مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1390، دوره سوم، شماره نهم، صفحه 6-1

بررسی اثر دزهای مختلف اشعه گاما بر سترون سازی سرم جنین گاو

احمد عرفان منش[1]، هادی غلام پور[1]، ثریا غریبی[1]

1. جهاد دانشگاهی واحد تهران

نویسنده مسؤول: ثریا غریبی، جهاد دانشگاهی واحد تهران. ghariby_vet@yahoo.com

دریافت: 90/4/1 پذیرش: 90/6/30

چکیده

زمینه و هدف: سرم جنین گاو یکی از پرمصرف‌ترین مکمل‌ها در کشت سلولی به منظور تحریک تکثیر سلول‌ها و محصولات زیستی می‌باشد. از آنجایی که احتمال آلودگی سرم حیوانات مثل سرم جنین گاو با عوامل ویروسی، باکتریایی، قارچی و ایمونوگلوبولین‌ها وجود دارد، استفاده از یک روش مناسب برای سترون نمودن این مواد ضروری می باشد. در چند سال اخیر به استفاده از اشعه گاما به عنوان یکی از روش‌های سترون سازی دارو و مواد بیولوژیک توجه زیادی شده است. در مطالعه حاضر تاثیر دزهای مختلف اشعه گاما را در سترون سازی سرم جنین گاو و مقایسه آن با روش فیلتراسیون مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی: بدین منظور ابتدا نمونه‌های سرم خام جنین گاو در سه سری تهیه شد. هر سری به هشت تیمار مختلف تقسیم گردید که شامل گروه‌های زیر بود: سرم خام، سرم فیلترشده و دریافت کنندگان 5، 10، 15، 20، 25 و 35 کیلوگری اشعه گاما (با نرخ دز 5/6 گری در ثانیه). پس از تابش اشعه، نمونه های مختلف در هر سری از نظر سترون بودن بررسی شدند و نتایج در تیمارهای مختلف مورد مقایسه قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج بدست آمده نشان داد که در تیمارهای دریافت کننده دز 10 کیلوگری و بالاتر هیچ نوع آلودگی باکتریایی، قارچی، مایکوپلاسمایی و ویروسی قابل رشد در شرایط آزمایش، باقی نماند. در حالی که روش فیلتراسیون توانایی حذف کامل آلودگی های ویروسی را نداشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج بدست آمده در این آزمایش، می‌توان از اشعه گاما به عنوان روشی مطمئن در سترون کردن سرم جنین گاو استفاده نمود و میزان دز مورد استفاده در سترون کردن محصولات، به شرایط تهیه محصول و موارد مصرف بستگی دارد.

واژه‌های کلیدی: اشعه گاما، سرم جنین گاو، سترون سازی

www.SID.ir

مقدمه

به طور روز افزونی از تکنیک‌های in vitro در پزشکی، زیست فناوری و همچنین در سایر علوم همچون تحقیقات مربوط به سرطان، تولید واکسن، تشخیص بیماری، آزمایشگاه‌های ویروس شناسی، مراکز باروری خارج رحمی، آزمایشگاه‌های ایمونولوژی، تولید انبوه پروتئین‌های شبیه فاکتور VIII لخته کننده خون انسان و غیره استفاده می‌شود(1). امروزه کشت سلول به عنوان یک روش اساسی در فرایند مطالعات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی سلول مورد استفاده قرار می‌گیرد(2). کشت سلول با اهداف تحقیقی، تشخیصی و تولیدی انجام می‌شود. بیشتر محیط‌های کشت سلولی پایه به تنهایی قادر به پشتیبانی از رشد سلول ها نبوده و نیازمند به استفاده از ترکیبات دیگر می باشند. پس از دهه 1950، سرم حیوانات بعنوان کامل ترین ترکیب برای این منظور بکار گرفته شد. سرم جنین گاو (FBS) بهترین سرم شناخته شده جهت استفاده در کشت سلولی می‌باشد. این فراورده بیولوژیک به دلیل دارا بودن فاکتورهای رشد غنی و پایین بودن میزان گاما گلوبولین به عنوان یک مکمل استاندارد جهت استفاده در کشت سلولی پذیرفته شده است. تاکنون مواد دیگر نتوانسته اند جایگزین مناسبی برای این ماده در محیط کشت باشند (1، 3 و 4).

با توسعه علوم و گسترش دامنه تحقیقات در زمینه‌های مورد اشاره، نیاز به مواد بیولوژیک روز به روز از تنوع و حجم بالاتری برخوردار شده است(1). از آنجایی که احتمال آلوده بودن سرم حیوانات به عوامل مختلفی همچون ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و ایمونوگلوبولین‌ها وجود دارد و این مواد ممکن است رشد و ماندگاری سلول‌های کشت داده شده را تحت تاثیر قرار دهند (3). به کار گرفتن روش‌هایی برای غیر فعال کردن یا حذف این عوامل در محصولات مشتق شده ازخون بسیار حائز اهمیت می‌باشد (5). در دهه‌های اخیر اشعه گاما به عنوان روشی کارآمد به منظور سترون سازی به کار گرفته شده است(6). باتوجه به جایگاه سرم جنین گاو در مطالعات بیولوژیکی و احتمال آلودگی سرم‌های تولید شده در کشور به انواع میکروارگانیسم‌ها، سترون سازی آنها ضروری می‌باشد و از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای کاربردی پیرامون روش‌های سترون سازی سرم جنین گاو در کشور انجام نشده است، هدف از این مطالعه بررسی اثر اشعه گاما در سترون سازی سرم جنین گاو در دزهای مختلف بوده است.

روش بررسی

تهیه سرم جنین گاو و تقسیم بندی نمونه ها: سرم خام از مرکز مواد بیولوژیک دامی جهاد دانشگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران تهیه شد و نمونه‌ی هر سری تحت نام‌های سری K، L و M نام گذاری گردید. هر سری به 8 گروه شامل گروه شاهد که اشعه دریافت نمی‌کرد، گروه فیلتراسیون که با استفاده از فیلترهای سر سرنگی 0/22سترون شدند و شش گروه که اشعه گاما با دزهای ۵،۱۰، 15، 20، 25، 35 کیلوگری را دریافت کردند، تقسیم شد. پرتودهی به نمونه ها درپژوهشکده کاربرد پرتوها وابسته به سازمان انرژی اتمی کشور انجام شد. دستگاهی که به این منظور استفاده شد GC-220(ساخت شرکت Nordion، کشور Canada) با نرخ دز (dose rate) 5.6 gray/s بود. به منظور ایجاد شرایط مشابه نگهداری نمونه‌ها تا زمان انجام آزمایشات مختلف در فریزر در دمای 20- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. نمونه های مورد آزمایش در طول مدت تابش در دمای محیط قرار داشتند.

بررسی حضور باکتری و قارچ: 100 میکرولیتر از نمونه سرم گروه‌های مختلف در شرایط سترون، به محیط‌های کشت ژلوز خوندار، تایوگلیکولات، سرم دکستروز آگار به منظور بررسی حضور باکتری‌ها و سابورو دکستروز آگار جهت بررسی حضور قارچ‌ها منتقل شدند و در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم خانه گذاری(انکوباسیون) شدند، پس از 3و 7 روز نتایج کشت، بررسی شد(7).

بررسی حضور مایکوپلاسما: برای بررسی حضور مایکوپلاسما در نمونه ها ابتدا یک سی سی از نمونه‌ها را بر روی 9 سی سی PPLO Broth برده، در دمای 37 درجه سانتی گراد برای 3-2 روز گرم‌خانه گذاری شد. در صورت عدم ایجاد کدورت آزمایش تکرار و در صورت ایجاد کدورت و تغییر رنگ، از آن بر روی PPLO Agar کشت داده و در روزهای 3، 7و 14 بررسی شد. با ظهور پرگنه‌های تخم مرغی وجود مایکوپلاسما تشخیص و با کمک رنگ آمیزی آزور این تشخیص تایید گردید(7).

سنجش اندوتوکسین: بدین منظور از کیت سنجش اندوتوکسین(Limulus Amebocyte Lysate) با حساسیت 0/06 Eu/ml ساخت شرکت Lonza کشور سوئیس استفاده

Archive of SID
www.SID.ir

شد. به منظور ارزیابی وضعیت حضور اندوتوکسین در نمونه‌های مختلف رقت‌های 1/8 ، 1/16و1/32 از هر یک از نمونه‌ها تهیه شد تا ضمن جلوگیری از تداخل اثر پروتئین‌های سرمی در آزمایش، سنجش اندوتوکسین با دقت مورد نظر انجام گردد.

ارزیابی ویروسی: برای بررسی حضور ویروس از روش پاساژ پیاپی سلول‌ها استفاده شد(8). بدین منظور نمونه‌ها به روی کشت 24 ساعته سلول‌های رده BK تهیه شده از بانک سلولی انسیتو پاستور ایران با شماره C541 منتقل شدند و بررسی محیط کشت تا پنج روز و مقایسه آن با نمونه‌های مثبت و منفی انجام شد و تغییرات سلولها مورد ارزیابی قرار گرفت. به منظور بررسی اثر اشعه گاما بر روی حذف ویروس-MDA MB، نمونه‌هایی از سرم به صورت تجربی با این ویروس آلوده شدند، بدین منظور از log3 ویروس، 10% به هر نمونه اضافه گردید و تابش مجدد گاما انجام گرفت.

یافته‌ها

نتایج کشت باکتریایی و قارچی تیمارهای مختلف پس از 3و 7 روز گرمخانه گذاری نشان داد که در نمونه‌های سرم خام، پرگنه‌های متعدد باکتریایی و قارچی پس از 3و 7 روز انکوباسیون در هر 3 سری مشاهده گردید. در روش فیلتراسیون در هیچ یک از گروه‌ها در روزهای 3و 7، آلودگی قارچی و باکتریایی مشاهده نشد. در دز 5 کیلوگری در محیط سرم دکستروز آگار در سری L پس از 3 و 7روز دو پرگنه زرد رنگ مشاهده گردید. در همین دز در محیط ژلوز خون، در سری L پس از 7 روز یک پرگنه زرد رنگ مشاهده گردید. در محیط PPLO در دز 5 کیلوگری در سریL پس از 3 روز یک پرگنه نیمرویی و پس از 7 روز دو پرگنه نیمرویی مشاهده گردید. نتایج به دست آمده حاکی از حضور اندوتوکسین در نمونه‌ها در سطح حداقل 0/06 Eu/ml بود و تیمارهای مختلف اشعه گاما و فیلتراسیون تاثیری در حذف اندوتوکسین نداشتند. در بررسی نتایج کشت ویروسی، در سرم خام در تمام سری‌ها محیط کشت سالم باقی مانده بود که نشان دهنده عدم حضور آلودگی ویروسی در نمونه‌های اولیه‌ی تمام سری‌ها بود. لذا به منظور درک بهتر اثر بخشی اشعه بر ویروس احتمالی موجود در سرم از روش آلوده کردن دستی استفاده شد.

نتایج حاصل از کشت سرم‌های سری‌های مختلف که ویروس MDA-MB موجود در آزمایشگاه ویروس شناسی دانشکده دامپزشکی را دریافت کرده و سپس تحت تاثیر دزهای مختلف اشعه گاما قرار گرفته بودند، نشان دهنده باقی ماندن ویروس در گروه فیلتر شده و حذف آن در گروه‌های دریافت کننده اشعه گاما بود.

بحث

از آنجایی که شرایط تهیه سرم جنین گاو در هر سری متفاوت می‌باشند، بنابراین میزان آلودگی اولیه نیز مختلف خواهد بود و این امر در نتایج به دست آمده مشهود است. با دریافت اشعه گاما میزان آلودگی به سرعت کاهش می یابد به نحوی که در کمترین دز این تحقیق یعنی 5 کیلوگری تعداد پرگنه های رشد یافته بر روی محیط های کشت بسیار محدود شده بود. از این نظر نتایج نزدیک به دیگر محققان می باشد به نحوی که نیمز و همکاران در مقاله مروری خود دز هفت کیلو گری را برای بر طرف کردن آلودگی باکتریایی و قارچی اعلام کرده اند(9). لیکن از آنجایی که استفاده از این فراورده مستلزم صفر بودن آلودگی آنها می‌باشد، وجود حتی یک پرگنه هم مشکل آفرین است.

در بررسی آلودگی، عدم رشد باکتری پس از 3 روز، نشان دهنده آسیب جدی به قابلیت رشد باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد. لیکن رشد پرگنه‌ها در روز هفتم، نشانه عدم توانایی دزهای 5 کیلوگری، در از بین بردن کامل عوامل باکتریایی و قارچی می‌باشد، به نحوی که با وجود آسیب به میکروارگانیسم، این عامل توانسته توانایی رشد خود را پس از چند روز بروز دهد. عدم رشد در دزهای 10 کیلوگری و بالاتر ضمن آنکه اطمینان از محیط کشت و روش آزمایش را تامین می‌نماید، نشان دهنده توانایی این دزها در حذف کامل باکتری‌ها و قارچ‌ها می‌باشد. در گروه فیلتراسیون نیز در هیچ یک از سری‌ها در کشت باکتریایی و مایکوپلاسما، هیچ پرگنه‌ای مشاهده نگردید، با این وجود استفاده از این روش در مقیاس بالای سرم جنین گاو برای سترون نمودن مقرون به صرفه نمی‌باشد.

معضل اصلی استفاده از سرم حیوانات آلودگی آنها به ویروس و مایکوپلاسما است. دز مناسب برای حذف مایکوپلاسما حداکثر

Archive of SID

www.SID.ir

15 کیلوگری می باشد(9)، که با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد. در بررسی آلودگی ویروسی، عدم وجود ویروس در گروه‌های دریافت کننده دز پایین اشعه گاما با نتایج حاصل از محققین دیگر از جهت حذف کامل ویروس در دزهای پایین مغایرت دارد(10). البته با کاهش تیتر ویروس در دزهای پایین با نتایج منتشر شده هم خوانی دارد(11). به نظر می‌رسد حذف کامل ویروس در دزهای پایین این آزمایش به دلیل تلقیح میزان کم ویروس به نمونه‌های سرم باشد. علت انتخاب این ویروس (یعنی BVD-MD) به دلیل مقاوم بودن این ویروس نسبت به سایر ویروس‌ها و احتمال بالای حضور آن در سرم جنین گاو به دلیل انتقال عمودی آن می‌باشد. میزان تلقیح Log3 ویروس، با توجه به تجارب آزمایشگاه ویروس‌شناسی روی نمونه‌های بالینی موجود در کشور انتخاب شد، در حالی که محققین دیگر میزان Log8 را در آزمایشات خود بررسی کردند(8). البته با توجه به منابع، محققین در مناسب برای سترون نمودن سرم حیوانات را 25-40 کیلو گری در نظر گرفته اند تا حذف ویروس ها کاملا انجام شود(9).

اشعه گاما با دو مکانیسم، مواد بیولوژیکی را از بین می‌برد و یا غیر فعال می‌کند. یک روش مستقیم که در نتیجه عبور انرژی امواج گاما به درون ماده بیولوژیکی است و یک روش غیر مستقیم که در نتیجه فعالیت رادیکال های آزاد ایجاد شده در ماده مورد نظر است(2). این امواج با روش مستقیم، موجب آسیب های غیر قابل برگشت نظیر تخریب DNA ارگان زنده شده و از این طریق موجب سترون شدن نمونه می‌شود(12). در حالی که در روش غیر مستقیم، مولکول‌های آب توسط امواج گاما رادیولیز شده و موجب تولید اقسام اکسیژن واکنش پذیر(Reactive oxygen species) می‌گردد که این امر منجر به ایجاد پراکسید هیدروژن (H_2O_2) در نمونه ها می‌شود. H_2O_2 یک عامل اکسید کننده قوی می‌باشد و در محیط کشت باقی می‌ماند و می‌تواند به ماکرومولکول‌های بیولوژیکی که روش مستقیم تاثیری در آنها نداشته، آسیب برساند (13). پس با در نظر گرفتن این نکته که اشعه گاما فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌های سرم جنین گاو را کاهش می‌دهد(6) و میزان این کاهش با افزایش دز اشعه گاما افزایش می‌یابد(14)، به منظور جلوگیری از تخریب هرچه بیشتر پروتئین‌ها، از دزهای بالا در صورت امکان استفاده نشود.

نتیجه گیری

نتایج بدست آمده در این طرح نشان داد که استفاده از اشعه گاما می‌تواند به عنوان یک روش مطمئن در سترون کردن سرم جنین گاو مورد استفاده قرار گیرد و دز قابل استفاده بسته به شرایط تهیه محصول و موارد مصرف متفاوت خواهد بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی معاونت پژوهش و فناوری جهاد دانشگاهی انجام شده است که بدین وسیله از مسئولین محترم این مجموعه قدردانی می گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. Erfanmanesh A, Kamareh M, Gholampour H. *Assessment of the consumption of animal biological products in Iran: Research group*. ACECR-Tehran unit. 2006; 854-10.
2. Butler MM. *Animal Cell Culture and Technology*. 2nd ed. Oxford. Bios Scientific. 2004; pp: 288-290.
3. Jochems CEA. *Use, Trade and Harvest of Livestock Sera*. Department of Laboratory Animal Science. Utrecht University.1997; 30-35.
4. Shah G. *Why do we still use serum in the production of biopharmaceuticals?* Devel Biol Standard. 1999; 99: 17–22.
5. Zbikowska HM, Nowak P, Wachowicz B. *Protein modification caused by a high dose of gamma irradiation in cryo-sterilized plasma: protective effects of ascorbate*. Free RadicBiol Med. 2006; 40(3): 536-42.
6. Grieb T, Forng RY, Brown R, Owolabi T, Maddox McBain A, Drohan WN, Mann DM, Burgess WH. *Effective use of Gamma Irradiation for Pathogen Inactivation of Monoclonal Antibody Preparations*. Biologicals. 2002; 30: 207–216.
7. Barons EJ, Finegold MF. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Hardcover.2006; pp: 81-99.
8. Daley JP, Danner DJ, Weppner DJ, Plavsic MZ. *Virus inactivation by gamma irradiation of fetal bovine serum*. Focus.1998; 20(3): 86-88.
9. Nims RW, Gauvin G, Plavsic M. *Gamma irradiation of animal sera for inactivation* of *viruses and mollicutes*. Biologicals. 2011; 39: 370-377.
10. Sofer G. *Virus Inactivation in the 1990s—and into the 21st Century*. BioPharm International Press. 2003; 50-57.
11. Plavsic MZ, Daley JP, Danner DJ, Weooner DJ. *Gamma Irradiation of Bovine sera*. Devel Biol Standard. 1999; 99: 95-109.
12. Kempner ES. *Effects of High-Energy Electrons and Gamma Rays Directly on Protein Molecules*. JPharm Sci. 2001; 90-100.
13. Mognato M, Girardi C, Fabris S, Celotti L. *DNA repair in modeled microgravity: double strand break rejoining activity in human lymphocytes irradiated with g-rays*. Mutat. Res. 2009; 663: 32-39.
14. Erfanmanesh A, Gharibi S, Salami M, Asadi F, Hosein-Zadeh A, Mohajer-far T. *The physicochemical properties of fetal bovine serum proteins can be affected by gamma-irradiation*. J.Iran.chem.Soc. 2011; 8(2): 34.

Archive of SID

www.SID.ir