میکرولیتر RNasin (۴۰/Uµl) [Fermentas]: ۰/۵ میکرولیتر، $MgCl_2$ (۵۰mM) [Eurobio]: ۰/۵ میکرولیتر و آنزیم MMLV (۲۰۰ /Uµl) [Invitrogen]: ۱ میکرو لیتر اضافه و حجم نهایی با آب به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. سپس، ابتدا به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول واکنش در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

واکنش PCR (Polymerase Chain Reaction)

به ۵ میکرولیتر از محصول واکنش RT، بافر تکثیر ۱۰X [سینان]: ۵ میکرولیتر، dNTP ۱ (۱۰mM) [Eurobio]: ۱ میکرو لیتر، آنزیم Taq Polymerase [سیناژن]: ۰/۳ واحد و مخلوط پرایمر (بالا دست و پایین دست؛ ۱۰µM) هر کدام ۲/۵ میکرولیتر و آب تا حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر اضافه شد و ۳۰-۲۵ سیکل به صورت Denaturation (۹۴درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه)، Annealing (۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه) و Extention (۷۲ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه) در دستگاه ترمال سایکلر اجرا شد. همچنین در انتهای واکنش، یک سیکل Extention نهایی (۷۲ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱۰ دقیقه اجرا و محصولPCR با ژل الکتروفورز ۱/۵ درصد بررسی شد.

هضم محصول PCR

به منظور کسب اطمینان از هویت قطعه تکثیر شده باPCR ، الگوی هضم محصول PCR مورد بررسی قرار گرفت. آنزیم ECoRI برای برش قطعه تکثیری ژن survivin انتخاب شد که این قطعه را در محل نوکلئوتید ۲۹۸ از توالی mRNA برش می زند و دو قطعه کوچک‌تر (۱۲ و ۲۴۲ جفت بازی) ایجاد می‌کند. محصول واکنش هضم با ژل پلی آکریل آمید ۸ درصد بررسی شد.

آنالیز آماری

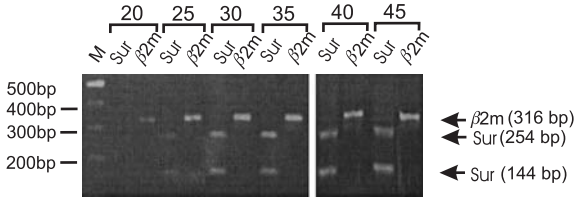
محصول PCR تحت تابش نور ماورای بنفش و به واسطه حضور اتیدیم بروماید در ژل آگارز رؤیت و از آن عکس‌برداری شد. شدت سیگنال های هر باند به کمک نرم افزار (Labimage نگارش ۲/۶، کمپانی Kapelan GmbH) سنجیده شد و نتایج حاصله از ۳ تکرار برای هر گروه سنی با آزمون های ANOVAو LOSD آنالیز آماری شد.

یافته‌ها

بهینه سازی واکنش PCR

برای بهینه سازی واکنش PCR و انتخاب تعداد سیکل مناسب، وجود سیگنال قابل رؤیت قبل از وارد شدن واکنش PCR به فاز پلاتو (plateau) ، RNAی کل (Total RNA) حاصل از بیوپسی مغز موش در شرایط RNase-free تهیه و کمیت و کیفیت RNAی به دست آمده به کمک اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز بررسی شد (نتیجه نشان داده نشده است). در بررسی ژل دو باند ۱۸S و ۲۸S RNA ریبوزومی (rRNA) به وضوح قابل رؤیت است که مؤید عدم تجزیهdegradation (RNA) و همچنین نسبت به دست آمده $A_{۲۸۰}$/$A_{۲۶۰}$ بین ۱/۸ و ۲ نشان دهنده درجه بالای خلوص RNA و نیز عدم آغشتگی آن با پروتئین وDNA ی ژنومی است.

برای انتخاب تعداد سیکل مناسبPCR ، برای هر ژن ۶ تیوپ همسان حاوی مخلوط PCR تهیه شد و از سیکل ۲۰ام تا ۴۵ام، به ازاء هر ۵ سیکل، یک تیوپ از دستگاه خارج و محصول PCR با ژل آگارز ۱/۵ درصد بررسی شد. باندهای حاصل متناسب با اندازه قطعه طراحی شده برای β_2m (۳۱۶bp) و ژن survivin (۲۵۴bp) می‌باشد وشدت سیگنال به دست آمده یک افزایش نسبتاً خطی در راستای افزایش تعداد سیکل PCR را نشان می دهد (شکل ۱). این نتیجه بیانگر آن است که عامل یا عوامل محدود کننده ای درمحتویات موجود در واکنش PCR به ویژه در سیکل های پایین تر وجود ندارد. برای ادامه تحقیق ازتعداد سیکل ۲۵ برایβ_2 m و ۳۰ برایsur vivinاستفاده شد.

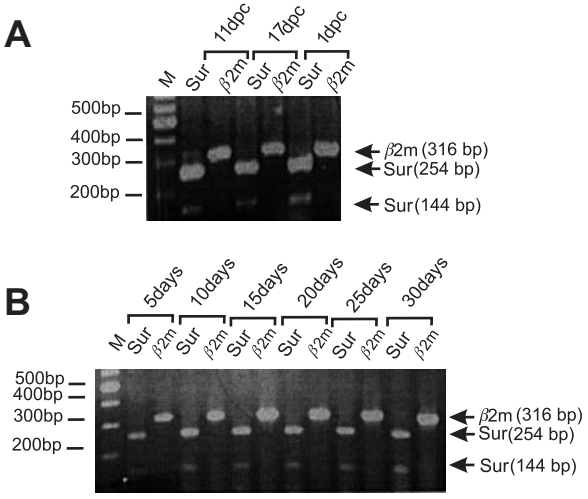


شکل ۱: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR مربوط به انتخاب تعداد مناسب سیکل PCR روی ژن survivin (۲۵۴ و ۱۴۴ جفت باز) و β_2m موش (۳۱۶ جفت باز): ستون ۱ مارکر ستون‌های بعدی به ترتیب محصول سیکل‌های ۲۰ الی ۴۵ را نشان می‌دهد

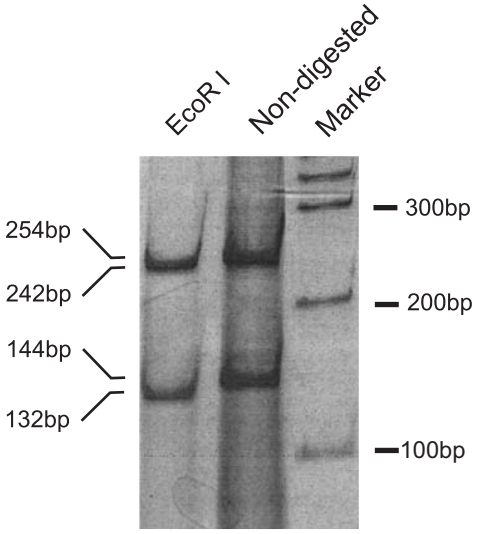
شناسایی دو واریانت ویرایشی مختلف ژن survivin

به منظور بررسی پروفیل بیان ژن survivin در مراحل مختلف تکوین، بیوپسی مغز از سنین مختلف موش(جنینهای ۱۱ و ۱۷ روزه، و نوزادان ۱ تا ۳۰ روزه) تهیه و بیان ژن survivin آنها به کمک تکنیک RT-PCR بررسی شد. در کلیه گروههای مورد بررسی علاوه بر شناسایی قطعه تکثیر شده survivin با اندازه مورد انتظار (۲۵۴bp) یک محصول دیگر با اندازه تقریبی ۱۴۴bp شناسایی شد (شکل ۱، ۲). شدت بیان این محصول در تمامی گروههای سنی به مراتب کمتر از شدت بیان محصول مورد انتظار بود. برای تایید ماهیت این دو محصول، هضم آنزیمی بر روی قطعات تزاید یافته در واکنش PCR انجام گرفت. آنزیم EcoRI با حذف یک قطعه ۱۲ جفت بازی از قسمت '۵ توالی مورد نظر تولید دو محصول کوچکتر با

اندازه های تقریبی ۲۴۲bp و ۱۳۲ bp را نمود (شکل ۳).



شکل ۲: طرح الکتروفورزی محصول RT-PCR ژنهای β_2m و survivin در طی تکوین مغز موش، قسمت A: ستون ۱ مارکر و ستون‌های بعدی به ترتیب محصول RT-PCR روی نمونه‌های RNA گروههای سنی جنین ۱۱ و ۱۷ روزه و نیز موش یک روزه را نشان می دهد. قسمت B: ستون ۱ مارکر و ستونهای بعدی به ترتیب محصول RT-PCR روی نمونه‌های RNA گروههای سنی ۵ تا ۳۰ روزه را نشان می‌دهد

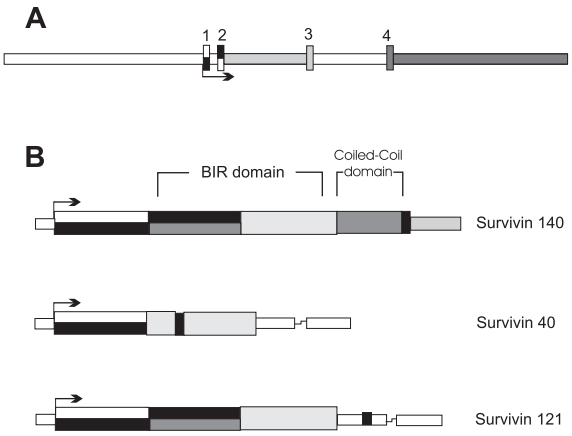


شکل ۳: طرح الکتروفورزی هضم محصول RT-PCR روی ژل پل‌آکریل‌آمید ۸ درصد. آنزیم EcoR I با حذف ۱۲bp از انتهای قطعه تکثیری از ژن survivin موشی محصولات هضم شده کوچکتری را ایجاد کرد.

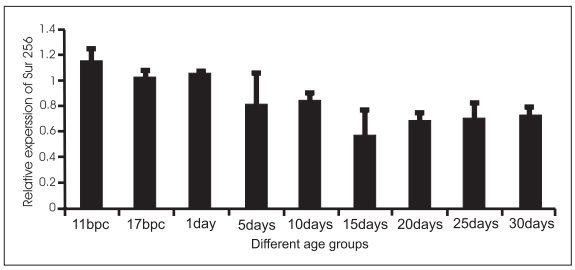
بررسی نیمه کمی واریانت های survivin در حین تکوین مغز موش

برای حصول اطمینان از اینکه RNA به میزان برابر در هر واکنش به کار رفته و تفاوت احتمالی در شدت سیگنال باند مربوط به ژن survivin هر گروه، ناشی از اختلاف در میزان RNA ی به کار رفته اولیه نبوده است، از ژن β_2m به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. برای هر گروه سنی واکنش RT PCR-با شرایط یکسان برای دو ژن survivin و β_2m انجام شد و نتایج حاصل به طور مقایسه‌ای مورد استفاده قرار گرفت. الکتروفورز محصولات PCR برای ژن، survivin دو باند با اندازه‌های مختلف را نشان داد که اندازه‌های به دست آمده معادل با اندازه قطعه تزاید یافته برای β_2m (۳۱۶ bp) و Survivin (۲۵۴ bp و ۱۴۴) می‌باشد (شکل ۲ و۳).

این آزمایش در سه سری مختلف از موش ها تکرار شد و شدت سیگنال برای کلیه باند ها به کمک نرم افزار Labimage سنجیده شد. نمودار ۲ میانگین شدت نسبی بیان واریانت بزرگتر ژن survivin (survivin ۱۴۰) به β_2 m را در گروههای مختلف سنی نشان می‌دهد. آنالیز آماری موید آن است که بیان نسبی survivin ۱۴۰ در قبل و هنگام تولد به طور معنی داری از بیان نسبی آن در بعد از تولد بیشتر می‌باشد (نمودار ۲). با این وجود بیان نسبی واریانت کوچکتر survivin (Survivin ۴۰) در قبل و بعد از تولد ثابت بود و هیچ گونه تغییر معنی‌داری را نشان نداد (نتایج نشان داده نشده است).



نمودار ۱: تصویری شماتیک از سازماندهی نواحی اگزونی و اینترونی ژن survivin بر روی کروموزوم ۱۱E۲ (A) و نیز نحوه پردازش رونوشت اولیه در تولید سه واریانت مختلف survivin (B).



نمودار ۲: شدت نسبی محصول RT-PCR واریانت ۲۵۴ جفت بازی ژن survivin در سنین مختلف موش. اندازه گیری در هر گروه سنی به صورت شدت باند survivin به باند β_2m می‌باشد. نتایج به صورت Mean±SEM نشان داده شده است.

بحث

برقراری یک تعادل موزون بین تکثیر سلولی، بقا سلولی و آپوپتوز نقش مهمی در تکوین سیستم عصبی و ایجاد اتصالات نورونی (تشکیل سیناپسها) دارد. از طرف دیگر برهم خوردن این تنظیم پیامدهای کلینیکی متعددی را به همراه دارد؛ به طوری که افزایش در تکثیر سلولی و یا کاهش در نرخ آپوپتوز در ایجاد انواع تومورهای مغزی و افزایش بیش از حد آپوپتوز در بیماریهای تحلیل رونده عصبی دخالت دارد (۳). در نتیجه بررسی وقایع مولکولی درگیر در تقسیم سلولی و آپوپتوز از اهمیت به سزایی در زمینه علل شناسی بیماری و نیز ارائه روشهای هوشمند درمانی برخوردار است.

Survivin عضو جدیدی از خانواده مهارکننده آپوپتوز (IAP) است که نقشی دوگانه در تنظیم تقسیم سلولی و نیز مهار آپوپتوز دارد (۵). پروتئین survivin که در فاز (G_2M/) بیان می‌شود و بیان آن در طی چرخه سلولی تنظیم می‌شود برای انجام صحیح میتوز و تقسیم سلولی مورد نیاز است و نقص در آن می‌تواند به فعال شدن یک نقطه ی کنترلی چرخه سلولی و نهایتاً القای آپوپتوز بیانجامد (۱۱). این نیاز ظاهری به survivin جهت تقسیم سلولی طبیعی پیشنهاد می‌کند که بیش بیان این پروتئین (که به عنوان مثال در بسیاری از تومورها دیده می‌شود) می‌تواند کنترل طبیعی چرخه سلولی را برهم بزند. چنین پاسخی ممکن است دلیلی مناسب برای فعالیت ضدآپوپتوزی survivin باشد و ارتباط نزدیک بین نقاط کنترلی چرخه سلولی و تعهد به آپوپتوز را نشان دهد (۱۱، ۱۲).

علی‌رغم میانجیگری ژن survivin در هومئوستازی بافتها و نقش برجسته آن در مهار آپوپتوز، تاکنون بر روی بیان ژن و نیز نسبت بیان واریانتهای مختلف آن در حین تکوین مغز هیچ‌گونه تحقیقی صورت نگرفته است. در این تحقیق برای نخستین بار بیان این ژن در طی تکوین مغز مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌های این تحقیق بیان دو واریانت ۱۴۰ survivin و ۴۰ survivin را در مغز گزارش می‌کند که از این میان شدت بیان ۱۴۰ survivin بیشتر از واریانت دوم بوده و نیز اینکه میزان بیان در دوران قبل از تولد بیشتر از دوران بعد از تولد است. این یافته در راستای مطالعات پیشین است که کاهش و یا خاموشی بیان این ژن را در بافتهای بالغ گزارش کرده است (۵). بیان بالای urvivin s در دوران قبل از تولد (و هنگام تولد) نیز یک هم‌زمانی را با اوج انجام نورون زایی در این دوران نشان می‌دهد (۱۳). در مقایسه، بیان ۴۰ survivin در تمامی گروههای سنی تقریبا ثابت ماند. نقش زیستی مستقیم و یا غیر مستقیم این واریانت در نورون زایی و آپوپتوز سیستم عصبی مشخص نیست و نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد اما احتمالاً از آنجا که ۴۰ survivin دامین پایانهٔ N را دارد ممکن است با اشکال دیگر Survivin دایمرهایی تشکیل دهد و بنابراین عملکرد کلی اشکال دیگر survivin را تنظیم و تعدیل نماید (Conway مکاتبه شخصی).

در تضاد با گزارش Conway و همکاران (۷) که بیان واریانت ۱۲۱ survivin را در اکثر بافتهای موش گزارش کرده بود، در این مطالعه وجود این واریانت در مغز تشخیص داده نشد. برای تمایز بین ۱۴۰ survivin و ۱۲۱ survivin ما از یک پرایمر پایین دست دوم که مکمل توالی موجود بر روی اینترون شماره ۳ است، استفاده کردیم (۷). این پرایمر تنها قادر به تکثیر ۱۲۱ survivin می‌باشد و واریانتهای دیگر survivin که فاقد این قطعه در رونوشت خویش هستند، تکثیر نمی شوند. به‌کارگیری این پرایمر هیچگونه محصولی را تکثیر نکرد. با توجه به اینکه در گزارش Conwa y و همکاران از پرایمر پایین دست (دوم) یکسانی برای تشخیص ۱۲۱ survivin استفاده شد می‌توان نتیجه گیری کرد که ین واریانت در مغز تشکیل نمی‌شود. این نتیجه‌گیری هماهنگ با یک یافته قبلی است که بیان یک واریانت انسانی معادل با واریانت، ۴۰ survivin و نه واریانت ۱۲۱ survivin را در یک لایه سلولی نوروبلاستومای انسانی گزارش کرده است (۷). اهمیت فیزیولوژیکی بیان متمایز survivin در بافتهای مختلف نیازمند تحقیقات بیشتری می‌باشد.

وجود واریانتهای مختلف ژن survivin موسوم به survivin deltaEx۳- (فاقد اگزون ۳) و survivin-2B (دارای قسمتی از اینترون ۲) در انسان نیز گزارش شده است (۱۴). این واریانتها دارای خصوصیات ضد آپوپتوتیک مختلف بوده و احتمالاً نسبت آنها به وسیله مکانیسم های کنترلی پیچیده‌ای تنظیم می‌شود. همچنین ادعا شده است که بیان این واریانتها در پیشرفت تومور و نیز در رفتار کلینیکی تومور نقش دارد (۱۵، ۱۶). گزارشی نیز مبنی بر جایابی زیر سلولی متمایز این واریانتها ارائه شده است. در حالی‌که survivin و survivin-2B ترجیحاً در سیتوپلاسم محل‌یابی شدند، survivin-deltaEx3 در هسته مستقر می‌باشد (۱۷). در یک جمع‌بندی اولیه این گونه به نظر می‌رسد که در تنظیم آپوپتوز نه تنها میزان بیان survivin بلکه نحوه پردازش رونوشت اولیه و تولید واریانتهای مختلف ویرایشی دخالت دارند. لذا بررسی بیان واریانتهای مختلف ژن در تومورهای مغزی و مقایسه آن با بافت سالم اطلاعات کلینیکی با ارزشی را به همراه خواهد داشت. اخیراً بیان گسترده ژن survivin در طیف وسیعی از تومورهای مغزی (گلیوما، منتژیما و شوآنوما) گزارش شده است؛ همچنین ادعا شده است که این بیان متناسب با درجه بدخیمی و پیش آگهی ضایعه می‌باشد (۱۸، ۱۹، ۲۰). این یافته survivin را به عنوان یک هدف بالقوه برای ایمونوتراپی تومورهای مغزی معرفی می‌کند (۲۱). در تحقیق حاضر الگوی زمانی بیان survivin در نمونه‌های به دست آمده از کل مغز تعیین شد.

با توجه به اینکه اوج نورون زایی و آپوپتوز در نواحی مختلف مغز (نظیر مخ و مخچه) از نظر زمانی تفاوتهایی را نشان می دهد (۱۳)؛ لذا بررسی دقیق‌تر از نحوه بیان ژن در سیستم عصبی نیازمند نمونه‌گیری مجزا از نواحی مختلف مغز می‌باشد. همچنین با توجه به اینکه بافت مغزی از دو رده سلولی کاملاً

متمایز (نورون و گلیا) تشکیل شده است و بر خلاف سلولهای نورونی، سلولهای گلیا قدرت تقسیم خود را همواره حفظ می کنند، بررسی الگوی مکانی بیان ژن به کمک تکنیک هیبریداسیون درجا و یا تعیین محل حضور پروتئین به کمک تکنیک ایمونوسیتوشیمی اطلاعات تکمیلی با ارزشی را به همراه خواهد داشت.

تقدیر و تشکر

در این تحقیق از کمکها و مساعدتهای آقایان اشرفی، فراز و پوربیرانوند و نیز خانمها جمشیدی، دیداری و ابراهیمی بهره‌مند شده ایم که بدین‌وسیله از زحمات و مساعدتهای این عزیزان سپاسگزاری می شود.کلیه هزینه های این تحقیق از محل بودجه تحقیقاتی مصوب در دانشگاه تربیت مدرس به انجام رسیده است.

References

1. Vaux DL, Strasser A: The molecular biology of apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 1996; 93(6): 2239-2244

2. Li H, Yuan J: Deciphering the pathways of life and death. Curr Opin Cell Biol. 1999; 11(2): 261-266

3. Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD: Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. Science. 1993; 262(5134): 695-700

4. Gordon N: Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. Brain Dev. 1995;17(1):73-77

5. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC: A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med. 1997; 3(8): 917-921

6. Shin S, Sung BJ, Cho YS, Kim HJ, Ha NC, Hwang JI, Chung CW, Jung YK, Oh BH: An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7. Biochemistry. 2001; 40(4): 1117-1123

7. Conway EM, Pollefeyt S, Cornelissen J, DeBaere I, Steiner-Mosonyi M, Ong K, Baens M, Collen D, Schuh AC: Three differentially expressed survivin cDNA variants encode proteins with distinct antiapoptotic functions. Blood. 2000; 95(4): 1435-1442.

۸. نیک پور پروانه، مولی سید جواد، موحدین منصوره: بررسی بیان ژن CatSper در بیضه موش در سنین مختلف رشد. یاخته، ۱۳۸۱ شماره، ۱۵، صفحات ۱۲۵-۱۱۹

9. National Center for Biotechnology Information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov

10. Blast the Mouse Genome: http: //www. ncbi. nlm. nih. gov/ genome/ seq/ MmBlast. html

11. Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T: Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96(4): 1457-1462

12. Reed JC: The Survivin saga goes in vivo. J Clin Invest. 2001; 108(7): 965-969

13. Lossi L, Merighi A: In vivo cellular and olecular mechanisms of neuronal apoptosis in the mammalian CNS. Prog Neurobiol. 2003 69(5): 287-312

14. Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. Cancer Res. 1999; 59(24): 6097-6102

15. Krieg A, Mahotka C, Krieg T, Grabsch H, Muller W, Takeno S, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: Expression of different survivin variants in gastric carcinomas: first clues to a role of survivin-2B in tumour progression. Br J Cancer. 2002; 86(5): 737-743

16. Mahotka C, Krieg T, Krieg A, Wenzel M, Suschek CV, Heydthausen M, Gabbert HE, Gerharz CD: Distinct in vivo expression patterns of survivin splice variants in renal cell carcinomas. Int J Cancer. 2002; 100(1):30-36

17. Mahotka C, Liebmann J, Wenzel M, Suschek CV, Schmitt M, Gabbert HE, Gerharz CD: Differential subcellular localization of functionally divergent survivin splice variants. Cell Death Differ. 2002; 9(12): 1334-1342

18. Sasaki T, Lopes MB, Hankins GR, Helm GA: Expression of survivin, an inhibitor of apoptosis protein, in tumors of the nervous system. Acta Neuropathol (Berl). 2002; 104(1): 105-109

19. Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K: Expression of survivin in astrocytic tumors: correlation with malignant grade and prognosis. Cancer. 2003; 97(4): 1077-1083

20. Chakravarti A, Noll E, Black PM, Finkelstein DF, Finkelstein DM, Dyson NJ, Loeffler JS: Quantitatively determined survivin expression levels are of prognostic value in human gliomas. J Clin Oncol. 2002; 20(4): 1063-1068

21. Katoh M, Wilmotte R, Belkouch MC, de Tribolet N, Pizzolato G, Dietrich PY: Survivin in brain tumors: an attractive target for immunotherapy. J Neurooncol. 2003; 64(1-2): 71-76

غنی‌سازی سلولهای دندریتیک دست نخورده خون محیطی به روش بید مغناطیسی متصل به آنتی‌بادی

نادره نادری M.Sc. ☆، علی‌اکبر پورفتح‌الله Ph.D. ☆☆، پکامران علی مقدم M.D. ☆، اردشیر قوام‌زاده M.D. ☆، محمد مؤذنی Ph.D. ☆☆

☆دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

☆ سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات

☆ دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی

آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

پست الکترونیک: Email: Moazzeni@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۴/۲۴

* **هدف:** جدا سازی سلولهای دندریتیک (DCs) خون محیطی به صورت دست نخورده (Intact Peripheral Blood Dendritic Cells) با استفاده از روش انتخاب منفی (Negative Selection) به کمک روش روزت و Immunomagnetic depletion

* **مواد و روشها:** در ابتدا سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول جدا شده و لنفوسیتهای T با اتصال به گلبولهای قرمز گوسفند تیمار شده با AET حذف گردیدند. سلولهای دارای شاخص‌های رده‌ایی (Lineage Marker) با استفاده آنتی‌بادیهای مونوکلونال (mAbs) اختصاصی ضدشاخص‌های رده‌ایی CD3, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD56 و بیدهای مغناطیسی واجد anti-mouse IgG از سلولهای باقیمانده خارج شدند. درصد خلوص سلولهای دندریتیک به دست آمده با دو خصوصیت عدم حضور شاخص‌های رده‌ایی و حضور آنتی‌ژن HLA-DR، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر اندازه‌گیری شد.

* **نتایج:** نتایج به دست آمده از بررسی‌های فلوسیتو متری نشان می‌دهد که جمعیت قابل توجهی (۴/۵درصد±۵۸/۵درصد) از سلولهای جدا شده قادر به واکنش با mAbهای ضد شاخصهای رده‌ایی نیستند ولی آنتی ژن HLA-DR را ابراز می‌کنند.

* **نتیجه گیری:** روش Immunomagnetic depletion روشی جدید برای جداسازی DCs است که برخلاف روش‌های کلاسیک مطرح، قادر به جداسازی DCs به صورت دست نخورده است. این تحقیق، نخستین تحقیق در این زمینه در کشور است و میزان خلوص DCs به دست آمده در این بررسی مشابه مطالعات خارجی است. غنی‌سازی بالای DCs دست نخورده، راه مطالعه در مورد عملکرد طبیعی DCs در زمینه‌های مختلف اتوایمنی، سرطان‌ها و بیماری‌های عفونی را هموار می‌نماید.

گل واژگان: سلولهای دندریتیک خون محیطی، انتخاب منفی، بید مغناطیسی متصل به آنتی‌بادی

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۹۶-۹۱

مقدمه

سلولهای عرضه کننده آنتی ژن(antigen presenting cells) (APC) با اتصال به لنفوسیت T، عرضهٔ آنتی‌ژن و ارسال پیامهای ثانویه سبب تحریک لنفوسیت T می‌شوند. در بین APC های حرفه‌ای DCs دارای قدرت انحصاری در ایجاد پاسخ اولیه در لنفوسیت T باکره هستند (۱). سلولهای DC انسان برخلاف DC موش فاقد شاخص رده‌ایی خاص بوده و از پیش‌سازهای $CD34^+$ در مغز استخوان مشتق می‌شوند. این سلولها از طریق گردش خون به سایر بافت‌های بدن منجمله بافت‌های لنفاوی ثانویه رفته و در آنجا بالغ می‌گردند (۱، ۲، ۳). در انسان خون محیطی منبع نسبتاً مناسبی برای جدا کردن DCs است ولی تعداد بسیار کم این سلولها که در مقالات مختلف بین حداقل۰/۵درصد تا حداکثر ۲/۶ درصد سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی (MNC) گزارش شده (۴، ۵، ۶) و فقدان شاخص رده‌ایی مشخص، جداسازی این سلولها را به روندی پیچیده تبدیل ساخته است. DCهای موجود در خون محیطی به علت فقدان مولکول CD ۸۳ و ابراز کم مولکولهای چسبان و هم تحریکی مانند CD۸۰، CD۸۶، CD۴۰ نابالغ محسوب می‌شوند (۶). این سلولها به دو زیر گروه لنفوئیدی ($HLA\text{-}DR^+, CD11c^-, CD2^-, CD33^{Dim}$) و میلوئیدی ($HLA\text{-}DR^+, CD11c^+, CD2^+, CD33^{Bright}$) تقسیم شده (۶، ۷)

که دو زیر گروه مذکور از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، تکوینی و عملکردی با هم تفاوت دارند (۸) هر کدام از زیر گروههای مذکور به صورتی متفاوت سبب القا پاسخ ایمنی یا تولرانس در زیرگروههای Th2,Th1 شده و به تبع آن نوع متفاوتی از پاسخ ایمنی را آغاز یا خاموش می‌کنند (۲، ۶، ۹).

نظر به اهمیت DCs در القا ادامه، تنظیم و تعیین نوع پاسخ ایمنی و اهمیت روز افزون سلولهای DCs در تومور تراپی (۱۰، ۱۱، ۱۲)، درمان آلرژی (۱۳)، اتوایمنی[1] (۱۴) و واکسیناسیون علیه عوامل عفونی (۱۵، ۱۶، ۱۷) سهم عظیمی از مطالعات در سالهای اخیر به شناخت بیشتر عملکرد DCs اختصاص یافته است (۱). در کشور ما تاکنون در زمینهٔ DCs انسان مطالعه نشده است. جداسازی سلول دندریتیک اولین گام در جهت شروع تحقیقات در این زمینه است.

در تمام روشهای کلاسیک جداسازی DCs، از کشت in vitro به مدت حداقل ۱۶ ساعت استفاده می‌شود. در ادامه با استفاده از کاهش خاصیت چسبندگی و دانسیتی سلولهای دندریتیک جدا می‌گردند. از جمله می توان به تحقیقات Van Voorhis و همکاران در جداسازی DCs با روش چسبندگی به سطوح پلاستیکی و Xu و همکاران با روش کاهش دانسیتی اشاره کرد (۱۸، ۱۹). ولیکن تحقیقات انجام شده براساس این روش به علت القاء بلوغ و ایجاد تغییر در عملکرد و فنوتیپ DCs قادر به گزارش خصوصیات واقعی DCs موجود در خون نیستند (۱۸).

در تحقیقات جدید برای خالص سازی PBDCs به صورت دست نخورده روش انتخاب منفی DSc ابداع شد که همهٔ سلولها به جز DCs با روشهای مختلف از محیط حذف می‌شوند، برای مثال در روش O'Doherty و همکاران، لنفوسیت‌های T با روش روزت و سلولهای واجد FcR با روش mouseγ-globulinPanning حذف شده، سپس سلولهای T, Nk, B و منوسیت از طریق مجاورت باکوکتلی[2] از آنتی‌بادی‌های ضد این سلولها نشان‌دار شده و با روش Panning به سطح پتری‌دیش پوشیده از آنتی بادی علیه IgG موش[3] متصل و در نهایت سلولهای غیرچسبان به عنوان DCs جمع‌آوری می‌شدند (۲۰). از آنجا که روشهای کلاسیک سبب القا بلوغ در DCs می‌گردد، سلولهای جدا شده نماینده واقعی سلولهای دندریتیک خون محیطی نیستند لذا در این تحقیق با استفاده از روش انتخاب منفی به غنی‌سازی سلولهای دندریتیک پرداختیم .

مواد و روشها

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده

آنتی بادیهای منوکلونال موشی برعلیه HLA-CD56, Dr56, DR, (IgG) Cd19 , (iGg2a) CD 16, (IgG1), (IgG2a) CD 14, (IgG1) Cd11b, (IgG1) Cd3 (کنژوگه با FITC) و کنترل ایزوتیپ مربوطه از شرکت IQ product هلند و anti-mouse بزی از نوع F(ab') (کنژوگه با PE) از شرکت Serotec انگلستان تهیه شد.

جداسازی سلولهای تک هسته‌ایی از بافی‌کت[4]

۲۰ نمونه بافی‌کت افراد نرمال و بالغ (۴۰-۲۰) سال از سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. نمونه گیری به صورت در دسترس از اهدا کنندگانی که خون اهدایی آنها به منظور تهیه گلبول قرمز فشرده و پلاکت مورد استفاده قرار می‌گرفت، انجام شد. در مرحله بعد با مصرف حدود ۱۵ میلی‌لیتر بافی‌کت، سلولهای تک هسته‌ایی با سانتریفوژ برروی فایکول (Seromed آلمان) (۶۰۰گرم به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق) جدا گردید (۲۱). به منظور حذف پلاکت‌ها، از سه نوبت شستشوی سلولها با RPMI (Sigma، آمریکا) در ۲۰۰گرم به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد، پلاکت‌ها سبب تشکیل تجمعات سلولی[5] شده و به روند جداسازی DCs آسیب می‌رسانند. در مرحلهٔ آخر سلولهای به‌دست آمده، شمارش شده و درصد سلولهای زنده با استفاده از تریپان بلو (Merck، آلمان) تعیین گردید.

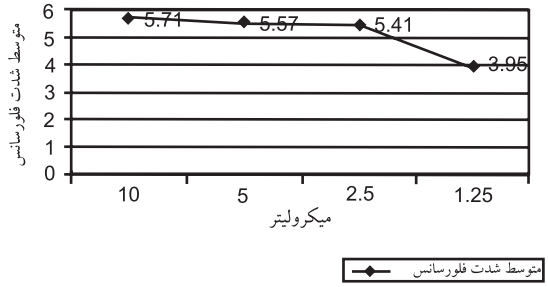
حذف لنفوسیت‌های T با روش روزت

در این مرحله سلولهای T از طریق مجاورت MNC با گلبول قرمز گوسفند تیمار شده (SRBC)[6] تیمار شده با AET[7] (SERVA، آمریکا) و تشکیل روزت حذف گردیدند. SRBC تازه از سازمان انتقال خون ایران خریداری و حداکثر به مدت سه هفته در محلول آلسیویر[8] نگهداری و استفاده شد. جهت تیمار SRBC با AET، سلولهای SRBC با بافر فسفات سالین شستشو شده به نسبت ۴:۱ با محلول AET ۴درصد در آب مقطر، مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با افزودن RPMI حاوی ۱۰درصد FCS (Gibco، آلمان) سوسپانسیون ۴درصد از SRBC تیمار شده تهیه و با نسبت ۱:۱ با سوسپانسیون سلولی (با غلظت ۱×۱۰^{۷} سلول MNC در میلی لیتر) مخلوط شد. آنگاه به میزان ۵۰درصد به آن FCS اضافه گردید. مخلوط سلولها به مدت ۲ ساعت در ۴درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. لنفوسیتهای T موجود در مجموعه سلولهای تک هسته ای با SRBC تیمار شده تشکیل روزت داده (ER^{+}) و در مرحلهٔ بعد با استفاده از فایکول جداسازی شدند.

1. Auto immunity
2. mAbs Cocktail
3. anti-mouse IgG
4. Buffy coat
5. Aggregation
6. Sheep Red Blood Cell
7. S-(2-Aminoethly isothiuronium bromide)
8. Alsevers Solution

تعیین تیتر مناسب آنتی بادیهای مورد استفاده برای تعیین حداقل غلظت اشباع کننده ی آنتی بادیهای منوکلونال ضد شاخصهای رده‌ایی سلولهای غیر DCs آنتی‌بادیهای موشی برعلیه (IgG1) Cd56, (IgG1) Cd19, (IgG2a) Cd14, (IgG1) Cd11b, (IgG1) Cd3, (IgG2a) Cd16

مقادیر ۲/۵،۱/۲۵ ، ۵ و ۱۰ میکرو لیتراز این mAbs به ۱×۱۰^{۶} سلول MNC در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از PBS اضافه شد. در مرحلهٔ بعد به آنها مقادیر مساوی از mouse - anti IGg (۵ میکرولیتر) اضافه و متوسط شدت فلورسانس (MFI)[1] هر یک از تیترها با استفاده از دستگاه فلوسایتو متر تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱: تعیین حداقل غلظت اشباع کننده منوکلونال آنتی بادی ضد CD19 (مارکر اختصاصی لنفوسیتهای B)، با استفاده از آنتی بادی لایه دوم و دستگاه فلوسایتومتر.نشاندار نمودن $۱۰^{۶}$ عدد سلولهای MNC با ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میکرولیتراز منوکلونال آنتی بادی ضد CD19. نمودار نشان دهنده ی افت MFI در تیتر ۱/۲۵ است. حداقل تیتر اشباع کننده مناسب برای CD19 مورد مصرف، ۲/۵ میکرولیتر می‌باشد.

ملاحظهٔ افت ناگهانی MFI در یک تیتر، سبب انتخاب غلظت بالاتر به عنوان تیتر مناسب اشباع کننده می‌گردید (۲۲) (شکل ۲). جهت یکنواخت شدن کار غلظت ۲/۵ میکرولیتر به عنوان حداقل تیتر اشباع کننده همهٔ mAbs انتخاب شد. این روش سبب صرفه‌جوئی در مصرف آنتی بادیهای منوکلونال گران قیمت به میزان یک چهارم گردید.

غنی‌سازی سلولهای دندریتیک با استفاده از روش‌انتخاب منفی

سلولهای تک هسته ای باقی مانده در فاز رویی فایکول (ER^{-}) جمع‌آوری شده و بعد از شستشو، با غلظت اشباع کننده از کوکتل mAbهای خالص غیرکنژوگه (شامل mAbهای ضد CD16 CD56, CD14, CD11b, CD3, CD19) در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و به مدت نیم ساعت مجاور شدند. کوکتل آنتی‌بادی‌های ذکر شده همه از ایزوتیپ IgG بوده و به سلولهای T, B, NK و منوسیت متصل می‌گردند.

دراین مرحله سلولها دوبار با بافر PBS (۰/۱درصد BSA و EDTA2mM) در دمای ۴درجه سانتی‌گراد شستشو شد. در مرحلهٔ بعد از سلولهای حاصله، سوسپانسیون سلولی با غلظت ۲۵×۱۰^{۶} سلول در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس به ازای هر ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مذکور، ۱۷/۵ میکرولیتر از بیدهای واجد Mouse α-IgG در دمای ۴درجه سانتی‌گراد اضافه و به مدت ۱ ساعت مجاور شدند. این مرحله دوبار تکرار شد، به این صورت در کل به ازای هر سلول، ۱۴ عدد بید مصرف شد. پس از پایان انکوباسیون سلولهایی که با mAbهای ضدشاخص‌های رده‌ایی نشاندار شده‌اند، الزاماً به بیدهای واجد anti-IgG (Dynal, Biotech نروژ) متصل و در مرحلهٔ بعد با استفاده از دستگاه Magnet Particle Collector (Dynal, Biotech نروژ) حذف شدند.

سلولهای باقیمانده با آسپیراسیون جدا شده و برای بررسی توسط دستگاه فلوسایتومتر آماده می‌شدند.

آنالیز فلوسایتومتری سلولهای بدست آمده با استفاده از رنگ‌آمیزی دوگانه

در این مرحله با روش فلوسایتومتری، سلولهایی که از نظر بروز آنتی‌ژن HLA-DR مثبت بوده ولی هیچ یک از شاخص‌های مربوط به سلولهای NK, T, B و منوسیت را نداشتند، ($Lin M^{-}$/HLA-DR^{+}) مورد شناسایی و شمارش قرار گرفتند. از آنجا که سلولها قبلاً باآنتی بادی لایه اول، یعنی mAbهای ضدشاخص‌های رده‌ایی پوشانده شده‌اند، به آنها آنتی‌بادی ضد IgG، موشی کنژوگه با PE اضافه شد. بعد از نیم ساعت انکوباسیون در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و شستشوی سلولها، جهت اشغال محل‌های اتصال اضافه آنتی‌بادی لایه دوم، سلولها به مدت ۱۰ دقیقه با سرم ۱۰درصد موش مجاور شدند و پس از یک مرحله شستشو، در مجاورت آنتی‌بادی ضد HLA-DR کنژوگه با FITC قرار گرفتند. بعد از طی مراحل رنگ‌آمیزی، سلولها با پارافرمالدئید ۱درصد فیکس شده و با دستگاه فلوساتیومتر (Partec، دانمارک) آنالیز شدند. برای هر نمونه از کنترل ایزوتیپ مناسب استفاده گردیدودرصد سلولهای $FITC^{+}$-PE^{-} که به منزلهٔ سلولهای DCs واجدHLA-DR و فاقد همهٔ شاخص‌های رده‌ایی بودند تعیین شد.

یافته‌ها

سلولهای دندریتیک دست نخورده با حذف سلولهای T, B, NK و منوسیت با روش روزت و Immunomagentic depletion، غنی سازی شدند. در روش اخیر سلولهایT, B, NK و منوسیت با تیتر اشباع کننده آنتی بادیهای منوکلونال اختصاصی ضد هر یک از این سلولها پوشیده شده وسپس با بیدهای مغناطیسی متصل به anti-mouse، از سوسپانسیون حذف

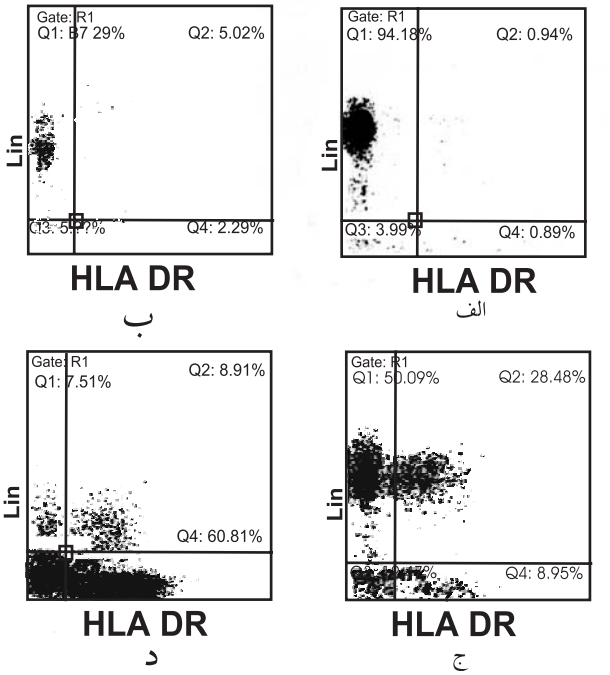
1. Mean Fluorecense Intensity

شدند. سلولهای دندریتیک در مراحل مختلف غنی سازی با آنتی‌بادی ضدHLA-DR موشی (کنژوگه با FITC) و آنتی‌بادی ضد IgG موشی (کنژوگه با PE). رنگ شده و درصد DCs با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر تعیین شد.

فراوانی سلولهای دندریتیک در هر یک از مراحل از غنی سازی در ۵ نمونه بررسی گردیده است (شکل ۲).

فراوانی سلولهای دندریتیک در خون محیطی بسیار کم بوده به صورتی که نتایج به دست آمده از سلولها با استفاده از فلوسایتومتری نشان دهندهٔ حضورکمتر از ۱درصد سلولهای DCs(Lin M$^-$/ HLA-DR$^+$) در مجموعهٔ سلولهای هسته‌دار خون محیطی بود (شکل ۲ الف).

بعد از جداسازی MNC خون محیطی به کمک فایکول فراوانی این سلولها به ۰/۳۵±۲/۵درصد رسید (شکل ۲ ب).



شکل۲: مشاهدهٔ مراحل خالص سازی DCs براساس تعداد Lin M$^-$/HLA-DR$^+$ PBDC در یک نمونه از سلولهای هسته‌دار خون محیطی (الف) سلولهای MNC (ب) سلولهای MNC بعد از حذف لنفوسیتهای T با روش روزت (جمعیت ER$^-$) (ج) سلولهای Lin خالص شده با استفاده از روش انتخاب منفی (د) سلولهای منکور با شاخص‌ای رده‌ایی کنژوگه با PE و HLA-DR کنژوگه با FITC به صورت دوگانه نشاندارد شدند. سلولهای PBDC(Lin M$^-$/HLA-DR$^+$) در ناحیه Q4 نمودار قرار گرفته و فراوانی آنها به صورت درصد نشان داده شده است .کنترل‌های ایزوتیپ مربوطه در شکل نشان داده نشده واعداد نمایندهٔ پنج آزمایش مستقل می‌باشند.

بعد از حذف سلولهای T توسط روش روزت، فراوانی سلولهای Lin M-/HLA-DR+ افزایش یافته و به ۱/۶۳ ±۷/۱۴درصد رسید (شکل ۲ ج).

حذف سلولهای NK, B و منوسیت و لنفوسیتهای T باقیمانده از مرحله قبل با روش Immunomagnetic depletion با نشاندار کردن این سلولها با mAbهای اختصاصی (anti-CD16, anti-CD14, anti-CD3 anti-CD11b, abti-CD56, anti-CD19) حذف آنها توسط بیدهای واجد Mouse-anti IgG متصل به بیدهای مغناطیسی منجر به غنی‌سازی DCs به میزان ۴/۵ ±۵۸/۵ درصد گردید (شکل ۲ د).

بحث

برای جداسازی سلولهای دندریتیک روشهای متفاوتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که به صورت جداگانه یا ترکیبی استفاده شده‌اند. این روشها را می‌توان به ۳ دسته روشهای Adherence depletion و Density-gradient separation و Removal of contamainating cells تقسیم کرد (۱۸).

در روش Adherence depletion از خاصیت چسبندگی افتراقی MNCs به سطوح پلاستیکی استفاده می‌شود (۲۳). پس‌از کشت کوتاه مدت (۹۰-۶۰ دقیقه) به همراه منوسیتها به کف پلیت می‌چسبند، درصورتی‌که سایر MNCs فاقد قدرت چسبندگی بوده و در این زمان می‌توان DCs را به همراه منوسیتها از سلولهای غیرچسبنده جدا کرد. ادامه کشت سلولهای چسبنده به مدت ۱۶ساعت سبب از دست رفتن خاصیت چسبندگی DCs شده و DCs در محیط کشت شناور می‌شوند، در این زمان می‌توان DCs را از منوسیتها جدا کرد. تکرار یک دور دیگر از کشت شبانه سبب حذف بیشتر منوسیتها و غنی‌سازی DC تا حد ۶۰-۲۰درصد می‌شود. جهت حذف منوسیتهایی که به پلت متصل نمی‌شوند می‌توان از بلع ذرات carbonyl iron و سپس آهن ربا استفاده کرد. DCs چون فاقد قدرت فاگوسیتوز هستند از محیط حذف نمی‌شوند (۱۸).

در روش Immunomagnetic depletion منوسیتها به همراه سایر سلولهای واجد شاخص‌های رده ایی اختصاصی با آنتی‌بادیهای منوکلونال و بیدهای anti-IgG نشان‌دار شده وهمزمان با آهن ربا از محیط خارج می‌شوند. سلولهای دندریتیک که با روش Adherence depletion جدا می‌شوند به دلایل زیر معرف واقعی DCs خون محیطی انسان نیستند: الف- سلولهای DC بعد از کشت شبانه بالغ شده، اندازه آنها بزرگتر و زوایید بلندی در سطح DCs آشکار می گردد. ابراز مولکولهای MHC، چسبان و هم تحریکی بر سطح DCs افزایش یافته و قدرت آنها در اتصال و تحریک سلول T شدت می‌یابد (۲۰).

ب - زیر گروه خاصی از DCs انسان در کشت کوتاه مدت دارای خاصیت چسبندگی شدید بوده ولی سایر DCs به کف پلت متصل نشده و تعداد قابل توجهی از آنها همراه با سلولهای غیرچسبنده از محیط حذف می‌شوند (۲۰).

درروش Density-gradient separation دانسیتهٔ DCs بعد