می‌باشد(۱۱).

پس از پایان مدت کشت، ۲۰ میکرو لیتر از محلول آماده MTT به هر چاهک افزوده شده و پس از ۴ ساعت انکوباسیون در دمای $37^{\circ}c$ و سانتریفوژ (۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰)، محیط رویی برداشته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر الکل (ایزوپروپانل) به هر چاهک افزوده شد و پس از ۳۰ دقیقه جذب نوری (OD) میکروپلیت توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (ELISA reder ،Behring ،Germany) در طول موج ۵۷۰ نانومتر در مقایسه با طول موج مرجع ۶۵۰ نانومتر خوانده شد.

پس از آن درصد حیات(viability) سلولها در هر رده از دوز به این صورت برآورد گردید(۱۲):

$$Viability[\%]=(OD_{irradiated}-OD_{BG})\times 100/(OD_{control}-OD_{BG})$$

ـ روش بررسی تکثیر سلولهای لنفوسیتی با استفاده از BrdU: در این روش از آنالوگ تیمیدین (برومو دی اکسی یوریدین) به عنوان شاخصی برای اندازه‌گیری میزان تکثیر سلولی استفاده می‌شود.

BrdU درمرحله سنتز DNA وارد سلولهای جدید شده و با آنتی‌بادی ضد BrdU نوعی فراورده رنگی به وجود می‌آید که میزان جذب نوری آن با دستگاه اسپکتروفتومتر قابل اندازه‌گیری است.

مقدار OD بطور مستقیم با سطح BrdU وارد شده به DNA سلولی و مقدار تکثیر سلولها متناسب است(۱۳).

برای انجام تست فوق از کیت (BrdU ،Sigma) استفاده گردید.

پس از پرتودهی و انتقال سلولها به میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف (Nunc)، ۴ میکرولیتر از محرک فیتوماگلوتینین (Sigma) با غلظت ۱٪ به هر چاهک افزوده شد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

در هر ستون ۳ چاهک برای سلولهای تحریک شده و ۳ چاهک نیز برای رشد عادی سلولها در نظر گرفته شد. یک ستون نیز به گروه کنترل اختصاص یافت.

سلولها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مرطوب حاوی CO_2 ۵٪ و دمای $37^{\circ}c$ قرار گرفتند، سپس ۱۰ میکرولیتر از محلول BrdU به هر چاهک افزوده شد و به مدت ٦ ساعت در دمای $37^{\circ}c$ آنکوبه گردید. سلولها پس از شستشو به مدت ۳۰ دقیقه در دمای $-20^{\circ}c$ در مجاورت اتانول ثابت شدند.

پس از شستشوی مجدد، ۱۰۰ میکرولیتر محلول نوکلئاز و پس از ۳۰ دقیقه ۱۰۰ میکرولیتر آنتی‌بادی ضد BrdU به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه آنکوبه گردید.

در مرحله آخر سلولها به مدت ۳۰ دقیقه در مجاورت پراکسیداز قرار داده شدند و دانسیته نوری در طول موج ٤٠٥ نانومتر در مقایسه با طول موج مرجع ٤٩٠ نانومتر خوانده شد. پاسخ تکثیری سلولها در برابر پرتو گاما برای هر یک از دستگاههای مورد استفاده به این صورت به دست آمد(۱۳):

$$\text{Stimulation Index(SI)}=OD_{(irradiated+PHA)}/OD_{(irradiated-PHA)}$$

از مقایسه SI گروه پرتودیده و کنترل می‌توان به اثر بازدارندگی پرتوهای گاما بر تکثیر سلولهای تابش دیده پی برد:

$$\text{Ratio}[\%]=SI_{(irradiated)}\times 100/SI_{(control)}$$

ـ روش بررسی پاسخ تکثیری سلولها با استفاده از MTT: در این روش پس از جداسازی، پرتودهی و انتقال سلولها به میکروپلیت، ٤ میکرولیتر از محرک فیتوهماگلوتینین (PHA ،Sigma) با غلظت ۱٪ به هر چاهک افزوده شد.

در هر ستون ۳ چاهک برای سلولهای تحریک شده و ۳ چاهک نیز برای رشد عادی سلولها در نظر گرفته شد. یک ستون نیز به گروه کنترل اختصاص یافت. سلولها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور مرطوب حاوی CO_2 ۵٪ و دمای $37^{\circ}c$ قرار گرفتند.

روش افزودن محلول MTT، مراحل انجام تست و نحوه خواندن دانسیته نوری مشابه روش تعیین درصد حیات (viability) بوده است. درصد تکثیر سلولها با استفاده از فرمول روش BrdU برآورد شد.

ـ دوزیمتری: بررسی آهنگ پرتودهی ماشین تله‌تراپی کبالت با استفاده از دوزیمتر فارمر صورت گرفت.

روش تجزیه و تحلیل آماری: مقایسه نتایج به دست آمده با روش آماری t-Student test تحت نرم‌افزار SPSS انجام شد و اختلاف آماری در سطح $P>0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج

نتایج به دست آمده از میانگین درصد حیات (viability) سلولها با روش رنگ‌سنجی تترازولیوم روی ۱۲ نمونه مستقل سلولی نشان دهنده کاهش سلولها در برابر افزایش دوز تابشی بوده است(نمودار شماره ۱). افت تعداد سلولها پس از ٤٨ ساعت کاملاً بارز بود منحنی بقای سلولهای لنفوسیتی که با روش فوق ترسیم شد، فاقد هر گونه شانه‌ای بوده و مقدار D_0 با توجه به شیب منحنی در حد ۱/٤٤ گری تخمین زده شد(نمودار شماره ۲).

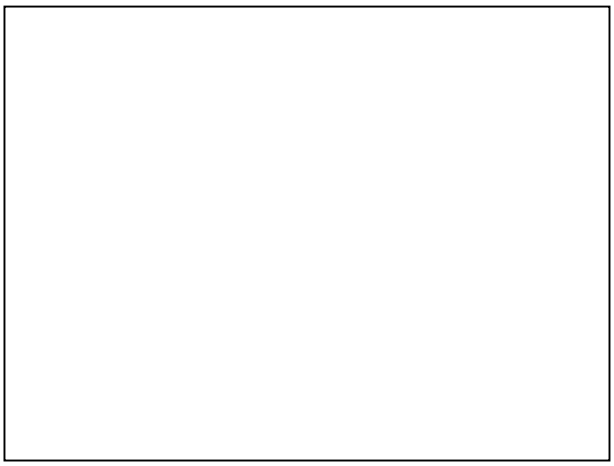
درصد ممانعت از تکثیر سلولهای لنفوسیتی پس از پرتوگیری با اشعه گاما و تحریک میتوژنی برای هر یک از روشهای BrdU و MTT در قالب نمودار شماره ۳ نشان داده شده است.

در نمودار فوق بیش از ۳۰٪ کاهش در قدرت همانندسازی سلولها در همه رده‌های پرتودهی در مقایسه با گروه کنترل مشاهده می‌شود.

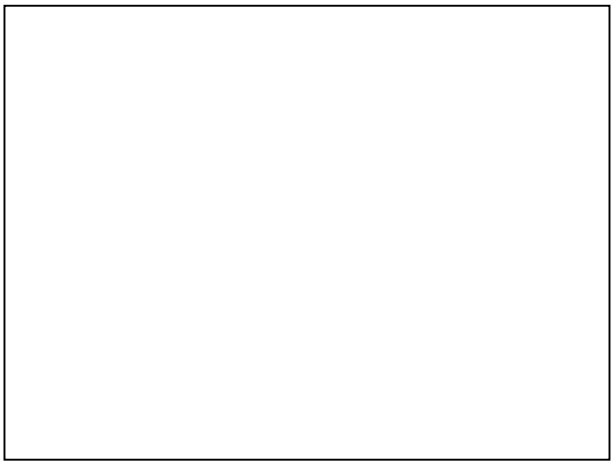
نمودار مقایسه‌ای درصد تکثیر حیات لنفوسیتهای پرتو دیده تفاوت معنی‌دار و قابل توجهی را بین یافته‌های هر دو روش نشان نداد($P>0/05$).

میزان هم‌خوانی نتایج اندیس شبیه‌سازی ۲ روش تکثیری مورد بحث در نمودار شماره ٤ نشان داده شده است که در حد بالای ۰/۹۹۵ بوده است.

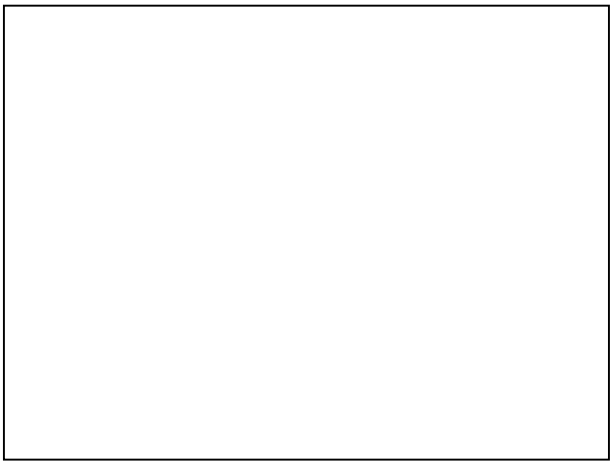
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]



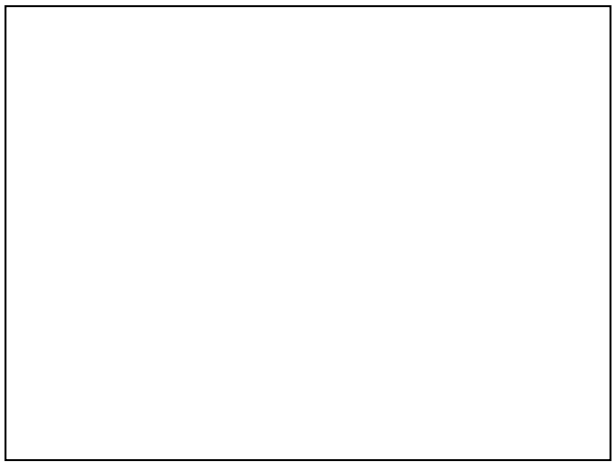
نمودار شماره ۱- کاهش درصد حیات سلولهای لنفوسیتی پس از پرتوگیری



نمودار شماره ۲- منحنی بقای سلولهای لنفوسیتی



نمودار شماره ۳- مقایسه درصد تکثیر سلولهای لنفوسیتی در ۲ تکنیک MTT و BrdU



نمودار شماره ۴- همخوانی روشهای تکثیری (R=۰/۹۹۵)

بحث

پرتودهی خون و فراورده‌های خونی با اشعه گاما، بیش از ۳ دهه است که به منظور جلوگیری از واکنش حاد GVHD مورد استفاده مراکز انتقال خون و پیوند مغز استخوان قرار می‌گیرد(۵).

در پرتودهی خون و فراورده‌های آن همواره ۲ نکته حائز اهمیت بوده است: ۱- مقدار دوز مناسبی که بتواند لنفوسیتها را غیرفعال کند و در عین حال آسیبی به سایر سلولهای خونی وارد نکند.

۲- طراحی شیوه مناسب پرتودهی و انتخاب وسیله‌ای که توزیع دوز یکنواختی را در حجم تابشی به وجود آورد.

بقای تابشی سلولها بطور معمول با روشهای تشکیل کلونی مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که احتمالاً قابل اعتمادترین و حساسترین روش می‌باشد، هر چند که محدودیتهایی از جمله زمان لازم برای تشکیل کلونی، احتمال آلودگی پلیتها در دوره طولانی کشت و مشکل کار با سلولهایی که بازده کشت پایینی دارند را در بر می‌گیرد.

از جمله روشهای رشدی که با قابلیت بالا بتدریج جایگزین روش سنتی کشت کلونوژنیک شده است، روش رنگسنجی MTT می‌باشد(۱٤).

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

مزایای این تست عبارت است از: خواندن سریع و نیمه خودکار، ارزیابی کیفی، کم هزینه بودن نسبی، تکرارپذیری بالا، تعداد کمتر سلولهای مورد نیاز برای رشد و سهولت تشخیص سلولهای رشد یافته در حالت سوسپانسیون(۱۱).

با توجه به یافته‌های سایر محققان، به نظر می‌رسد که تست MTT در برخی موارد به دلیل ماهیت سنجش از طریق فعالیت میتوکندری سلولهای زنده، درصد بقای سلولها را تا حدی بالاتر از روشهای کلونوژنیک برآورد می‌کند(۱۵و ۱۶).

در این مطالعه از نمک تترازولیوم در بررسی مقدار viability لنفوسیتها پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت، تعیین حساسیت پرتوی، برآورد مقدار D_0 سلولها و نیز ارزیابی تکثیر استفاده شده است.

هر چند که درصدی از حیات پس از دوره‌های کشت مورد نظر حتی در رده‌های بالای پرتودهی مشاهده می‌شود(نمودار شماره ۱)، اما این امر به دلیل تأخیر زمانی مرگ سلولهای آسیب دیده به دنبال پرتوگیری طبیعی به نظر می‌رسد. بطوری که در دوره‌های طولانی‌تر کشت (۵و ۷ روزه) مقدار OD نمونه‌ها به سطح زمینه (Back Ground) نزول کرده و در واقع سلول زنده‌ای باقی نمی‌ماند.

پارامتر D_0، شاخص حساسیت پرتوی گونه‌های سلولی مورد آزمایش بوده و از روی شیب قسمت خطی منحنی بقا محاسبه می‌شود(۱۷).

Stewart و همکارانش در سال ۱۹۸۸، سلولهای لنفوسیتی را در وضعیتهای مختلف (تابش‌دهی، تحریکی، عادی و ترکیبی از این روشها) قرار داده و با تکنیک فلوسایتومتری مقدار D_0 را در گستره ۲/۴-۰/۶ گری تخمین زدند(۱۸).

مقدار D_0 برآورد شده برای لنفوسیتها توسط Imada & Norimura در سال ۱۹۹۴ در حدود ۱/۵۴-۰/۷۲ گری بوده است(۱۹).

روش آزمایشی MTT در این تحقیق، مقداری معادل ۱/۴۴ گری را به عنوان D_0 سلولهای لنفوسیتی ارائه کرد که در مقایسه با کارهای انجام شده در گذشته، تأییدی بر صحت نتایج این تست می‌باشد.

با توجه به یافته‌های آزمایشگاهی می‌توان از این روش کم هزینه، ساده و با تکرارپذیری بالا در تخمین میزان حساسیت پرتوی گونه‌های مختلف سلولی استفاده کرد.

به منظور بررسی و ارزیابی قدرت تکثیری سلولهای لنفوسیتی پس از پرتوگیری با اشعه گاما از روش تحریک میتوژنی سلولها و مشاهده پاسخ همانندسازی آنها استفاده شد.

نتایج به دست آمده در قالب درصد همانندسازی بیان کننده افت شدید توانایی تکثیر سلولها در مقایسه با گروه کنترل بخصوص در دوزهای بالا (۳۰ و ۴۰ گری) بوده است(نمودار شماره ۳).

با توجه به عدم وجود تفاوت آماری قابل توجه در یافته‌های تستهای MTT و BrdU و هم‌خوانی بسیار مطلوب این روشها(نمودار شماره ۴)، به نظر می‌رسد که هر دو تکنیک در بیان کاهش درصد تکثیر سلولهای لنفوسیتی پس از پرتوگیری موفق بوده‌اند.

Rosen و همکارانش در سال ۱۹۹۳ پاسخ میتوژنی سلولها را با روش رایج جذب تیمیدین پرتوزا مورد بررسی قرار داده و حداقل دوز ۳۰ گری را برای توقف کامل پاسخ تکثیری و غیرفعال ساختن فعالیت همانندسازی سلولها به دست آوردند(۲۰).

استفاده از ۲ روش MTT و BrdU علاوه بر تأیید نتایج مطالعات انجام شده از مزایای سهولت و سادگی انجام کار، هزینه نسبی پایین‌تر و ایمنی بیشتر به دلیل عدم استفاده از مواد رادیواکتیو برخوردار می‌باشد.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

از آنجا که همواره کمترین دوز تابشی ممکن برای غیرفعال ساختن لنفوسیتهای آلاینده خون اهدایی مورد نظر بوده است، تا مدتها حداقل دوز ۱۵ گری به این منظور مورد استفاده قرار می‌گرفت(۲۱).

نخستین بررسیهای دقیق انجام شده روی مکانیسم پاسخ‌گویی سلولهای لنفوسیتی در برابر عوامل تحریکی پس از پرتودهی توسط Valerius و همکارانش در سال ۱۹۸۱ انجام شد که حداقل دوز ۲۰ گری را برای غیرفعال ساختن کامل لنفوسیتها مطرح نمود(۲۲).

به دلیل گزارش وقوع GVHD پس از استفاده از این دوز برای تابش‌دهی فراورده‌های خونی مقدار حداقل دوز فوق زیر سؤال رفت(۲۳).

Pelzynski و همکارانش در سال ۱۹۹٤ با استفاده از روش LD(limitimg dilution)، پاسخ سلولهای لنفوسیتی را مورد بررسی قرار دادند و حداقل دوز ۲۵ گری را پیشنهاد کردند(۲٤).

یافته‌های حاصل از بررسیهای پاسخ تکثیری سلولها با ۲ روش MTT و BrdU در این مطالعه، دوزهایی در محدوده ٤۰-۳۰ گری را به منظور غیر فعال ساختن کامل لنفوسیتها پیشنهاد می‌کند که در تأیید توصیه‌های قبلی می‌باشد و به نظر می‌رسد که برای تابش‌دهی خون و فراورده‌های خونی و جلوگیری از بروز واکنش مرگبار GVHD مناسب باشد.

به عنوان یک نتیجه‌گیری کلی می‌توان گفت که روش MTT assay، روش مناسبی است که در مدت زمانی کوتاه، با هزینه اندک و با قابلیت تکرارپذیری بالا، نتایجی قابل مقایسه با روشهای سنتی بررسی بقای تابشی سلولها ارائه می‌دهد.

منحنی بقای سلولهای لنفوسیتی فاقد هر نوع شانه‌ای بوده و D_0 به دست آمده در حد ۱/٤٤ گری است.

پاسخ تکثیری سلولها با ۲ روش MTT و BrdU پس از پرتوگیری با اشعه گاما، نشان دهنده حذف فعالیت تکثیری در دوزهای ۳۰ و ٤۰ گری می‌باشد.

بنابراین با توجه به یافته‌های حاصل از مطالعات سایر محققان و نتایج این تحقیق، گستره تابشی ٤۰-۳۰ گری برای غیرفعال ساختن لنفوسیتهای خون اهدایی و پیشگیری از GVHD توصیه می‌گردد.

تقدیر و تشکر

با تشکر از گروه ایمونولوژی دانشکده پزشکی، سازمان انتقال خون، انستیتو کانسر بیمارستان امام خمینی، بخش پیوند مغز استخوان بیمارستان شریعتی(دانشگاه علوم پزشکی تهران) و بخش تحقیقات کشاورزی مرکز SSDL (سازمان انرژی اتمی) که در انجام این پژوهش ما را یاری کرده‌اند و با سپاس از تمام افرادی که به نوعی در پیشبرد این راه دشوار ما را همراهی کرده‌اند.

منابع

1- Richard J., Davey RJ., National institues of health bethesda, maryland. TA-GVHD and the irradiation of blood components, Immunol Inves, 1995, 24(1&2), 431-434.

2- Billingham RE., The biology of GVHD, Harvey Lecture, 1996, 62: 21-78.

3- Anderson KC., Weinstein HJ., TA-GVHD, N Engl J Med, 1990, 323: 315-21.

4- Ferrara JI., Deeg HG., GVHD, N Engl J Med, 1991, 324: 667-74.

5- Asai T., Inana S., Ohto H., Suzuki G., Takahashi K., Osada K., et al., Guidelines for

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

irradiation of blood and blood components to prevent PT-GVHD in Japan,Transfusion Med, 2000, 10: 315-20.

6- Postmus PE., Mulder NH., Elema JD., GVHD after transfusion of non irradiated blood cells in patients having received autologous bone marrow, Eur J Cancer Clin Oncol, 1988, 24: 889.

7- Chapman J., Finney RD., Forman K., Kelsey P., Knowles SM., Napier J., Guideline on gamma irradiation of blood components for the prevention of TA-GVHD. Tran Medi, 1996, 6: 261-271.

8- Prezepiorka D., Stovall M., Werch J., and Lichtger B., Use of irradiated blood components, Transfusion Med, 1996, 106: 6-11.

9- Akahoshi M., Takanashi M., Musuda M., Yamashita H., Hidano A., and Hasegawa K., A case of TA-GVHD not prevented by white cell reduction filters, Transfusion, 1992, 25: 293-299.

10- Rose N., Manual of clinical laboratory immunology. 5 th ed., Washington D.C., ASM press, 1999, PP: 252-263.

11- Slavotinek T., McMillan J., and steel CM., Measurement of radiation survival using the MTT assay, Eur J Cancer, 1994, 30(9): 1376-1382.

12- Voc EH., Lutz WK., Hormes P., Hoffmann HD., and Vamvakas S., Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA dsb in cells treated with etopside, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, tritron X-100, gamma-ray, Muta Res, 1998, 413: 83-94.

13- Noe DA., Rock RC., Laboratory medicine, 2nd edition, London, William & Wilkins, 1994, PP: 94-95.

14- Carmichale J., DeGraff WG., Minna JD., Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetic assay: assessment of radiosensitivity, Cancer Res, 1987, 47: 943-946.

15- Ramsay J., and Birrell G., Normal tissue radiosensitivity in breast cancer patients, Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1995, 31: 339-344.

16- Bunnak J., Takigami M., Ito H., Gamma irradiation efect on cultured cells: investigated by the MTT method, J Radiat Res, 1994, 35: 205-212.

17- Hall EJ., Radiobiology for the radiologist, 4 th ed., Philadelphia, J.B.Lippincott Company, 1994, PP: 154-160.

18- Stewart C., Stevenson A., Habbersett RC., The effect of low-dose irradiation on unstimulated and PHA-stimulated lymphocyte subset, Int J Radiat Biol, 1988, 53(1): 77-87.

19- Imada H., and Norimada T., Influence of PHA-stimulated on the cytotoxicity and mutagenocity of X-rays ethylnitrosourea in human peripheral blood T-lymphocytes, Mutat Res, 1994, 310(1): 55-64.

20- Rosen NR., Weidner JG., Boldt HD., Prevention of TA-GVHD: selection of an adequate dose of gamma radiation, J Cancer Res, 1993, 5: 635-69.

21- Masterson ME., Febo R., Pretransfusion blood irradiation: clinical rational and dosimetric consideration, Med Phys, 1992, 19(3): 649-657.

22- Valerius NH., Johansen KS., Platz P., Nielsen O., Rosenkvist J and Sorensen H., Effect of in vitro X-irradiation on lymphocyte and granulocyte function, Scand J Haematol, 1981, 27: 9-18.

23- Lowental RM., Challis DR., Griffiths AE., Chappell R., and Goulder P., TA-GVHD: report an occurrence following the administration of irradiated blood, Transfusion, 1993, 33: 524- 28.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

24- Pelszynski M., Moroff G., Talor B., Luban N., and Quinones R., Effect of gamma irradiation of red blood cell units on T-cell inactivation as assessed by LDA: implication for preventing TA-GVHD, blood, 1994, 83(6): 1683-1689.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]

EVALUATION AND MEASUREMENT OF COBALT-60 GAMMA-RAY FOR THE BLOOD LYMPHOCYTES INACTIVATION

A. Shirazi, Ph.D[I] *H. Khadem Shariat, MSc*[II] *S.R. Mahdavi, MSc*[III] *F. Samiei, MD*[IV]
J. Hajati, Ph.D[V] *K. Alimoghadam, MD*[VI]

ABSTRACT

Transfusion associated graft versus host disease(GVHD) is a serious clinical complication that occurs in some cases after blood and blood products transfusion. The mortality ratio of this disorder is very high and in over 90% of cases lead to patients' death. The procedure routinely used to inhibit GVHD is inactivation of donor blood lymphocytes and prevention of their proliferation in recipients. Gamma radiation is currently the only recommended method for GVHD prevention. In spite of vast studies in this field,effective dose for completely inactivation of lymphocytes is not known. In this study, the effect of γ-ray of teletherapy cobalt machine (mean energy of γ-ray is 1.25 MeV) on lymphocytes viability and proliferation was investigated. Lymphocytes were isolated from normal donor blood and irradiated at doses ranging from 500 to 40000 cGy of γ-ray. Cell viability after 24 and 48 hours in each dose step, was evaluated by colorimetric tetrazolium method (MTT). MTT and BrdU assays were used to assess the response of lymphocytes proliferation with PHA mitogen. By inceasing dose of gamma radiation, cell viability and proliferation function were decreased. In high level of dose and longer time of culture, this effect was observed well. Do value estimation by MTT colorimetric assay was 1.44 Gy. Statistical analysis by t-test method was not significant ($P>0.05$) and decrease in irradiated cell proliferation was similar for two assays. By paying attention to decreased proliferative function in high level of irradiation, the range of 3000-4000 cGy of γ-ray is recommended for blood lymphocytes inactivation.

Key Words: 1) GVHD 2) MTT assay 3) BrdU 4) PHA 5) Blood irradiation

This article is the summary of the thesis of .Khadem Shariat,MSc in Biophysic under supervision of A.Shirazi,Ph.D and consultation with J.Hajati,Ph.D, F.Samiei,MD and K.Alimoghadam,MD, 2002.

I) *Ph.D, Assistant professor of Biophysic, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*

II) *MSc in Biophysics, Ph.D Student, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran(*Correponding author).*

III) *MSc in Biophysics, Ph.D Student, Instructor of Babol University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*

IV) *Assistant professor of AFSA in Radiotherapy-oncology,Cancer Institute of Emam Khomeini Hospital, Bagher Khan Ave, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*

V) *Ph.D,Assistant professor of Immunology, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*

VI) *Assistant professor of Hematology and oncology, Shariati Hospital, Jalal-AL-Ahmad Express way, Tehran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran.*

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-11-18]