جداسازی وتخلیص مجموعه آنتی ژنی ۸۵ از مایکوباکتریوم بویس (BCG) و ارزیابی پرولیفراسیون سلولی علیه آن در محیط کشت سلولی خون تام (Whole Blood)

ایرج نیکوکار Ph.D. ☆✉، محمد جواد کجباف Ph.D.★، منوچهر مکوندی Ph.D.★، احمد فرج زاده Ph.D.★
علی مصطفائی Ph.D.★، اسکندر کمالی Ph.D.★، کریس هایگن M.D.★

☆ دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گروه میکروب‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی اهواز، گروه میکروب‌شناسی

★ دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، گروه ایمونولوژی

★ دانشگاه علوم پزشکی شیراز، گروه ایمونولوژی

★ انیستیتو پاستور بروکسل، بلژیک

✉ آدرس مکاتبه: لاهیجان، صندوق پستی: ۱۳۵۱/۴۴۱۴۵، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، گروه میکروب‌شناسی

پست الکترونیک: E.mail:Nikokariraj@yahoo.com

دریافت مقاله: ۸۲/۸/۲۹، پذیرش مقاله: ۸۳/۱/۲۵

* **هدف:** جداسازی وتخلیص مجموعه آنتی ژنی ۸۵ از مایع کشت باکتری (Culture Filtrate) وبررسی پرولیفراسیون سلولی علیه آن در محیط کشت سلولی خون تام (Whole Blood -WB) افراد سالم با تست توبرکولین مثبت ومنفی

* **مواد و روشها:** مجموعه آنتی ژنی ۸۵ پس از عبور مایع حاصل از کشت میکروبی مایکوباکتریوم بویس (BCG) از ستون های کروماتوگرافی فنیل سفاروز، DEAE - سفاسل و سوپردکس ۷۵ خالص گردید. سپس جهت تائید خالص سازی وحضور آنتی ژن اختصاصی ۸۵ از الکتروفورز پروتئین بر روی ژل پلی اکریل آمید وایمونوبلاتینگ استفاده گردید.در مرحله بعد با استفاده از روش کشت سلولی خون تام پرولیفراسیون سلولی (از طریق اندازه گیری میزان جذب تیمیدین رادیواکتیو) بر روی سلولهای حاصل از ۲۵ نفر افراد سالم با تست توبرکولین مثبت و۲۵ نفر افراد سالم با تست توبرکولین منفی علیه آنتی ژن ۸۵، PPDو میتوژن محرک لنفوسیت های T (Phytohemagglutinin=PHA) مورد مطالعه قرار گرفت.

* **یافته ها:** مجموعه آنتی‌ژنی ۸۵ با وزن مولکولی ۳۲-۳۰ کیلو دالتون در الکتروفورز پروتئین بر روی ژل پلی اکریل آمید شناسائی شد. از سوی دیگر این پروتئین در ایمونوبلاتینگ یک واکنش قوی با آنتی مونوکلونال از خود نشان داد.پاسخ پرولیفراسیون سلولی به آنتی ژن ۸۵ در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت به طور معنی داری بیشتر از افراد سالم با تست توبرکولین منفی بود ($P<0.001$). همچنین۸۸ درصد (۲۲/۲۵) افراد سالم با تست توبرکولین مثبت نسبت به این آنتی ژن پاسخ داده اند.

* **نتیجه گیری:** پاسخ پرولیفراسیون سلولی به مجموعه آنتی ژن ۸۵ به طور معنی داری در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت در مقایسه به افراد سالم با تست توبرکولین منفی متفاوت بوده که این موضوع می تواند نشانگر نقش حفاظتی این آنتی ژن علیه عفونت ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس باشد.

گل واژگان: مایکو باکتریوم بویس (BCG)، مجموعه آنتی ژنی ۸۵، پرولیفراسیون سلولی

دانشریه پزشکی یاخته، سال ششم، پاییز ۸۳، شماره ۲۳، صفحات ۱۵۱-۱۴۴

مقدمه

بیماری سل توسط یک باکتری اختیاری درون سلولی به نام مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می شود که به تنهائی می تواند به عنوان یک عامل مهم در مرگ‌ومیر انسان محسوب شود و درحال حاضر به عنوان یک معضل در بهداشت جهانی مطرح است. انسیدانس بیماری در کشور های در حال توسعه همچنان بالا بوده و اخیرا در کشورهای توسعه یافته نیز به علت بروز بیماری ایدز به عنوان یک ضرورت در سطح بهداشت عمومی معرفی شده است. بر اساس آمارهای موجود تخمین زده می شود که بیش از یک سوم جمعیت جهان آلوده به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند که از بین افراد آلوده سالیانه ۸ میلیون نفر مبتلا به بیماری توبرکلوزیس شده وحدود دو میلیون آنها نیز از بین می‌روند (۱، ۲).

به علت مشکلات عدیده ای که در درمان این بیماری وجود دارد، استفاده از واکسیناسیون جهت پیشگیری همواره مورد توجه بوده است. در حال حاضر از واکسن زنده ضعیف شده مایکوباکتریوم بویس (BCG) جهت ایجاد ایمنی در بسیاری از کشورها استفاده می شود.اما میزان کارایی این واکسن در نقاط مختلف جهان ز یر سوال بوده و بین صفر درصد در جنوب هندوستان تا ۸۰ درصد در انگلستان گزارش شده است (۳، ۴) . همچنین استفاده از این واکسن در افرادی که دچار ضعف سیستم ایمنی هستند می تواند مشکلاتی را به همراه داشته باشد(۵) از این رو توجه به آنتی ژنهای مختلف مایکو باکتریو مها به

خصوص آنتی ژن‌های موجود در مایع حاصل از کشت باکتری(Culture Filtrate) به عنوان محرک سیستم ایمنی رو به افزایش است (۶، ۷) مجموعه آنتی ژنی ۸۵ که یکی از ا جزاء اصلی ترشحی مایکو باکتریوم ها محسوب می شود به عنوان یک میکولیل ترانسفراز[1] در بیوسنتزتر هالوز دی میکولات[2] (کورد فاکتور) نقش مهمی داشته (۸) و اثرات ایمنی زایی این آنتی ژن به طور وسیع در مدلهای حیوانی مورد بررسی قرار گرفته است. مطالعات نشان می دهد که آنتی ژن ۸۵ می تواند به عنوان محرک مناسبی برای لنفوسیت های (Th1) وترشح سایتو کاین های از قبیل انتر فرون گاما باشد. از این رو آنتی ژن مذکور می تواند به عنوان کاندیدی برای تهیه واکسن های نوترکیب علیه بیماری سل مطرح باشد (۷، ۹) در مطالعه حاضر به دنبال خالص سازی مجموعه آنتی ژنی ۸۵ پرولیفراسیون سلولی علیه آن با استفاده از یک مدل طبیعی انسانی در محیط کشت سلولی خون تام در ا فراد سالم با تست توبرکولین مثبت ومنفی مورد بررسی قرار گرفت .

مواد و روشها

افراد مورد مطالعه

در این بررسی ابتدا بر روی ۵۰ نفر از افراد سالم که از لحاظ یافته‌های هماتولوژیک طبیعی بوده اند تست توبرکولین جلدی به عمل آمد. جهت انجام این تست ۰/۱ میلی لیتر معادل ۵ واحد توبرکولین تهیه شده از انستیتو رازی –حصارک کرج به صورت داخل- جلدی (روش مانتو) در سطح قدامی ساعد تزریق گردید. نتیجه تست پس از ۷۲ ساعت قرائت واندرواسیون (سفتی) بیش از ۱۰ میلی متر به عنوان مثبت تلقی گردید.

براساس نتیجه تست توبرکولین افراد سالم به دو گروه مشخص (۲۵ نفر با تست توبرکولین مثبت و۲۵ نفر با تست توبر کولین منفی) تقسیم شدند.لازم به ذکر است که از افراد جهت نمونه‌گیری رضایت نامه دریافت گردید ومراحل پژوهش نیز از لحاظ اخلاقی در کمیته مربوطه معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اهواز مورد تایید قرار گرفت.

آماده سازی آنتی ژن

کشت باکتری: مایکوباکتریوم بویس (BCG) سویه P2-۱۱۷۳ انستیتو پاستور فرانسه ابتدا در یک محیط دی فازیک (حاوی سیب زمینی و محیط کشت ساتون[3]) کشت داده شد سپس به مدت ۵-۴ هفته در دمای ۳۷ درجه ساتی گراد انکوبه گردید.

در مرحله بعدی جهت تهیه آنتی‌ژن کلنی‌های باکتری از سطح مایع محیط دی فازیک به ارلنهای حاوی محیط ساتون همراه با سولفات روی منتقل گردید وبدون تکان دادن (Shaking) به مدت ۳-۲ هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

* تهیه مایع حاصل از کشت میکروبی (Culture Filtrate - CF)

محتویات ارلن‌های حاوی کشت باکتری در شرایط استریل از قیف حاوی پارچه تنظیف (گاز) به حالت دکانتاسیون[4] عبور داده شد ومایع حاصل از کشت دریک بطری استریل جمع آوری گردید.سپس مایع جمع آوری شده با استفاده از بافر فسفات ۲۰ میلی مولار حاوی کلرید سدیم ۴۵۰ میلی مولار به تعادل بافری رسید.

مراحل خالص سازی

۱) ابتدا جهت خالص سازی مایع کشت میکروبی(CF) از ستون فنیل سفاروز 4B (تهیه شده از فارماسیا-سوئد) که قبلا با بافر فسفات ۲۰ میلی مولار همراه با کلرید سدیم ۴۵۰ میلی مولار به تعادل بافری رسیده بود عبور داده شد. بعداز ورود نمونه ستون مجددا با بافر فوق شستشو داده شد.بعد از این مرحله ستون به ترتیب با محلول های ۲۰ میلی مولار، ۴ میلی مولار بافر فسفات و در نهایت با اتانل ۱۰درصد شستشو داده شد و فراکشن های حاصل جمع‌آوری گردید.

۲) در این مرحله فراکشن بدست آمده بعداز شستشوی ستون مرحله ۱، با اتانل ۱۰درصد از ستونDEAE- سفاسل که قبلا با بافر ۴ میلی مولار فسفات حاوی ۵۰ درصد گلیسرول به تعادل بافری رسیده بود عبور داده شد. بعداز ورود نمونه ستون مجددا با همان بافر شستشو داده شد. سپس فراکشن حاوی پروتئین مورد نظر با شستن ستون با گرادیانتی از بافر فسفات ۵۶ میلی‌مولار و۴ میلی‌مولار جمع‌آوری گردید. فراکشن‌های حاصل از این مرحله با استفاده از الکتروفورز پروتئین ژل پلی اکریل آمید با روش Laemmli مورد بررسی قرار گرفتند (۱۰) و سپس با استفاده از سیستم آمیکون تغلیظ گردیدند.

۳) در مرحله سوم فراکشن‌های حاصل از مرحله دوم که علاوه بر باند پروتینی مورد نظر حاوی پروتینی‌های دیگری بوده اند به ستون سوپردکس ۷۵ که قبلا با بافر ۵۰ میلی مولار فسفات حاوی ۵۰درصد گلیسرول به تعادل رسیده بود تزریق گردید. سپس ستون با همان بافر شستشو گردید و فراکشن‌های حاصل جمع‌آوری گردید.

الکتروفورز پروتئین در ژل پلی آکریل آمید درحضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE)

جهت انجام الکتروفورز پروتئین از سیستم کامل الکتروفورز(تهیه شده ازشرکت Biorad) بر اساس روش Laemmli

1. Mycolytransferase
2. Trhalose Dimycolate
3. Sauton
4. Decantation
5. Semidry

استفاده گردید (۱۰) .پس از انجام الکتروفورز ژل به روش نقره، رنگ آمیزی گردید.

ایمنوبلاتینگ

پس ازانجام عمل الکتروفورز، باندهای پروتئینی با استفاده از روش نیمه خشک[5] به کاغذ نیتروسلولز منتقل گردید (۱۲،۱۱) سپس در مجاورت آنتی‌بادی مونوکلونال TD17 تهیه شده از انیستیتو پاستور بروکسل، واکنش ایمنوبلاتینگ مورد بررسی قرار گرفت.

سایر آنتی ژنها

مشتق پروتئینی خالص شده (PPD) از انستیتو رازی حصارک- کرج و انستیتو پاستور بروکسل-بلژیک تهیه گردید و محرک پلی کلونال لنفوسیت ها (PHA) از شرکت سیگما (Sigma) تهیه شد.

بررسی پرولیفراسیون سلولی (Cell Proliferation assay) با استفاده از خون تام (Whole blood)

نمونه خون هپارینه در شرایط استریل از گروههای مورد مطالعه تهیه گردید. پس از بررسی هماتولوژیک ، حدود۴ میلی‌لیتر خون تام در لوله فالکون ریخته شد وسپس به مدت ۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفوژ گردید .پلاسما موجود در سطح آن جمع‌آوری گردید ومعادل پلاسمای جمع آوری شده محیط کشت RPMI حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (FCS) به نمونه خون اضافه گردید.وبا توجه به شمارش لکوسیت غلظت خون طوری تنظیم گردید که در هر میلی لیتر نمونه خون حدودا یک میلیون لکوسیت وجود داشته باشد.لازم به ذکر است افرادی که از لحاظ یافته های هماتولوژیک غیر طبیعی بوده اند از مطالعه حذف شدند.

در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر از PPD (10µg/ml)، آنتی ژن پروتیئنی خالص شده ۸۵ (5µg/ml) و PHA(5µg/ml) در چاهک میکروپلیت ریخته شد،و۱۸۰ میکرولیتر از خون رقیق شده به آنها اضافه گردید.

سپس میکروپلیت ها به مدت ۵ روز در مورد فیتو هماگلوتینین (PHA) و۶ روز در مورد سایر آنتی ژنها در انکوباتور باشرایط ۵ درصد CO2، رطوبت ۹۵ درصد و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید.

جهت بررسی پرولیفراسیون سلولی، حدود ۱۸ ساعت قبل اتمام مدت انکوباسیون ۵µ ci/Mmol از محلول تیمیدین در هر چاهک ریخته شد .سپس سلولها توسط هاروستر (Skatron Company) روی فیلتر برده شد .فیلتر در هوا خشک گردید وناحیه مربوط به هر چاهک پانچ گردید ودر لوله مخصوص ریخته شد وپس از اضافه کردن محلول آشکار ساز (Liquid Scintillation) میزان تیمیدین رادیو اکتیو وارده شده به DNA (Incorporation of tritiated into DNA) توسط بتا کانتر (Wallac company) بر حسب CPM شمارش گردید.سپس نتایج پرولیفراسیون سلولی به صورت میانگین CPM ± SD به ازای چهار حفره بیان گردید.

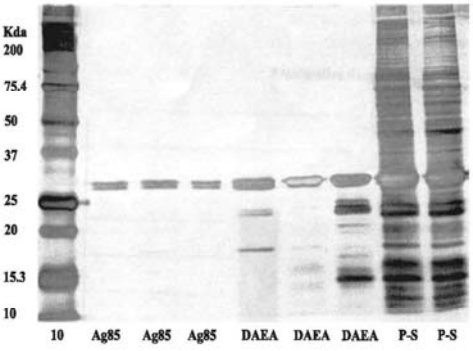
روشهای آماری

در این مطالعه ،جهت بررسی آماری از آزمون t test-Student و نرم افزار SPSS استفاده گردید.

یافته‌ها

خالص سازی

شکل ۱ وضعیت باندهای پروتئینی موجود در فراکشنهای به دست آمده از سه مرحله خالص‌سازی در ژل ۱۲ پلی‌اکریل آمید که با روی نقره رنگ‌آمیزی شده است را نشان می‌دهد.



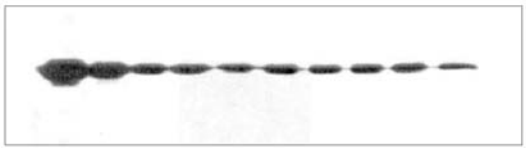
شکل ۱: الکتروفورز پروتئین در ژل پلی‌آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات (SDS-PAGE) پروتئین‌ها فیترات مایکوباکتریوم بویس پس از مراحل کروماتوگرافی هیدروفوبیک (۱)، تعویض یونی (۲) و ژل فیلتراسیون (۳)، ستون M شاخص وزن مولکولی، رنگ آمیزی به روش نقره می‌باشد.

الکتروفورز فراکشن به دست آمده از ستون فتیل سفاروز (Phenyl Sepharose) در ردیف‌های ۱ نشان داده است. همان طور که مشاهده می‌گردد در این ردیفها علاوه بر باند مربوط به آنتی ژن ۸۵ باندهای پروتئینی دیگر با وزن مولکولی بالاتر و پایین‌تر از پروتئین مورد نظر دیده می‌شود اما باند مربوط به آنتی‌ژن ۸۵ مشخص و بارزتر است. این باند در موقعیت ۳۲-۳۰ کیلودالتون قرار دارد که بیشترین باند پروتئینی را به خود اختصاص داده است. ردیف‌های ۲ فراکشن‌های به دست آمده از ستون (DEAE Sephacel) را نشان می‌دهد.

همان طور که در این شکل مشخص است علاوه بر باند مربوط به آنتی‌ژن ۸۵ پروتئین‌های دیگری نیز دیده می‌شود که مقدار آنها بسیار کمتر از آنتی‌ژن ۸۵ است. البته بعضی از لوله‌های این فراکشن فقط حاوی آنتی‌ژن ۸۵ می‌باشد.

در نهایت فراکشن‌های به دست آمده از ستون سوپردکس ۷۵ حاوی یک باند پروتئینی با وزن مولکولی در محدود ۳۲-۳۰ کیلودالتون است که مربوط به کمپلکس آنتی‌ژنی ۸۵ است (ردیف‌های ۳).

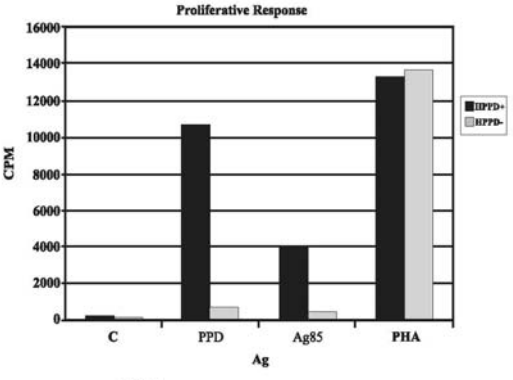
شکل ۲ نتایج حاصل از واکنش قوی بین آنتی‌ژن ۸۵ با آنتی‌بادی مونوکلونال (TD۱۷) ضد آن به روش وسترن بلاتینگ را نشان می‌دهد. در این شکل تنها یک باند پروتئینی رنگ‌آمیزی شده مشاهده می‌گردد که تائیدی بر ماهیت پروتئین خالص شده به عنوان آنتی‌ژن ۸۵ است.



شکل ۲: نتایج حاصل از واکنش بین آنتی‌ژن ۸۵ با آنتی‌بادی مونوکلونال (TD۱۷) ضد آن به روش وسترن را نشان می‌دهد. تمام باندها مربوط به آنتی‌ژن ۸۵ می‌باشد.

پاسخ لنفوپرولیفراسیون سلولی

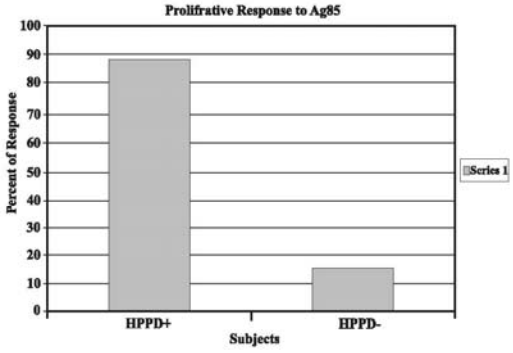
نمودار ۱ میانگین پاسخ پرولیفراسیون سلولی با توجه به میزان تیمیدین نشان‌دار جذب شده در DNA (بر حسب CPM) در سلولهای به دست آمده از افراد سالم با تست توبرکولین مثبت و منفی علیه فیتوهماگلوتینین (PHA)، RPMI، PPD و آنتی‌ژن خالص شده را نشان می‌دهد.



نمودار ۱: میانگین پاسخ پرولیفراسیون سلولی بر حسب CPM، در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت (+HPPD)، افراد سالم با تست توبرکولین (-HPPD)، علیه فیتوگلوتینین (PHA) و RPMI به عنوان کنترل منفی، ppd و آنتی‌ژن خالص شده ۸۵

این پاسخ علیه PHA و RPMI در افراد سالم +HPPD و -HPPD تفاوت معنی‌داری ندارد در مقابل پاسخ علیه PPD و آنتی ژن خالص شده ۸۵ در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت به طور معنی‌داری بیشتر از افراد سالم با تست توبرکولین منفی می‌باشد (P<0.001).

در این مطالعه با محاسبه Cut off درصد میزان پاسخ مثبت در گروههای مورد مطالعه تعیین گردید. میزان Cut off بر اساس میانگین پاسخ لیفراسیون سلولی به علاوه سه برابر انحراف معیار در افراد سالم با تست توبرکولین منفی تعیین گردید که مقدار آن علیه آنتی‌ژن ۸۵، PPD به ترتیب معادل 1385CPM، 2456CPM بود.



نمودار ۲: نمودار نمایش درصد پاسخ مثبت نسبت به PPD و آنتی‌ژن ۸۵ بر اساس پرولیفراسیون سلولی در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت (+HPPD) افراد سالم با تست توبرکولین منفی (-HPPD)

نمودار دوم درصد پاسخ پرولیفراسیون سلولی علیه آنتی‌ژن ۸۵ و PPD در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت و افراد سالم با تست توبرکولین منفی را نشان می‌دهد. (۲۲/۲۵) ۸۸ درصد از افراد سالم با تست توبرکولین مثبت دارای پاسخ مثبت (بیشتر از Cut Off) نسبت به آنتی‌ژن ۸۵ بوده‌اند. لازم به ذکر است تمام افراد این گروه نسبت به PPD پاسخ مثبت نشان داده‌اند. ۱۶درصد (۴/۲۵) افراد سالم با تست توبرکولین منفی نیز پاسخ لیفراسیون سلولی مثبت علیه آنتی‌ژن ۸۵Ag و PPD نشان داده‌اند (نمودار ۲).

بحث

بر اساس اطلاعات موجود، مطالعه حاضر اولین گزارش بررسی پاسخ ایمنی سلولی علیه مجموعه آنتی ژنی ۸۵ در کشور محسوب می شود. ارزیابی پاسخ ایمنی علیه این آنتی‌ژن در کشور ما با توجه به همسایه بودن با کشورهای که بیماری سل در آنها اندمیک می باشد می تواند در شناسایی این آنتی‌ژن به عنوان کاندیدی جهت تهیه واکسن علیه این بیماری مفید واقع شود.

در این مطالعه مجموعه آنتی ژنی ۸۵ با وزن مولکولی ۳۲-۳۰ کیلو دالتون که جزء اصلی ترشحی مایکوباکتریوم ها محسوب می شود پس از کشت باکتری مایکوباکتریوم بویس(BCG) در سطح محیط کشت ساتون وعبور فیلترات سلولی از ستونهای فنیل سفاروز،

دی اتیل آمینو اتیل سفاسل و سوپردکس ۷۵ خالص گردید. مقادیر بالای این آنتی ژن ، هنگامی بدست می آید که باکتری در سطح محیط کشت رشدمی کند(۱۳،۱۴) .این درحالی است که فیلترات به دست آمده از کشت باکتری ، همراه با تکان دادن (Shaking) حاوی مقادیر کمتری از آنتی ژن ۸۵ است (۶، ۱۳).

مطالعه باندهای پروتئینی بدست آمده بر روی ژل پلی اکریل آمید (SDS-Page) نشان می دهد که در مرحله اول خالص سازی بر روی ستون فنیل سفاروز (Phenyl Sepharose) علاوه بر آنتی ژن۸۵ باندهای پروتئینی متعدد با وزن مولکولی پایین و بالاتر از این آنتی ژن دیده می شود ولی باند پروتئینی مربوط به آنتی ژن ۸۵ مشخص وبارزتر می باشد (شکل۱). این موضوع در سایر مطالعات نیز مشاهده می گردد (۱۵).

مرحله دوم خالص سازی مبتنی بر استفاده از ستون تعویض آنیون دی اتیل آمینو اتیل سفاسل(DEAE Sephacel) بوده است، که تاثیر قابل توجهی در جداسازی آنتی ژن مذکور از سایر ناخالصی‌های پروتئینی دارد (ردیف‌های ۲ شکل ۱). Lim و همکارانش نیز توانسته اند با استفاده از این ستون بسیاری از ناخالصی های پروتئینی از جمله باندهای پروتئینی با وزن مولکولی بالاتر از آنتی ژن ۸۵ را حذف نمایند (۱۵). مرحله انتهایی خالص سازی مجموعه آنتی ژن ۸۵ استفاده از ستون سوپردکس ۷۵ بوده است که در آن پروتئین ها بر اساس اندازه مولکولی از یگدیگر جدا می شوند .

نتایج نشان می‌دهد که پروتئین مورد نظر با خلوص بالا بر روی این ستون جدا گردیده است.

در پژوهش حاضر با توجه به رفتار الکتروفورزی این پروتئین، وزن مولکولی آن در مقایسه با مارکرهای وزنی معادل ۳۲-۳۰ کیلودالتون تخمین زده شد (ستونهای۳ شکل ۱). همچنین نتایج ایمونوبلات با مونوکلونال آنتی بادی اختصاصی ضد این آنتی ژن ماهیت این باندها به عنوان آنتی ژن ۸۵ را تایید می نماید (شکل۲).

در این مطالعه سعی گردید از سیستم خون تام (Whole Blood) جهت بررسی پاسخ ایمنی سلولی استفاده شود. به طور کلی جهت بررسی پاسخ ایمنی سلولی از روش گرادیانت فایکول (Ficoll-Isopaque) استفاده می‌شود. دراین روش سلولهای تک هسته ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cells) از نمونه خون تام (W B) توسط فایکول جدا گردیده وپس از مراحل مختلف شستشو مورد استفاده قرار می گیرد (۱۶) باتوجه به مشکلاتی که در این روش وجود دارد همواره سعی بر این بوده است که از خون تام جهت بررسی ایمنی سلولی استفاده گردد. Leroux و همکارانش با استفاده از سیستم خون تام پاسخ ایمنی سلولی (پرولیفراسیون سلولی) علیه ویروس‌های سیتومگال، هرپس و میتوژن‌های مختلف را مورد مطالعه قرار داده اند وآن را با روش جدا سازی سلولهای تک هسته ای از خون محیطی (PMBC) مقایسه نموده است (۱۷).

همچنین در مطالعات مختلف از سیستم خون تام جهت بررسی پاسخ ایمنی سلولی از جمله پرولیفراسیون سلولی وترشح سایتوکاین ها علیه آنتی ژنهای مایکوباکتریوم استفاده گردیده است (۱۸، ۱۹). بر این اساس در مطالعه حاضر با تغییراتی در چگونگی انجام آزمایش این کار عملی گردید. برای مثال در سایر مطالعات نمونه های خون بدون جدا سازی پلاسما به نسبت ۱ به ۱۰ با محیط کشت رقیق می گردید (۱۸) اما در این مطالعه نمونه خون ابتدا سانتریفوژ و پلاسمای رویی آن خارج گردید. سپس معادل آن محیط کشتRPMI همراه با سرم جنینی گاوی ۱۰درصد (FCS) اضافه گردید.

در مرحله بعد نمونه خون براساس نتایج بررسی هماتولوژیک به ترتیبی رقیق گردید که در هر میلی‌لیتر خون یک میلیون لکوسیت وجود داشته باشد.این امرمی تواند یکی از اشکالات وارد به این روش (عدم مشخص بودن تعداد لکوسیت) را برطرف کند. همچنین خارج نمودن پلاسما می تواند عوامل مداخله گر احتمالی در پلاسما را حذف کرده واضافه کردن محیط کشت حاوی سرم جنینی گاوی محرک لازم جهت رشد لنفوسیت‌ها را فراهم سازد.

با توجه به مطالعات انجام شده که به آنها اشاره گردید وهمچنین مطالعه حاضر، استفاده از روش خون تام (WB) در بررسی پاسخ ایمنی سلولی خصوصا در مورد توبرکلوزیس مناسب به نظر می رسد و دارای مزایایی نسبت به روش PMBC است (۱۷، ۱۸) این مزایا عبارتند از:

۱- استفاده از این روش نیاز به نمونه خون کمتری دارد واین موضوع خصوصا در مورد مطالعه بیماران وکودکان حائز اهمیت است.

۲- با توجه به این که در این روش مراحل جدا سازی سلولها وشستشو های متعدد صورت نمی گیرد این روش سریعتر، کم هزینه تر بوده واین مزیت خصوصا در مطالعات اپیدمیولوژیک و میدانی حایز اهمیت است.

۳- در این روش دستکاری (Manipulation) برروی نمونه‌های خونی کمتر بوده ودر نتیجه میزان آلودگی در کشت خون نیز کمتر خواهد بود. این موضوع در آزمایشگاههای که تجهیزات مدرن کمتری دارند به خصوص در کشور ما حائز اهمیت است.

۴- نکته مهم آن است که در این روش شرایط طبیعی سلولها نسبت به روشPMBC بیشتر حفظ شده و همچنین در روشPMBC به علت استفاده از فایکول ومراحل مختلف شستشو بعضی از زیرجمعیت‌های لکوسیت ها حذف می گردند.

در این مطالعه جهت ارزیابی پاسخ ایمنی سلولی از پرولیفراسیون سلولی در محیط کشت سلولی استفاده گردید. پرولیفراسیون سلولی یکی از متداول‌ترین تست ها در بررسی ایمنی سلولی محسوب می‌شود که می‌تواند به عنوان یک معیار مناسب جهت تعیین میزان پاسخ لنفوسیت‌های T به دنبال تحریک آنتی ژن قلمداد گردد (۱۶).

نتایج حاصل از بررسی پرولیفراسیون سلولی وتولید انتر فرون گاما علیه فیتوهماگلوتینین (PHA) به عنوان میتوژن (کنترل مثبت) و RPMI بدون آنتی ژن به عنوان کنترل منفی در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت و منفی (نمودار۱) حاکی از ان است که میزان این پاسخ علیه PHA خیلی بیشتر از RPMI است که این امر نشان دهنده عملکرد صحیح سیستم کشت سلولی طراحی شده بر اساس استفاده از خون تام (WB) می‌باشد. مقایسه پرولیفراسیون سلولی علیه Ag85 در مقایسه با PPD در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت و منفی نشان می‌دهد (نمودار۱) که میزان این پاسخ علیه PPD، Ag85 در افراد سالم با تست توبرکولین مثبت بیشتر از افراد سالم با تست توبرکولین منفی است و اختلاف معنی دار ی بین این افراد وجود دارد ($P<0.001$) در مقابل این تفاوت علیه فیتوهماگلوتینین (PHA) که یک میتوژن بوده و قابلیت تحریک غیر اختصاصی دارد، مشاهده نمی‌شود ($P>0/05$) این مقایسه نشان می دهد که افراد سالم توبرکولین منفی علیه آنتی ژنهای مایکوباکتریومی پاسخ مناسب از خود نشان نداده‌اند.

این امر می تواند تاکیدی بر این موضوع باشد که این افراد با آنتی ژنهای مایکوباکتریوم تماس نداشته اند یا در صورت تماس پاسخ مناسبی از خود نشان نداده اند. بالا بودن میزان پاسخ سلولی در افراد سالم باتست توبرکولین مثبت نیز نشان می دهد که این افراد پاسخ ایمنی مناسبی به دنبال عفونت از خود نشان داده اند . در مطالعه ای Lim و همکارانش پرولیفراسیون سلولی علیه مجموعه آنتی ژنی ۸۵ در۵ نفر از افراد سالم با تست توبرکولین مثبت و۵ نفر با تست توبرکولین منفی مورد بررسی قرار داده اند آنها نیز مشاهده نموده اند که میزان پاسخ در افراد توبرکولین مثبت بیشتر از افراد سالم باتست توبرکولین منفی است (۱۵).

از سوی دیگر مقایسه پاسخ سلولی علیه PPD، Ag85 در افراد سالم باتست توبرکولین مثبت نشان می دهد که میزان این پاسخ علیه PPD بیشتر از آنتی ژن خالص شده ۸۵ می باشد (نمودار۱) . علت این تفاوت به خاطر آن است که PPD شامل مجموعه زیادی از آنتی ژنهای مختلف از قبیل پروتئین های موجود در مایع حاصل از کشت میکروبی و پلی ساکاریدهای دیواره سلولی است که در مایکوباکتریومها وجود دارند(۲۰). این آنتی ژنها می توانند انواعی از کلونهای اختصاصی لنفوسیت را تحریک نمایند. در مقابل آنتی ژن خالص شده ۸۵ در واقع یک جزء پروتئینی موجود در مایع حاصل از کشت میکروبی مایکوباکتریوم ها می باشد و کلنی‌های اختصاصی محدودی را تحریک می کند.

نتایج به دست آمده بعداز تعیین Cut off نشان می دهد که۸۸ درصد از افراد سالم با تست توبرکولین مثبت نسبت به آنتی ژن ۸۵ پاسخ پرولیفراسیون سلولی، مثبت از خود نشان داده اند (نمودار ۲) بالا بودن درصد این پاسخ نشان دهنده نقش حفاظتی این آنتی ژن علیه عفونت ناشی از توبرکلوزیس بوده و بر این نکته تاکیددارد،که آنتی ژن ۸۵ قادر است به عنوان یک جزء ترشحی مایکوباکتریوم ها سلولهای سیستم ایمنی را در محیط کشت سلولی به خوبی تحریک نموده و لذا می تواند ،به عنوان کاندید مناسب برای تهیه واکسن ریر واحد (Subunit Vaccines) علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مطرح باشد(۲۱،۲۲).

در کارگاه آموزشی (Workshop) ویژه تهیه واکسن علیه توبرکلوزیس که در سال ۱۹۹۷ در ایالت اوهایو امریکا تشکیل شد. Steven Reed براین نکته تاکید نمود که آن دسته از آنتی ژنهای مایکوباکتریومی می تواند جهت تهیه واکسن جدید مطرح شوند که حداقل ۵۰ درصد افراد سالم با تست توبرکولین مثبت(PPD+) دارای پاسخ پرولیفراسیون سلولی مثبت علیه آن آنتی ژن داشته باشند (۲۳).

با توجه به نتایج بدست آمده از بررسی حاضر وسایر مطالعات نشان می دهد که آنتی ژن ۸۵ دارای این ویژ گی است (۲۴). استفاده از آنتی ژن ۸۵ به عنوان واکسن زیر واحد (Subunit Vaccines) از این لحاظ اهمیت پیدا می کند که این واکسن ها فقط شامل اجزای کلیدی مایکوباکتریوم ها هستند که توانایی تحریک سیستم ایمنی را دارند و از این لحاظ می تواند بر BCG وسایر واکسن های که حاوی اجزای کامل باکتری (Whole Bacteria) است برتری داشته باشد.

حذف اجزایی ازباکتری که به عنوان سرکوب کننده پاسخ ایمنی مطرح است، می‌تواند باعث تحریک بیشتر سیستم ایمنی شود (۲۵). از سوی دیگر کلون کردن ژن بیان کننده این آنتی ژن در پلاسمید حاوی یک پروموتور قوی ویروسی ودر نهایت تهیه DNA واکسن وتزریق آن به میزبان می تواند باعث تحریک سیستم ایمنی شود (۵، ۲۲، ۲۶).

همچنین مطا لعاتی در زمینه استفاده از این آنتی ژن به عنوان دوز یادآور(Booster) بعداز تزریق واکسنBCG در مدل‌های حیوانی صورت گرفته است.نتایج نشان می دهد در نتیجه تزریق این آنتی ژن به عنوان دوز یادآور به موش (Mice) سطح پاسخ ایمنی بر علیه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس افزایش می یابد (۲۷، ۲۸). در این مطالعه ۱۶ درصد از افراد سالم با تست توبرکولین منفی دارای پاسخ پرولیفراسیون سلولی مثبت علیه PPD، Ag85 در محیط کشت سلولی خون تام بوده اند(نمودار۲) که می تواند دلیلی بر حساسیت بیشتر این روش نسبت به تست توبرکولین جلدی باشد.

نتایج به دست آمده در این مطالعه به این نکته تاکید دارد که افراد سالم با تست توبرکولین مثبت پاسخ سلولی مناسبی و متفاوتی علیه آنتی ژن۸۵ نسبت به افراد سالم با تست توبرکولین منفی از خود نشان داده اند .واین امر می تواند دلیلی بر نقش حفاظتی این آنتی ژن علیه عفونت ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده و نوید بخش این موضوع باشد که چنانچه واکسن مناسبی در آینده برپایه این آنتی ژن تهیه گردد. استفاده از آن می‌تواند در کشور ما مفید واقع شود.

تقدیر و تشکر

این مطالعه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی اهواز است و نویسندگان مقاله مراتب تشکر وقدردانی خود را از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اهواز که درتمام مراحل انجام این طرح آن را مورد حمایت قرار داده اند، اعلام می دارند.

References

1. Crevel R, Ottenhoff THM, Meer JWM: Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. Clin Microbiol Rev 2002; 15(2): 294-309
2. Tiruviluamala P, Reichman.LD: Tuberculosisn Annu Rev-Public Health 2002; 23: 403-426
3. Tuberculosis Research Center (ICMR),Chennai. Fifteen year follow up of trial of BCG vaccines in south India for tuberculosis prevention. Indian J Med Res 1999; 110: 56–69
1. Sutherland I, Spprinett VH: Effectiveness of BCG vaccination in England and Wales in 1983. Tubercle 1987; 68:81-92
5. Huygen K: On the use of DNA Vaccines for the Prophylaxis of Mycobacterial Disease Infect Immun 2003; 1613-1621
6. Andersen P, Askgaard D, Ljungqvist L, Bennedsen J, Heron I: Protein released from Mycobacterium tuberculosis during growth.Infect Immun 1991; 59:1905-1910
7. Tanghe A, Denis O, Lambrecht B, Motte V, Berg T, Huygen K: DNA Vaccines Encoding Ag85 is Immunogenic and Protective when Administered by Interamuscular Needle Injection but Not by Epidermal gene gun bombardment. Infect Immun 2000; 68(7): 3854-3860
8. Kremer L,Maughan WN, Wilson RA, Dover LG, Besra.GS: The M. tuberculodis antigen 85 complex and mycolytransferase activity .Letters in Applied microbiology 2002; 34: 233-237
9. Boesen H, Jenesen BN, Wilcke T, Andersen P: Human T-Cell Response to Secreted Antigen Fractions of Mycobacterium tuberculosis.Infect Immun 1995; 63(4):1491-1497
10. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.Nature.1970; 227: 680-685
11. Gershoni JM, Palade GE: Protein Blotting: Principles and applications. Anal Biochem. 1983; 131: 139-149
12. Lauriere M: A Semidry electroblotting system efficiently transfer both high and low molecular weight protein separated by SDS-PAGE. Anal Biochem 1993; 212: 206-211
13. Andersen P: Host Response and Antigen Involved in Protective Immunity to Mycobacterium tuberculosis Scand J Immunol 1997; 45: 115-131
14. Nagai S, Wiker HG, Harobe M, Kinomoto M: Isolation and partial characterization of major protein antigens in the culture fluid of Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun 1991; 59: 372-382
15. Lim JH, Park JK, Jo EK, Song CH, Min D, Song YJ, Kim HJ: Purification and Immuno reactivity of Three Components from the 30/32 Kilodalton Antigen 85 Complex in *Mycobacterium tuberculosis*. Infect. Immun. 1999; 67(11): 6187-6190
16. Fernandez R, Vetivicka.BV: Methods in Cellular Immunology. 2 th ed CRC press 2001; 53-57
17. Leroux M, Schindler L, Braun R, Doerr HW, Geisen HP, Kirchner HP: A whole- Blood Lymphoproliferation Assay for Measuring Cellular Immunity against Herpes Viruses J Immunological Methods 1985; 79: 251-262
18. Weir RE, Morgan AR, Britton WJ, Butlin CR, Dockrell HM: Development of a whole blood assay to measure T cell responses to leprosy: a new tool for immuno-epidemiological field studies of leprosy immunity. J Immunological Methods 1994; 176: 193-101
19. Crevel RV,Jongekrig JV, Netea MG, Lange W, Kullberg BJ, Meer JWM, Disease Specific ex vivo Stimulation of Whole blood assay for Cytokine Production: Application in the study of Tuberculosis J Immunological Methods 1999; 222: 145-153
20. Harboe M: Antigen of PPD, Old Tuberculin, and Autoclaved Mycobacterium bovis BCG studied by Crossed Immunoelectrophoresis. AM Rev Respir Dis.1981; 124: 80-87
21. Andersen P, Vaccines TB: Progress and Problems. Trends in Immunol 2001; 22(3):160-68
22. Huygen K: DNA vaccines: Application to tuberculodis. Int J Tuberc Lung Dis 1998; 2(12): 971-978
23. Jacobs GG, Johnson JL, Boom WH, Wallis RS, Whalen C, Ginsberg AM: Tuberculosis vaccines: how close to human testing? Tubercle and Lung Disease, 1997; 78: 159-169
24. Torres M, Sampeiro PM, Zamudio LJ, Teran L, Camarena A, Quezada R, Ramos E, Sada E: Comparison of the immune response against Mycobacterium tuberculosis antigen between a group of patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts.Clin Exp Immunol 1994; 96: 75-78
25. Horwitz MA, LEE BW, Dillon BJ, Harth G: Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination

with major extra cellular proteins of Mycobacterium tuberculosis Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 1530-1534
26. Huygen K, Content J, Deins O, Montgomery DL, Yawman A: Immunogenicity and Protective efficacy of a Tuberculosis DNA Vaccine Nature Medicine, 1996; 2(8): 893-898
27. Brooks JV, Frank A, Keen M, Bellisle J: ORME Boosting Vaccine for tuberculosis. Infect Immun 2001; 69(4): 2714-2717
28. Mcshane H: Prime boost immunization strategies for infectious diseases Current Opinion in Molecular Therapeutics