

ارزیابی اندازه‌گیری آپوپتوز ناشی از تابش یونیزان در لنفوسیت‌های T به روش فلوسایتومتری به عنوان دزیمتری بیولوژیک

دکتر محمد باقر توکلی^۱، دکتر مجید خیرالهی^۲، علی کیانی^۳، محمد کاظمی^۴، لیلا موهبت^۵،
دکتر شقایق حق جوی جوانمرد^۶، دکتر مهناز رعایایی^۷

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: در حوادث پرتوی مثل انفجار هسته‌ای یا نشت مواد رادیو اکتیو از نیروگاه‌های هسته‌ای و یا حوادث در بخش‌های پزشکی هسته‌ای بیمارستان‌ها، عده‌ی زیادی از افراد به طور تصادفی مقدار نامشخصی از پرتوهای یونیزان را دریافت می‌کنند. اولین قدم برای درمان این افراد توسط پزشک تعیین میزان دز اشعه‌ی دریافتی توسط مصدومان است. در چنین مواقعی و همچنین هنگام رادیوتراپی، برای تعیین میزان دقیق اثربخشی درمان پرتوی یونیزان از دزیمتری بیولوژیک استفاده می‌شود. در دزیمتری بیولوژیک، از شاخص‌های بیولوژیک قابل اندازه‌گیری که در اثر تابش تغییر می‌کنند، برای برآورد و اندازه‌گیری دز تابشی اشعه توسط فرد استفاده می‌شود.

روش‌ها: در این تحقیق آزمونی برای دزیمتری بیولوژیک بر اساس القای آپوپتوز توسط تابش پرتوی گاما در لنفوسیت‌های T خون محیطی ۱۶ داوطلب انجام شد. به این منظور، خون ۱۶ داوطلب به عنوان نمونه گرفته شد. سپس لنفوسیت‌های خون جدا و در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ (Roswell Park Memorial Institute ۱۶۴۰) کشت داده شد و در اتمسفر ۵ درصد CO₂ در دمای ۳۷ °C قرار داده شد. سپس از محیط کشت، نمونه‌هایی تهیه شد و با دزهای مختلف تابش داده شد. نمونه‌ها دوباره به انکوباتور منتقل شدند تا آپوپتوز در آن‌ها اندازه‌گیری شود. آپوپتوز ایجاد شده در اثر تابش در جامعه‌ی سلولی به روش فلوسایتومتری و با استفاده از رنگ‌آمیزی Annexin V + (Fluorescein isothiocyanate) FITC و رنگ PI (Prodium iodide) اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: آپوپتوز ایجاد شده با تابش با دقت کافی قابل اندازه‌گیری است و به دز تابش بستگی دارد. اما میزان آپوپتوز به زمان بعد از دریافت تابش و روش فلوسایتومتری بستگی دارد.

نتیجه‌گیری: امکان استفاده از اندازه‌گیری آپوپتوز پرتوی به عنوان دزیمتر بیولوژیک در زمان‌های کوتاه بعد از پرتوگیری در حوادث پرتوی وجود دارد.

واژگان کلیدی: آپوپتوز، فلوسایتومتری، سلول‌های T، لنفوسیت‌ها، دزیمتری بیولوژیک، تابش

ارجاع: توکلی محمد باقر، خیرالهی مجید، کیانی علی، کاظمی محمد، موهبت لیلا، حق جوی جوانمرد شقایق، رعایایی مهناز. **ارزیابی اندازه‌گیری آپوپتوز ناشی از تابش یونیزان در لنفوسیت‌های T به روش فلوسایتومتری به عنوان دزیمتری بیولوژیک.** مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۴): ۶۲۰-۶۱۰

۱- استاد، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیماری‌های ارثی کودکان و گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی دکتری، گروه فیزیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و مری، گروه فیزیک، دانشکده علوم، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۵- کارشناس ارشد، آزمایشگاه مرکزی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۶- دانشیار، مرکز تحقیقات فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۷- استادیار، گروه انکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

مقدمه

در حوادث پرتوی، مانند حوادث در بخش‌های پزشکی هسته‌ای بیمارستان‌ها، انفجارهای هسته‌ای یا نشت مواد رادیو اکتیو از نیروگاه‌های هسته‌ای، افرادی به طور ناگهانی و ناخواسته در معرض یک دز بالای نامشخص از پرتو یونیزان قرار می‌گیرند. برای درمان این افراد بسیار مهم است که سریع دز تابشی دریافت شده توسط آنان تعیین شود تا پزشک معالج درمان را بر اساس آن انتخاب کند. برای تعیین مقدار اشعه‌ی دریافتی توسط افراد، یک روش متداول که توسط آژانس بین‌المللی انرژی اتمی به عنوان روش استاندارد تأیید شده است، دزیمتری بیولوژیک می‌باشد (۱-۶).

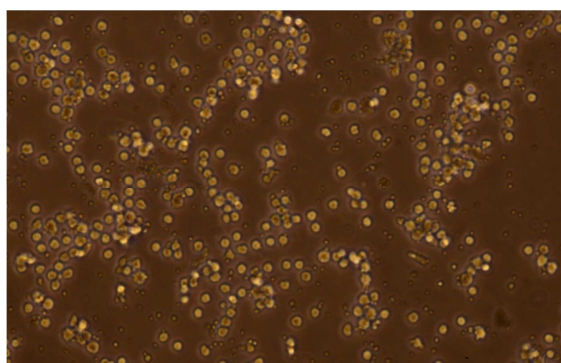
در دزیمتری بیولوژیک از شاخص‌های بیولوژیک که در اثر تابش تغییر می‌کنند و تغییرات آن‌ها قابل اندازه‌گیری است. برای برآورد و اندازه‌گیری دز تابشی دریافت شده توسط فرد استفاده می‌شود. پاسخ این شاخص‌های بیولوژیک به اشعه‌ی دریافتی، باید تکرار پذیر و قابل اعتماد باشد (۷-۱۲). یک روش استاندارد طلایی برای دزیمتری بیولوژیک، شمارش ابیراهی‌های کروموزومی ایجاد شده پس از تابش در لنفوسیت‌های خون است (۱۳-۱۷). تابش *In vivo* و یا *In vitro* لنفوسیت‌های خون، نتایج مشابهی از ابیراهی‌های کروموزومی نشان می‌دهد. بنابراین میزان دز دریافتی یک فرد پرتو دیده در حوادث پرتوی را می‌توان با یک منحنی پاسخ دز که از قبل با تابش دادن لنفوسیت‌های خونی به صورت *In vitro* و شمارش ابیراهی‌های کروموزومی به ویژه شمارش دی ستتریک‌ها به دست آمده است، تعیین نمود. به دلیل عمر طولانی لنفوسیت‌ها، ابیراهی‌های کروموزومی

حتی تا سال‌ها بعد از یک حادثه قابل تشخیص هستند. این منحنی پاسخ دز برای هر مرکز اختصاصی است و منحنی کالیبراسیون نام دارد (۱۷-۱۶).

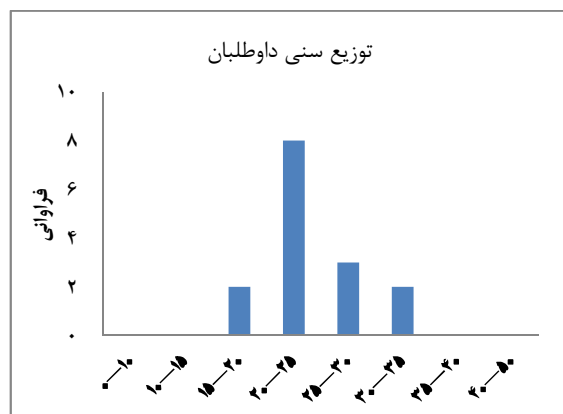
آزمون مشابه دیگری که برای دزیمتری بیولوژیک استفاده می‌شود، شمارش سلول‌های لنفوسیت دارای ریز هسته هنگام تقسیم سلولی است. بعد از تابش یونیزان در پی هر تقسیم سلولی ریز هسته‌ها به صورت یک یا چند جسم کوچک‌تر از هسته و از جنس آن هستند که علاوه بر هسته در سیتوپلاسم سلول‌های دختر دیده می‌شود (۲۱-۱۸). این آزمون ساده‌تر و سریع‌تر است و اندازه‌گیری و تشخیص تعداد زیادی سلول را با استفاده از امکانات پردازش تصویر و یا فلوسایتومتری امکان پذیر می‌سازد. آزمون ریز هسته برای عملیات معمول با تعداد بالای نمونه سریع‌تر قابل انجام است (۲۱-۱۹). به صورت نظری، دزهای حدود ۵۰-۱۰۰ mGy به عنوان کمترین مقادیر قابل تشخیص و یا حد تفکیک آن در دزیمتری بیولوژیک با ابیراهی‌های کروموزومی بیان می‌شوند (۱۷). تحقیقات اخیر نشان داده است که آپوتوز در لنفوسیت‌های خون می‌تواند به عنوان یک دزیمتر بیولوژیک برای اندازه‌گیری دز به کار رود (۲۴-۲۲، ۸).

آپوتوز مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلول‌ها در پاسخ به علایم تهدید کننده و مسمومیت‌ها از جمله تابش است. این پدیده را می‌توان بعد از تابش در جامعه‌ی سلولی به خصوص سلول‌های هسته‌دار خون و مغز استخوان مشاهده نمود. بعد از تابش، علت اصلی مرگ لنفوسیت‌ها آپوتوز است (۲۹-۲۵، ۱۳). آپوتوز در حوادث پرتوی که تعداد زیادی از افراد مقدار زیادی اشعه دریافت کرده‌اند، با سرعت و به راحتی با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر و یک رنگ فلورسانت مانند

هپارینه گرفته شد (شکل ۳). این کار با رعایت پروتکل‌های استاندارد مربوط انجام شد. سپس خون با نسبت مساوی با (Phosphate buffered saline) PBS رقیق شد و خون رقیق شده به آرامی به داخل فالکن دیگری که حاوی ۵ cc محلول فایکل‌های پک بود، منتقل شد و با ۲۰ دقیقه سانتریفوژ در دور ۲۰۰۰ rpm لئوسیت‌ها جدا شدند. لئوسیت‌های جدا شده، با تریپان بلو رنگ‌آمیزی و شمارش شدند و درصد سلول‌های زنده‌ی آن‌ها مشخص شد.



شکل ۲. تصویر لئوسیت‌ها در میکروسکوپ زمینه تاریک با بزرگ‌نمایی ۴۰۰



شکل ۳. توزیع سنی داوطلبان در این مطالعه

سپس سوسپانسیون سلولی به فلاسک حاوی محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ که به آن ۱۰ درصد سرم

(Fluorescein isothiocyanate) FITC می‌تواند اندازه‌گیری شود (۲۹، ۲۳، ۸).

روش‌ها

نمونه‌گیری

در این تحقیق، برای اندازه‌گیری آپتوز در لئوسیت‌ها، یک آزمایش با دستگاه رادیوتراپی کبالت ۶۰ در بیمارستان سیدالشهدا (ع) اصفهان (TearatronPhonix Canada) ترتیب داده شد (شکل ۱) و برای دزهای مورد استفاده در رادیوتراپی (۱۰-۱ Gy) میزان القای آپتوز پس از پرتوگیری با پرتوهای یونیزان در لئوسیت‌های خون افراد داوطلب در پاسخ به تابش تعیین شد.



شکل ۱. دستگاه کبالت و فانوم معادل بافت که برای تابش دادن سلول‌ها استفاده شد

از آن جا که رده‌های مختلف سلولی لئوسیت‌ها حساسیت پرتوی متفاوتی از خود نشان می‌دهند (شکل ۲)، بنابراین لئوسیت‌های T برای این آزمایش انتخاب شدند (۴).

به این منظور، از ۱۶ داوطلب سالم با سن بین ۱۸-۳۵ سال سن که اعتیاد به سیگار و الکل و سابقه‌ی تابش درمانی نداشتند، ۱۰ ml خون در ظرف‌های

پارامتری توسط دستگاه فلوسایتومتر با دو لیزر ۵۳۰ nm و ۶۴۰ nm، آپوپتوز ایجاد شده با تابش اندازه‌گیری شد. تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار Cell-quest انجام شد. پراکندگی نوری در جلو FSC (Forward scatter) و جنبی SSC (Side scatter) و همین‌طور فلورسانس PI و FITC برای سلول‌ها اندازه‌گیری شد. لئوسیت‌ها گیت شدند تا درصد آپوپتوز اندازه‌گیری شود. پراکندگی نوری در جلو در دو طول موج متفاوت ۵۳۰ nm سبز و ۶۴۰ nm قرمز برای هر سلول اندازه‌گیری شد. FSC پراکندگی در جلو با اندازه‌ی سلول متناسب است؛ در حالی که پراکندگی جنبی SSC متناسب با گرانولیت‌های سلولی (ساختار سلولی) است. با استفاده از این دو پارامتر، امکان گیت کردن لکوسیت‌های مختلف و گیت کردن لئوسیت‌ها وجود دارد.

FITC جفت شده با Annexin-v فلورسانس سبز ایجاد می‌کند که برای اندازه‌گیری آپوپتوز استفاده می‌شود. رنگ PI (پروپیدیم یدید) با فلورسانس قرمز برای اندازه‌گیری سلول‌های نکروزه و جدا کردن آن‌ها از سلول‌های آپوپتوز استفاده می‌شود. اطلاعات هر نمونه بلافاصله بعد از آماده شدن نمونه به دست آمده است. پارامترهای اندازه‌گیری شده، امکان جداسازی چهار جامعه‌ی لکوسیت‌ها را می‌دهد. با استفاده از نمودار پراکندگی رو به جلو FSC بر حسب پراکندگی کناری SSC، سه زیر جمعیت لکوسیت‌ها (مونوسیت‌ها، گرانولوسیت‌ها و لئوسیت‌ها) به خوبی از خرده‌های سلولی و همین‌طور لئوسیت‌ها جدا می‌شوند. داده‌ها برای ۱۰۰۰۰ سلول در حدود ۳ دقیقه به دست می‌آیند. سلول‌های لئوسیت در حال آپوپتوز جمعیت مشخصی از لئوسیت‌های طبیعی را

و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک و PHA (Phytohemagglutinin) به عنوان محرک تقسیم سلولی اضافه شده بود، افزوده شد و در انکوباتور مخصوص کشت سلولی قرار گرفت. پس از ۳ روز از هر محیط کشت ۱۰ قسمت ۱ ml سلول با تراکم یک میلیون در میلی‌لیتر جدا و به ۱۰ پلیت ۶ تایی منتقل شد و هر پلیت با دزی در محدوده‌ی ۱۰-۰/۱ Gy تابش داده شد. دزیتری فیزیکی با دستگاه Farmer (Nucler Enterprise Zurich Switzzland) و فانتوم معادل بافت انجام شد تا دز خروجی دستگاه اندازه‌گیری شود. سپس هر پلیت دوباره به انکوباتور منتقل شد تا مقدار آپوپتوز ایجاد شده با تابش اندازه‌گیری شود.

فلوسایتومتری

بعد از ۳ روز نگهداری سوسپانسیون خونی در انکوباتور، سلول‌ها برداشت شد. به این منظور، سوسپانسیون به داخل یک لوله‌ی ۱۵ ml منتقل و ۵ دقیقه در ۱۵۰۰ rpm در دمای اتاق سانتریفوژ شد. پس از ریختن مایع رویی، قرص سلولی در ۲۰۰ μl مایع باقی‌مانده قرار گرفت. سپس قرص سلولی ابتدا با بافر PBS و سپس با بافر BD (BD-Bioscience) شستشو و رنگ Annexin v + FITC (BD-Bioscience) به آن اضافه و ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس رنگ اضافه با PBS شسته و رنگ PI به محیط اضافه گردید. سپس سلول‌ها با بافر BD-Bioscience رقیق و مقدار آپوپتوز آن‌ها با فلوسایتومتری اندازه‌گیری شد.

تحلیل فلوسایتومتری

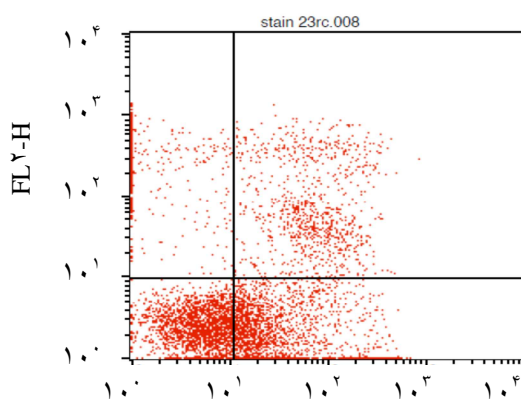
فلوسایتومتری با دستگاه بکتون دیکنسون (Becton Dickinson FACScan) با استفاده از نرم‌افزار Cell-quest انجام شد. با اندازه‌گیری چند

گیت شد و برای ناحیه‌ی گیت‌بندی شده، نمودار فراوانی سلول‌های با فلورسنت PI بر حسب Annexin-FITC در دو کانال FL¹H و FL²H برای شناسایی سلول‌های آپوپتوتیک رسم شد (شکل ۴-ب). پس از گیت کردن لنفوسیت‌ها در منحنی FSC بر حسب SSC بر روی این نمودار، چهار ناحیه مشخص شد. ناحیه‌ی FITC مثبت، PI منفی که این ناحیه مربوط به سلول‌های نکروزه است. ناحیه‌ی FITC مثبت، PI مثبت که ناحیه‌ی سلول‌هایی که تازه دچار آپوپتوز شده‌اند را نشان

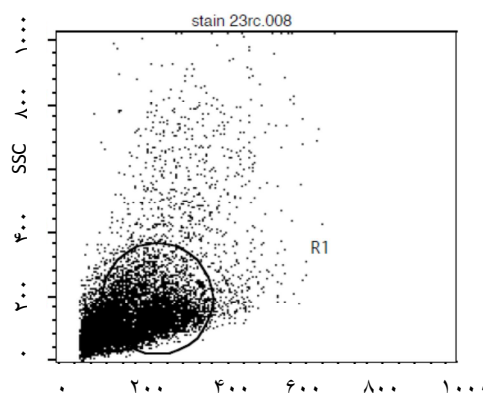
در فلوسایتومتری تشکیل می‌دهند و می‌توانند با اندازه‌ی کوچک‌ترشان یعنی FSC کوچک‌تر و گرانولیتیه‌ی بزرگ‌تر یعنی SSC بزرگ‌تر تشخیص داده شوند. این سلول‌ها رنگ Annexin-FITC را جذب می‌کنند و نور فلورسانس سبز می‌دهند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

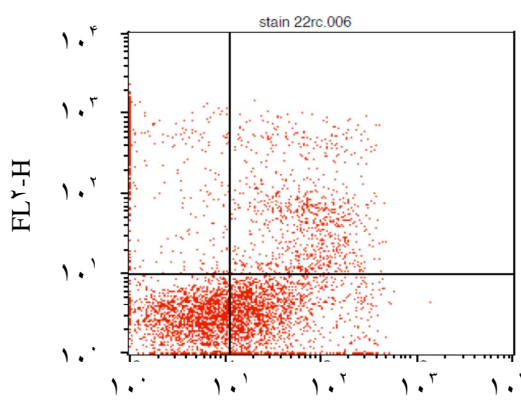
داده‌ها در دو مرحله تجزیه و تحلیل شدند. ابتدا یک نمودار دو بعدی FSC بر حسب SSC فلورسانس برای شناسایی و جداسازی لنفوسیت‌ها رسم شد (شکل ۴-ا). سپس ناحیه‌ی مربوط به لنفوسیت‌ها



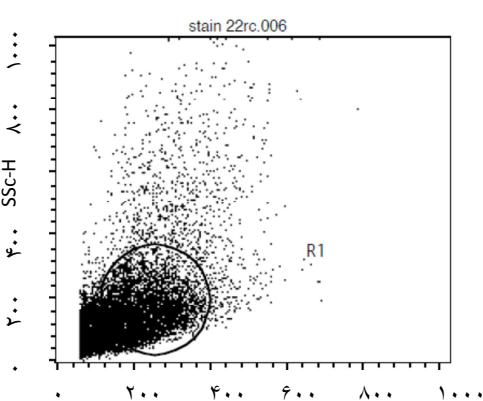
شکل ۴-ا



شکل ۴-ب

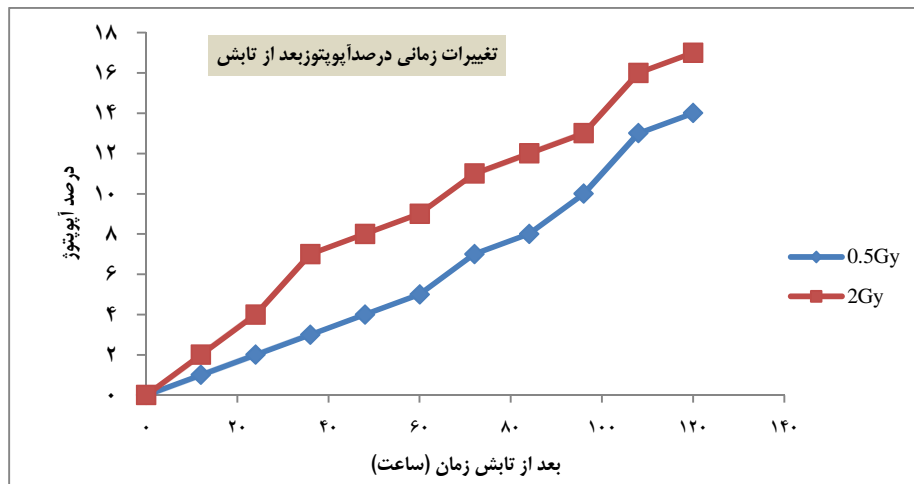


شکل ۴-ج



شکل ۴-د

شکل ۴. آنالیز فلوسایتومتری لنفوسیت‌های Annexin V + FITC T مثبت نمودار پراکندگی رو به جلو (Forward scatter) FSC (FL¹-H) اندازه‌ی سلول بر حسب پراکندگی جنبی (Side scatter) SSC (FL²-H) گرانولاریته‌ی نمودار نقطه‌ای همه‌ی ذرات حاضر در محیط کشت را نشان می‌دهد. ناحیه‌ی گیت شده‌ی سلول‌های مورد نظر یعنی لنفوسیت‌ها را نشان می‌دهد. کانال FL¹H مربوط به FITC (Fluorescein isothiocyanate) مثبت و کانال FL²H مربوط به PI مثبت است.



شکل ۵. تغییرات در فراوانی آپوپتوز با افزایش زمان بعد از تابش در دو گروه با دز تابش ۰/۵ Gy و ۲

یک دز ۲ Gy در فاصله‌ی زمانی ۵ روز با یک آنالیز هر ۲۴ ساعت طراحی شد. در بررسی آپوپتوز در جمعیت لنفوسیت‌های T، در انکوباسیون‌های بیش از ۳ روز، افزایش واضحی در فرکانس آپوپتوز با افزایش زمان انکوباسیون دیده می‌شود (شکل ۵). از این رو به نظر می‌رسد که با استفاده از زمان انکوباسیون طولانی‌تر، این روش را می‌توان برای بررسی اثر دزهای پایین استفاده کرد. اما با افزایش زمان، افزایش خطا در اندازه‌گیری‌ها نیز باید در نظر گرفته شود.

با توجه به افزایش نرخ آپوپتوز بعد از تابش و زیاد شدن خطا در فواصل بیش از ۵ روز که باعث نزدیک شدن نتایج در دزهای متفاوت به یکدیگر می‌شود، تنها از نتایج روز سوم برای اندازه‌گیری دزیمری استفاده شد (شکل ۶). مقدار میانگین‌ها و انحراف معیار برای هر دز برای تمام نمونه آن حساب شد. نتایج در جدول ۱ آمده است. کسر سلول‌های آپوپتوتیک در نمونه‌های پرتو ندیده، و آپوپتوز فوری بلافاصله بعد از تابش نیز برای تعیین دقیق آپوپتوز ایجاد شده با تابش اندازه‌گیری شد و برای به دست آوردن یک منحنی کالیبراسیون یک تابع خطی به

می‌دهد و مورد نظر می‌باشد (شکل ۴-D). ناحیه‌ی FITC منفی، PI منفی که سلول‌های سالم را نشان می‌دهد و ناحیه‌ی FITC منفی، PI مثبت که سلول‌های لیز شده را نشان می‌دهد. پردازش اطلاعات و محاسبات آماری، با نرم‌افزار Excel انجام شد.

یافته‌ها

نمونه‌ها با دز گامای ۰/۰۵ Gy، ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۸، ۶ و ۱۰ تابش داده شدند. آپوپتوز ایجاد شده با تابش در لنفوسیت‌های T بعد از تابش دادن اندازه‌گیری شد. حتی برای ۵۰ mGy، آپوپتوز ایجاد شده با تابش به حد کافی بزرگ‌تر از مقدار آپوپتوز زمینه در سلول‌های تابش ندیده در گروه شاهد بود و در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/050$).

برای مشخص کردن نکروزه شدن سلول‌ها، از رنگ‌آمیزی PI و برای نشان دادن انتقال فسفوتیدیل سرین به لایه‌ی بیرونی غشای سلول و آپوپتوز، از کیت تجاری Annexin-FITC استفاده شد و سلول‌های آپوپتوتیک برای تأیید آپوپتوز با میکروسکوپ الکترونی نیز مشاهده شدند. بنابراین، یک آزمایش با

میکروسکوپ معمولی نشان داد که سلول‌ها کامل و دارای هسته‌ی متراکم در مرکز هستند و سیتوپلاسم دارای اجسام مختلفی است؛ اما میتوکندری‌ها ناپدید شده‌اند. تمام این اطلاعات تأیید کرد که سلول‌ها از طریق آپوتوز مرده‌اند و نکروزه نشده‌اند.

این آزمون تشخیص دزهایی به کوچکی ۵۰ mGy را در ۴ تا ۵ روز بعد از تابش نمونه‌ها که تفاوت‌ها در بین نمونه‌ها به حداقل رسیده است، ممکن می‌سازد.

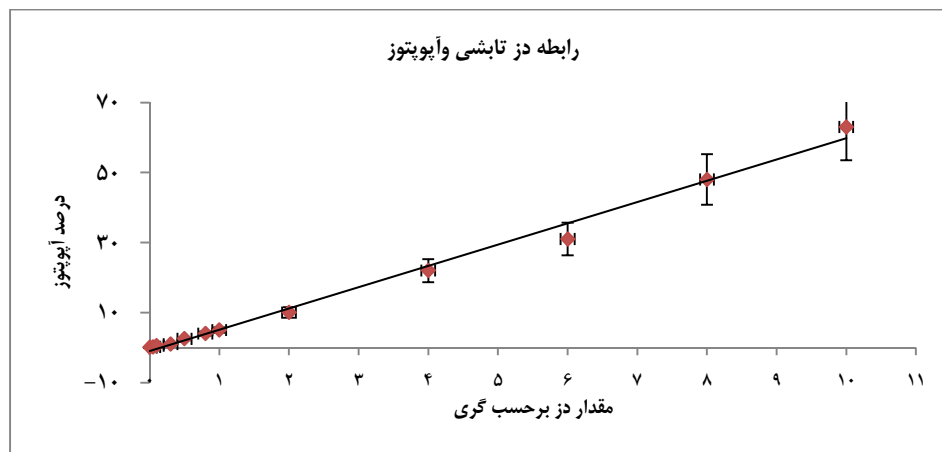
بحث

منحنی تغییرات مقادیر آپوتیک برای دزهای انتخاب شده برای همه‌ی نمونه‌های انتخاب شده، تفاوت معنی‌داری داشت و در سطح اطمینان ۹۵ درصد تفاوت معنی‌داری را نشان داد ($P < 0/05$).

صورت $y = mx + b$ بر روی داده‌ها فیت شد. m برابر ۶/۱ و b برابر ۰/۰۱ به دست آمد. ضریب همبستگی نیز برابر ۰/۹۹ بود. در ۲ Gy شیب خط دز بر حسب درصد آپوتوز برای لئوسیت ۶/۱ درصد بود. برای پردازش داده‌ها و محاسبات آماری از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

در دزهای زیر ۱ Gy سطح آپوتوز ایجاد شده تا ۵ روز بعد از تابش افزایش یافت. زمان بهینه برای مشاهده‌ی آپوتوز و تشخیص آن ۴ روز بعد از تابش بود که در آن منحنی پاسخ دز در ۲ Gy خطی با شیب $6 \pm 0/5$ درصد بود.

بر خلاف سلول‌های طبیعی، سلول‌های آپوتوتیک رنگ‌های زیستایی مانند تریپان بلو را قبول می‌کنند و مشخص می‌شود که این سلول‌ها مرده هستند و غشای آن‌ها گذردهی دارد (۴). آزمایش‌هایی با



شکل ۶: نمودار پاسخ لئوسیت‌های T به دز تابش ۳ روز بعد از تابش

جدول ۱. مقادیر دز اعمال شده به سلول‌ها و مقادیر آپوتوز مربوط

دز بر حسب Gy	۰	۰/۰۵	۰/۱	۰/۳	۰/۵	۰/۸	۱	۲	۴	۶	۸	۱۰
میانگین	۰/۰۶	۰/۲۹	۰/۶۱	۲/۳۳	۳/۵۷	۴/۲۸	۶/۴۷	۱۳/۰۰	۲۵/۴۰	۳۶/۵۳	۵۱/۲۷	۶۵/۲۷
انحراف معیار	۰/۰۳	۰/۰۸	۰/۰۹	۰/۷۰	۰/۵۴	۰/۵۴	۰/۷۲	۱/۶۳	۲/۰۹	۳/۴۶	۱/۵۸	۱/۶۵
حداقل	۰/۰۲	۰/۲۰	۰/۵۰	۱/۰۰	۲/۵۰	۴/۰۰	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۲۲/۰۰	۳۱/۰۰	۴۸/۰۰	۶۳/۰۰
حداکثر	۰/۱۰	۰/۴۰	۰/۷۰	۴/۰۰	۴/۰۰	۵/۵۰	۸/۰۰	۱۶/۰۰	۳۰/۰۰	۴۲/۰۰	۵۳/۰۰	۶۸/۰۰

پرتوی، بر اساس وسعت مراقبت‌های پزشکی و بهداشتی که باید به مصدوم داده شود، باید تصمیم‌گیری شود. در محل یک حادثه، دزیمتری فیزیکی همیشه امکان‌پذیر نیست و اگر هم این امکان وجود داشته باشد، دزیمتری بیولوژیک برای تأیید مقادیر دز دریافت شده لازم است.

در آزمایش‌های *In vitro* فرم سلولی و حالت کروماتین متراکم سلول‌های آپوتوتیک حداقل تا ۱۰ روز باقی می‌ماند، اما شواهد میکروسکوپی وجود دارد که این سلول‌ها با ماکروفاژها فاگوسیتوز می‌شوند؛ اما این که آیا در بدن نیز همین اتفاق می‌افتد، تحقیق نشده است.

با توجه به این که این آزمایش‌ها به صورت *In vitro* انجام می‌شود، این سؤال به وجود می‌آید که «آیا در یک سناریوی واقعی که تابش به صورت *In vivo* است، نتایج متفاوت نخواهد بود؟». پاسخ به این سؤال پس از روشن شدن مجهولات زیادی مثل رابطه‌ی زمانی کاهش غلظت لنفوسیت‌های آپوتوتیک در خون به دلیل حذف یا تولد دوباره‌ی آن‌ها و حذف سلول‌ها توسط سیستم آندوتلیال در بدن روشن می‌شود. این وقایع در طی هفته‌ها، ماه‌ها و یا حتی سال‌ها اتفاق می‌افتد و در هر روش دزیمتری که در آن از لنفوسیت‌های خون محیطی استفاده می‌شود، مانند اندازه‌گیری و شمارش ابراهی‌های پایدار کروموزومی و ایجاد ریز هسته‌ها نیز این مسایل وجود دارد و باید در نظر گرفته شود. بنابراین، بدیهی است که اگر بین حالت *In vitro* و *In vivo* تفاوتی وجود داشته باشد و لنفوسیت‌های آپوتوتیک در بدن با گذشت زمان ناپدید شوند، ضروری است که گرفتن نمونه‌ی خون برای دزیمتری در اولین فرصت بعد از

منحنی‌های پاسخ دز بر حسب آپوتوز اندازه‌گیری شده در دزهای بالاتر از ۰/۵ Gy تابع خطی از دز بود. در فواصل زمانی طولانی به دلیل تغییرات کیفی در آماده‌سازی خون، جداسازی سلول‌های آپوتوتیک از سلول‌های طبیعی در حین آزمایش بسیار مشکل است؛ اما اگر یک زمان انکوباسیون در محدوده‌ی ۵ روز انتخاب شود، آپوتوز سلولی ایجاد شده در بیشترین سطح است. دزهای تابش ۵۰ mGy و بالاتر را می‌توان با دقت کافی اندازه‌گیری کرد. هنگامی که

دز ۴ یا ۵ روز بعد از تابش اندازه‌گیری شود، میانگین پاسخ دز $0/5 \pm 6$ درصد در ۲ Gy است. این مقادیر، شبیه به حساسیت روش‌های دیگر مثل شمارش ابراهی‌های کروموزومی است (۱۶).

فراوانی آپوتوز با افزایش زمان انکوباسیون افزایش می‌یابد. این وابستگی زمانی ممکن است تفاوت‌ها در سن و ساختار ژنتیکی را منعکس کند (۱۶-۱۵).

دلیل افزایش آپوتوز لحظه‌ای با زمان بعد از تابش، ممکن است پیر شدن سلول‌ها، افزایش طول عمر طبیعی و مرگ لنفوسیت‌ها باشد؛ اما فراوانی آپوتوز شاید بر اثر شرایط متفاوت محیط کشت مصنوعی با شرایط واقعی باشد. وابستگی آپوتوز به دز تابش در سطوح بالا خطی است و از تغییرات حساسیت در بین اهدا کنندگان تأثیر نمی‌پذیرد (۴).

محدوده‌ی دز ۵۰-۵۰۰ mGy، از حدود دز در حفاظت پرتوی بسیار بالاتر و از محدوده‌ی دزهای مربوط به آثار کلینیکی حاد که نیاز به مراقبت کلینیکی دارند، پایین‌تر است. این حدود برای اندازه‌گیری دز در حوادث پرتوی مهم است. در وضعیت حوادث

برای اندازه‌گیری آپوتوز به عنوان دزیتری نام برد. اما از جانب دیگر، اندازه‌گیری آپوتوز برای تعداد زیاد نمونه مثل حالتی که در حوادث پرتوی پیش می‌آید، با این روش سریع و آسان است. به هر حال، نتایج به پروتکل‌ها بستگی دارد و تنها با تعریف یک روش استاندارد برای انجام عملیات، می‌توان از کوچک بودن واریانس و تکرار پذیری نتایج مطمئن بود. به طور کلی، به نظر می‌رسد در حوادث پرتوی بتوان بلافاصله بعد از آن، از اندازه‌گیری آپوتوز برای دزیتری بیولوژیک قربانیان استفاده کرد. اما برای اندازه‌گیری‌های دقیق با فاصله‌ی زمانی بعد از حادثه، می‌توان از روش‌های استاندارد مانند شمارش دی‌ستریک‌ها در گسترش کروموزومی استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از همکاری خوب ریاست و کارکنان سازمان انتقال خون ایران، مرکز اصفهان و بخش پرتو درمانی بیمارستان سیدالشهدای (ع) اصفهان و آزمایشگاه مرکزی دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تقدیر و تشکر می‌گردد.

پرتوگیری با تابش انجام شود. برای رسیدن به پاسخ دقیق این سؤالات، می‌توان از دزیتری بیولوژیک بیماران هنگام رادیوتراپی و بعد از آن استفاده کرد؛ اما در رادیوتراپی‌های متداول نیز ممکن است مسأله‌ی حجمی از بدن که پرتو گرفته و تأثیر آن بر نتیجه به وجود آید؛ زیرا سلول‌های پرتو دیده و پرتو ندیده در خون حرکت می‌کنند و در بدن مخلوط می‌شوند.

با مطالعه‌ی بیمارانی که پیوند مغز استخوان می‌شوند و تابش تمام بدن را دریافت می‌کنند و یا بیمارانی با Computed tomography بررسی می‌شوند و دزهای حدود 0.1 Gy را در حجم‌های بزرگ بدن می‌گیرند، می‌توان این مسأله را دقیق‌تر بررسی کرد (۱۴-۱۲).

با وجود تفاوت ۵ برابری بین محتویات DNA سلول‌های طبیعی و لنفوسیت‌های آپوتوتیک، آن‌ها بین ۱ تا ۱۰ روز پایدار می‌مانند. اما تحقیقات نشان داده است که مقدار آپوتوز اندازه‌گیری شده، بعد از تابش به زمان بستگی دارد و زمان بهینه برای برآورد آپوتوز بین ۴ تا ۵ روز بعد از تابش است. این وابستگی به زمان را می‌توان مهم‌ترین نقطه‌ی ضعف

References

1. Bille J, Scharfenberg H, Männer R. Biological dosimetry by chromosome aberration scoring with parallel image processing with the Heidelberg polyp polyprocessor system. *Comput Biol Med* 1983; 13(1): 49-59.
2. Lindholm C, Wojcik A, Jaworska A. Biological dosimetry following exposure to neutrons in a criticality accident [Online] 2010 Dec 31. [cited 2011 Jan]; Available from: URL: <http://www.risoe.dtu.dk/rispubl/NKS/NKS-233.pdf>
3. Coskun M, Top A, Orta T. Biological dosimetry following X-ray Irradiation. *Turk J Med Sci*. 2000; 30: 563-9.
4. Montoro A, Rodriguez P, Almonacid M, Villaescusa JI, Verdu G, Caballin MR, et al. Biological dosimetry in a group of radiologists by the analysis of dicentrics and translocations. *Radiat Res* 2005; 164(5): 612-7.
5. Cucinotta FA, Kim MHY, Willingham V, George KA. Physical and biological organ dosimetry analysis for international space station astronauts. *Radiation Research* 2008; 170(1): 127-138.
6. Montoro A, Almonacid M, Barquinero J, Barrios L, Verdú G, Pérez J, et al. Biological dosimetry in interentional radiology exposed to ionizing radiations. *Proceedings of the 11th ed International Congress of the International Radiation Protection Association*; 2004 May 23-28; Madrid, Spain.
7. Dolphin G. Biological dosimetry with particular reference to chromosome aberration analysis. A

- review of methods. In: Handling of radiation accidents. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency; 1969.
8. Menz R, Andres R, Larsson B, Ozsahin M, Trott K, Crompton NE. Biological dosimetry: the potential use of radiation-induced apoptosis in human T-lymphocytes. *Radiat Environ Biophys* 1997; 36(3): 175-81.
 9. Andreassi MG. The biological effects of diagnostic cardiac imaging on chronically exposed physicians: the importance of being non-ionizing. *Cardiovasc Ultrasound* 2004; 2: 25.
 10. Zwicker F, Swartman B, Sterzing F, Major G, Weber KJ, Huber PE, et al. Biological in-vivo measurement of dose distribution in patients' lymphocytes by gamma-H2AX immunofluorescence staining: 3D conformal-vs. step-and-shoot IMRT of the prostate gland. *Radiat Oncol* 2011; 6: 62.
 11. Jani AB, Hand CM, Pelizzari CA, Roeske JC, Krauz L, Vijayakumar S. Biological-effective versus conventional dose volume histograms correlated with late genitourinary and gastrointestinal toxicity after external beam radiotherapy for prostate cancer: a matched pair analysis. *BMC Cancer* 2003; 3: 16.
 12. Chaudhry MA. Biomarkers for human radiation exposure. *J Biomed Sci* 2008; 15(5): 557-63.
 13. Zhang HM, Nie JS, Li X, Niu Q. Characteristic analysis of peripheral blood mononuclear cell apoptosis in coke oven workers. *J Occup Health* 2012; 54(1): 44-50.
 14. Huber R, Braselmann H, Geinitz H, Jaehnert I, Baumgartner A, Thamm R, et al. Chromosomal radiosensitivity and acute radiation side effects after radiotherapy in tumour patients--a follow-up study. *Radiat Oncol* 2011; 6: 32.
 15. Sreedevi B, Rao BS, Nagaraj H, Pal NK. Chromosome aberration analysis in radiotherapy patients and simulated partial body exposures: biological dosimetry for non-uniform exposures. *Radiat Prot Dosimetry* 2001; 94(4): 317-22.
 16. International Atomic Energy Agency. Cytogenetic Analysis for Radiation Dose Assessment. technical report series No. 405. Vienna, Austria: International Atomic Energy Agency; 2001.
 17. Darroudi F. Cytogenetic biological dosimetry past, present and future perspectives. Proceedings of the 6th ed International Conference on Environment Matation in Human Population; 2012 Mar 26-29; Doha, Qatar.
 18. Vershenya S, Biko J, Lorenz R, Reiners C, Stopper H, Grawe J, et al. T-cell receptor assay and reticulocyte-micronuclei assay as biological dosimeters for ionizing radiation in humans. *Acta Medica Nagasakiensia* 2005; 50(Suppl 1): 15-21.
 19. Sun LP, Li DZ, Liu ZM, Yang LJ, Liu JY, Cao J. Analysis of micronuclei in the transferrin-receptor positive reticulocytes from peripheral blood of nasopharyngeal cancer patients undergoing radiotherapy by a single-laser flow cytometer. *J Radiat Res* 2005; 46(1): 25-35.
 20. Avlasevich S, Bryce S, De BM, Elhajouji A, Van GF, Lynch A, et al. Flow cytometric analysis of micronuclei in mammalian cell cultures: past, present and future. *Mutagenesis* 2011; 26(1): 147-52.
 21. Smolewski P, Ruan Q, Vellon L, Darzynkiewicz Z. Micronuclei assay by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2001; 45(1): 19-26.
 22. Ishihara S, Inuma H, Fukushima Y, Akahane T, Horiuchi A, Shimada R, et al. Radiation-induced apoptosis of peripheral blood lymphocytes is correlated with histological regression of rectal cancer in response to preoperative chemoradiotherapy. *Ann Surg Oncol* 2012; 19(4): 1192-8.
 23. Pinar B, Henriquez-Hernandez LA, Lara PC, Bordon E, Rodriguez-Gallego C, Lloret M, et al. Radiation induced apoptosis and initial DNA damage are inversely related in locally advanced breast cancer patients. *Radiat Oncol* 2010; 5: 85.
 24. Prieto A, Diaz D, Barcenilla H, Garcia-Suarez J, Reyes E, Monserrat J, et al. Apoptotic rate: a new indicator for the quantification of the incidence of apoptosis in cell cultures. *Cytometry* 2002; 48(4): 185-93.
 25. Bordon E, Henriquez-Hernandez LA, Lara PC, Ruiz A, Pinar B, Rodriguez-Gallego C, et al. Prediction of clinical toxicity in locally advanced head and neck cancer patients by radio-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes (PBLs). *Radiat Oncol* 2010; 5: 4.
 26. Hodge S, Hodge G, Holmes M, Reynolds PN. Increased peripheral blood T-cell apoptosis and decreased Bcl-2 in chronic obstructive pulmonary disease. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(2): 160-6.
 27. Hooker DJ, Mobarok M, Anderson JL, Rajasuriar R, Gray LR, Ellett AM, et al. A new way of measuring apoptosis by absolute quantitation of inter-nucleosomally fragmented genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 2012; 40(15): e113.
 28. Schnarr K, Boreham D, Sathya J, Julian J, Dayes IS. Radiation-induced lymphocyte apoptosis to predict radiation therapy late toxicity in prostate cancer patients. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009; 74(5): 1424-30.
 29. Zhang G, Gurtu V, Kain SR, Yan G. Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. *Biotechniques* 1997; 23(3): 525-31.

Evaluation of Measuring Radiation-Induced Apoptosis in Human T-Lymphocytes by Flow Cytometry as a Biological Dosimetry System

Mohammad Bagher Tavakkoli PhD¹, Majid Kheirollahi PhD², Ali Kiani MSc³,
Mohammad Kazemi MSc⁴, Leili Mohebat MSc⁵,
Shagayegh Haghjooy-Javanmard MD, PhD⁶, Mahnaz Roayaei MD⁷

Original Article

Abstract

Background: In events such as a nuclear explosion or leakage of radioactive material from nuclear power dungeons or other events in nuclear medicine departments in hospitals, many people accidentally receive an unspecified amount of ionizing radiation. First step to treat is evaluation of radiation dose received by the victims. In such situation and in radiotherapy program, dosimetry is used for evaluation of treatment planning. Some measurable biological indexes used for evaluation of dose of radiation. Some measurable biological indexes can be used in biological dosimetry to measure the radiation dose and estimate the radiation effect.

Methods: In this study, the test for biological dosimetry based on apoptosis induced by gamma radiation in peripheral blood T-lymphocytes was performed in 16 volunteers. The blood lymphocytes were isolated and cultured in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 medium and then, were placed in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Then, the samples were prepared from the culture medium and radiated with different doses of gamma radiation. Sample transferred to incubator again to measure their apoptosis. Radiation-induced apoptosis in the cell population was measured by flow cytometry using Annexin V + fluorescein isothiocyanate (FITC) and propidium iodide (PI) stains.

Findings: Radiation induced apoptosis was measureable with enough precision. But measured apoptosis depended on delay time after irradiation and protocole of flow cytometry.

Conclusion: The results of this study show that it is possible to use radiation for measuring apoptosis as a biological dosimeter in a short time after radiation exposure in the events such as a nuclear explosion or leakage of radioactive material.

Keywords: Apoptosis, Flowcytometry, T-cells, Lymphocyte, Biological dosimetry, Radiation

Citation: Tavakkoli MB, Kheirollahi M, Kiani A, Kazemi M, Mohebat L, Haghjoo Javanmard Sh, et al. **Evaluation of Measuring Radiation-Induced Apoptosis in Human T-Lymphocytes by Flow Cytometry as a Biological Dosimetry System.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(284): 610-20

1- Professor, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan Iran

2- Assistant Professor, Pediatric Inherited Diseases Research Center AND Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD Student, Department of Medical Physics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences AND Lecturer, Department of Physics, School of Sciences, Malek-Ashtar University of Technology, Isfahan, Iran

4- PhD Student, Department of Genetics, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

5- Central Research Lab, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

6- Associate Professor, Physiology Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

7- Assistant Professor, Department of Oncology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Ali Kiani MSc, Email: kiani2231@gmail.com