استفاده از روش رادیوایمونواسی برای تعیین غلظت آنتی ژن بر روی سلول های مختلف با یک آنتی بادی مونوکلونال جدید

Archive of SID

نکیسا ضرابی اهرابی[1]، پیام بهرادکیا[2]، محمد شفیعی[2]، دکتر رضا نجفی[2]،
دکتر شیده منتصر کوهساری[1]، دکتر محمدحسین بابائی[2]

[1] واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، [2] بخش رادیوایزوتوپ، سازمان انرژی اتمی ایران، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۸۵/۳/۲۹ ، تاریخ اصلاح: ۸۵/۵/۱۵ ، تاریخ پذیرش: ۸۵/۵/۲٤)

چکیده

مقدمه: اتصال آنتی بادی های مونوکلونال به آنتی ژن های وابسته به تومورها روشی موثر در درمان سرطان می باشد، زیرا این عوامل قادرند بطور اختصاصی این سلول ها را هدف گیری کنند و در واقع به عنوان عاملی موثر برای تشخیص، درجه بندی و مرحله بندی و درمان انواع سرطانها محسوب می گردند.

روش بررسی: در این تحقیق بر علیه سلول های سرطان کولون نوعی آنتی بادی مونوکلونال جدید تهیه شد و غلظت آنتی ژن در سلول های مختلف (گلبول های سفید، رده سلولی HT29، LS180 و MCF7) از طریق روش رادیوایمونواسی با استفاده از پروتئین جی نشاندارشده با ید-۱۲۵ ارزیابی گردید.

یافته ها: نسبت اتصال پروتئین جی نشاندارشده با ید-۱۲۵ به گلبول های سفید(WBC) ، رده سلولی HT29، LS180 و MCF7 به ترتیب برابر ۷/۱، ۹۱/۲، ۷۵/۸ و ٤۰/۲ درصد بدست آمد.

نتیجه گیری: با توجه به اهمیت آنتی بادی های مونوکلونال، لازم است تا روشی موثر برای ارزیابی قابلیت استفاده آنها در تشخیص و درمان انواع سرطان ارائه شود. در روش ارائه شده برای این منظور از مواد رادیواکتیو استفاده شده است که هیچگونه محدودیتی برای شمارش آن وجود ندارد و علاوه بر استفاده کیفی، بصورت کمی نیز می توان از آن استفاده کرد.

واژه های کلیدی : آنتی بادی مونوکلونال، هیبریدوما، تکنیک رادیوایمونواسی، پروتئین جی.

نویسنده مسئول: دکتر محمد حسین بابایی، خیابان کارگر شمالی، سازمان انرژی اتمی ایران، مرکز تحقیقات هسته ای، بخش رادیوایزوتوپ
E-mail: sbabaei@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

آنتی بادی ها توسط دسته ای از لنفوسیت ها به نام سلول های B یا پلاسما سل ها تولید می شوند و هر سلول B پستانداران حاوی ظرفیت تولید یک آنتی بادی است که یک اپی توپ را شناسائی می کند (۱). بر اساس تکنیک جاودانه کردن سلول تکامل یافته تولید کننده آنتی بادی، سلول پلاسما می تواند به طور شگفت انگیز تکثیر یابد. این سلول های جاودان می توانند به خطوط تولید کننده سلولی که آنتی بادی مونوکلونال را می سازند، کلون شوند. تکنولوژی هیبریدومای موش که توسط Kohler و Milstein توصیف شد، مرحله مهمی در رشد تکنولوژی آنتی بادی بود و راه را برای ظهور آنتی بادی های مونوکلونال تشخیصی و درمانی باز کرد (۲). در دهه ۸۰ پژوهش ها بسمت ارزیابی استفاده درون تنی آنتی بادی های مونوکلونال موشی در انسانها هدایت شدند به گونه ای که هدف، هم تصویربرداری و هم درمان بود(۳). هدف گیری عبارت است از هدایت آنتی بادی های مونوکلونال به سمت سلولهای خاص و آنتی بادی های مونوکلونال را میتوان طوری درست کرد که آنزیمها، توکسینها، رادیونوکلیدها، سایتوکاینها یا حتی مولکولهای DNA را به سوی سلولهای هدف ببرند یعنی جائیکه نیمه ی اتصال یافته بتواند اثر خود را اعمال کند (٤). با توجه به کاربرد های ارزشمند و فراوان آنتی بادی های مونوکلونال، باید روشی دقیق و ساده را ارائه کرد تا بر اساس آن بتوان ارزیابی درستی از پتانسیل آنتی بادی های بدست آمده در کاربردهای تشخیصی و درمانی انواع سرطان ها داشته باشیم. در این مقاله برای ارزیابی یک نوع آنتی بادی مونوکلونال جدید علیه سلول های سرطانی روده بزرگ، یک روش ساده بر اساس تکنیک رادیوایمونواسی ارائه شده است که قادر است علاوه بر تشخیص آنتی ژن های توموری در یک رده سلولی، تعداد آنتی ژن های موجود را نیز ارزیابی نماید.

روش بررسی

مواد: رده های سلولی (muose myeloma) SP2/0، (human colon adenocarcinoma) HT29، (human colorectal adenocarcinoma) LS180، (human breast cancer) MCF7 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران بدست آمدند. پروتئین-G و کلرامین-T از شرکت Sigma، سدیم یدید (ید-۱۲۵) از شرکت MDS Nordion Protein G S.A. Fleurus/Belgium، immobilized on Sepharose CL-4B و سفادکس-G25 از شرکت Pharmacia Biotech خریداری شدند.

Archive of SID

تهیه سلولهای هیبریدوما تولید کننده آنتی بادی منوکلونال علیه سلول های HT29 : با استفاده از روش استاندارد، از طریق مصون سازی موش های Balb/C با سلول های HT29، سلول هیبریدومای موشی تولید کننده آنتی بادی منوکلونال علیه این سلول ها تهیه شدند. با رشد سلول های بدست آمده، آنتی بادی مونوکلونال بدست آمد و سپس با روش تغلیظ سازی با سولفات آمونیم اشباع و کروماتوگرافی جذبی پروتئین-G خالص شد (۵). سپس کلاس و زیر کلاس و ثابت جذب (افینیتی) آن بدست آمد (٦).

نشاندارسازی پروتئین-G با ید-۱۲۵: با استفاده از روش کلرامین-T ، پروتئین-G با ید-۱۲۵ نشاندار شد و با کمک ستون سفادکس-G25 و فاز متحرک بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ محتوی ۰/۲ درصد سرم آلبومین گاوی، پروتئین-G نشاندار از ید-۱۲۵ آزاد جدا گردید(۷).

بررسی قابلیت اتصال آنتی بادی مونوکلونال بدست آمده به سلول های مختلف با روش رادیوایمونواسی: در این قسمت از چهار نوع سلول گلبول های سفید (۷)، HT29، LS180 و MCF7 برای ارزیابی آنتی بادی

www.SID.ir

مونوکلونال بدست آمده استفاده شد که مراحل آن به شرح ذیل است (۸):

۱- سلول مورد نظر با غلظت 10^{4} × ٤ سلول در هر چاهک در پلیت های ٢٤ چاهکی رشد داده شدند و بمدت ٢٤ ساعت در انکوباتور دی اکسید کربن قرار داده شدند (برای هر سلول ٦ چاهک در نظر گرفته شد).

۲- محیط کشت موجود در چاهک ها تخلیه شد و هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

۳- برای فیکس کردن سلول ها، به هر چاهک یک میلی لیتر متانول سرد اضافه شد و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی بیست درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

٤- برای هر سلول به سه چاهک آنتی بادی مونوکلونال (با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر) و به چاهک دیگر فقط بافر اضافه شد (بعنوان کنترل منفی) و بمدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

۵- به تمام چاهک ها مقدار ٦۰۰۰۰ شمارش در دقیقه از کمپلکس نشاندار ^{125}I-Protein-G در یک میلی لیتر ریخته شد و بمدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

٦- برای جدا کردن سلول ها از کف چاهک، به هر چاهک ۰/۵ میلی لیتر سود ۰/۱ نرمال اضافه شده و بمدت نیم ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس محتویات هر چاهک به یک لوله منتقل شد و اکتیویته هر چاهک با استفاده از گاما کانتر ید-۱۲۵ شمارش گردید.

۷- درصد اکتیویته متصل به هر سلول از تقسیم اکتیویته میانگین سه چاهک (با توجه به کنترل منفی) بر اکتیویته کل بدست آمد.

بررسی قابلیت اتصال آنتی بادی مونوکلونال بدست آمده به سلول های مختلف با روش آنزیم ایمونواسی:

در این قسمت مانند فوق از چهار نوع سلول گلبول های سفید، HT29، LS180 و MCF7 برای ارزیابی آنتی بادی مونوکلونال بدست آمده استفاده شد که مراحل آن به شرح ذیل است (۷):

Archive of SID

۱- سلول مورد نظر با غلظت 10^{4} × ٤ سلول در هر چاهک در پلیت های ٢٤ چاهکی رشد داده شدند و بمدت ٢٤ ساعت در انکوباتور دی اکسید کربن قرار داده شدند (برای هر سلول ٦ چاهک در نظر گرفته شد).

۲- محیط کشت موجود در چاهک ها تخلیه شد و هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

۳- برای فیکس کردن سلول ها، به هر چاهک یک میلی لیتر متانول سرد اضافه شد و بمدت ۱۰ دقیقه در دمای منفی بیست درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

٤- برای هر سلول به سه چاهک آنتی بادی مونوکلونال (با غلظت ۵ میکروگرم در میلی لیتر) و به چاهک دیگر فقط بافر اضافه شد (بعنوان کنترل منفی) و بمدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

۵- به تمام چاهک ها از آنتی بادی خرگوشی ضد آنتی بادی موش متصل به آنزیم پراکسیداز که بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده رقیق شده بود به مقدار یک میلی لیتر اضافه شد و بمدت ۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس هر چاهک سه بار با بافر فسفات ۰/۰۱ مولار با pH=۷/٤ شسته شد.

www.SID.ir

۶- به تمام چاهک ها سوبسترای آنزیم پراکسیداز (ارتوفنیلن دی آمین OPD) اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه متوقف کننده واکنش اضافه شد و جذب نوری (OD) چاهک ها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزاریدر اندازه گیری شد.

۷- میانگین جذب نوری هر سلول از جذب کنترل منفی آن کسر شد تا جذب نوری هر سلول بدست آید.

یافته ها

آنتی بادی مونوکلونال:

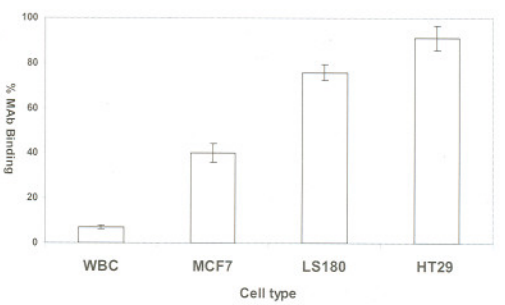
پس از آزمایشات متعدد، سلول هیبریدومای D2 بدست آمد که آنتی بادی مونوکلونال از نوع IgG1 با ثابت ترکیب M^{-1} ۱۰^{9} × ۷/۲ ترشح می کند.

کمپلکس ^{125}I-protein-G :

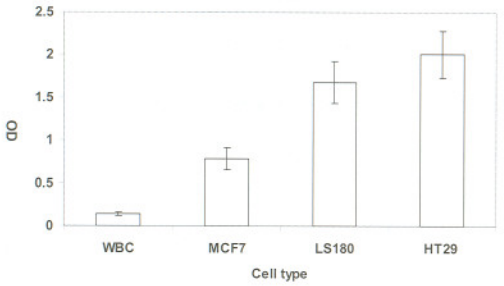
این کمپلکس دارای اکتیویته ویژه ۱۰ mCi/mg و خلوص رادیوشیمیایی بالای ۹۰ درصد بود.

میزان اتصال آنتی بادی به سلول های مختلف:

در شکل ۱ و ۲ میزان اتصال آنتی بادی به سلول های مختلف ذکر شده است که شکل ۱ مربوط به روش رادیوایمونواسی و شکل ۲ مربوط به روش آنزیم ایمونواسی می باشد.



شکل ۱- درصد اتصال آنتی بادی مونوکلونال D2 به سلول های مختلف (n=5)



شکل ۲- جذب نوری (OD) اتصال آنتی بادی مونوکلونال D2 به سلول های مختلف (n=5)

Archive of SID

بحث و نتیجه گیری

ارائه تکنیک تولید آنتی بادی منوکلونال ۳۱ سال پیش توسط Kohler و Milstein باعث ظهور عوامل چندگانه ای شده است که ساختمان یکسان دارند. آنتی بادی ها که در ابتدا بعنوان موشک هدف گیرنده ارائه شده بودند، اکنون خصوصیات هدف گیری و بیولوژیکی پیچیده ای را دارا هستند. توانائی دستکاری ژن های آنتی بادی ها با تکنیک های میکروبیولوژی باعث شده است تا این ساختمان ها دچار تغییرات شگرفی شوند. پروتئین های موشی به آسانی توسط پروتئین های انسانی یا انسانی شده (humanized) جایگزین شده اند که دیگر بعنوان جسم خارجی برای بدن انسان تلقی نمی شوند. بعلاوه، ساختمان جدید آنتی بادی ها، با چندین محل برای شناسائی آنتی ژن، اندازه های مختلف با داشتن قلمروهای فعال کننده (domains effector)، توانائی آنها را برای هدف گیری افزایش داده است. استفاده از آنتی بادی هایی که قادرند سلولهای سرطانی را شناسائی و هدف گیری کنند، راه جدیدی را برای درمان سرطان بازکرده اند. این اثر ضد سرطانی به تنهائی یا با اتصال به رادیونوکلید یا با اتصال به سموم سلولی انجام می شود. بر این اساس لازم است تا روشی ساده، تکرارپذیر و کارا ارائه شود تا با توجه به آن بتوان براحتی ارزیابی صحیح و دقیقی از آنتی بادی های مونوکلونال جدید در اتصال به سلول های مختلف سرطانی بدست آورد (۳).

www.SID.ir

پروتئین A از دیواره سلولی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بدست می آید که وزن ملکولی آن ۴۲ کیلودالتون است (۹). این پروتئین از ناحیه Fc آنتی بادی های کلاسهای مختلف و گونه های مختلف متصل می شود. پروتئین G با وزن ملکولی ۶۰ کیلودالتون یک پروتئین سنتتیک است و دارای خواص بهتری نسبت به پروتئین A می باشد(۱۰). از این دو پروتئین عمدتا برای خالص سازی آنتی بادی ها استفاده می شوند که آنتی بادی با خلوص بسیار بالائی بدست می آید (۱۱). در جدول ۱ میزان اتصال این دو پروتئین به آنتی بادی های موشی مقایسه شده است.

جدول ۱- **میزان اتصال پروتئین A و G به کلاسها و زیرکلاسهای آنتی بادی های موشی**

نوع آنتی بادی	پروتئین A	پروتئین G
IgG_1	±	+
IgG_{2a}	+	+
IgG_{2b}	+	+
IgG_3	+	+
IgM	–	–
IgA	–	–
IgE	–	–

در این مقاله جهت ارزیابی آنتی بادی برای شناسائی آنتی ژن های توموری موجود در سلول های مختلف یک روش ساده رادیوایمونواسی ارائه شده است. این روش قابل مقایسه با روش آنزیمی معمول بوده و علاوه بر سادگی، محدودیتی از نظر شمارش اکتیویته وجود ندارد. در روش آنزیمی با توجه به تداخل آنزیم پراکسیداز داخل سلولی همیشه جواب های مثبت کاذب وجود دارد که این موضوع در روش رادیوایمونواسی وجود ندارد (۷). در روش آنزیمی برای خواندن جذب نوری یک محدوده ۲- ۰ وجود دارد که جواب های بالاتر از ۲ از دقت لازم برخودار نیستند در حالیکه این محدودیت برای روش رادیوایزوتوپی وجود ندارد. روش ارائه شده کاملا قابل مقایسه با روش آنزیمی است مضافا بر اینکه میزان پراکندگی پاسخ ها در مقایسه با روش آنزیمی بسیار کمتر است (انحراف معیار ها در شکل های ۱ و ۲).

Archive of SID

با توجه به گسترش روز افزون تولید آنتی بادی های مونوکلونال برای کاربرد های مختلف تشخیصی و درمانی در مراکز تحقیقاتی کشور، جهت بدست آوردن پاسخ های صحیح و دقیق در کنترل کیفی آنتی بادی های بدست آمده در اتصال به سلول های مختلف، استفاده از روش ارائه شده در این مقاله توصیه می شود. در این روش علاوه بر شناسایی کیفی آنتی ژن های توموری، می توان بطور کمی تعداد آنها را در هر رده سلول مشخص کرد.

منابع

1. Abbas, K., Lichtman, AH, Pober, JS. Cellular and molecular immunology 3rd edn, WB. Saunders Company, USA, 1997; 37.
2. Khler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of redefined specificity. Nature 1975; 256: 495-497.
3. Mehren M, Adams GP, Weiner LM. Monoclona antibody therapy for cancer, Ann. Rev. Med. 2003; 54: 343–369.
4. Payne G. Progress in immunoconjugate cancer therapeutics. Cancer cell 2003; 3: 207- 212.
5. Howard GC, Bethell DR. (eds) Basic methods in antibody production and characterization, Florida. CRC Press, 2001.
6. Badger CC, Krohn, KA, Bernstein ID. In vitro measuremant of avidity of radioiodinated antibodies. Nucl Med Biol. 1987; 14: 605-610.
7. Johnston A, Thrope R. Immunichemistry in practice, 3 rd edn, Blackwell Science, Oxford, 1996.
8. Nassogne M, Baudhuin P, Courtoy PJ. Comparison of antigen contents in co-cultures by an in situ immunoradiometric assay. Biol Cell. 1999; 91: 629-636.
9. Kessler SW. Use of protein-A bearing staphlococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells. Methods Enzymol. 1981; 73: 442 -458.
10. Akerstrom B, Bjorck, LA. physicochemical study of protein G, a molecule with unique immuniglobulin G binding properties. J Biol Chem. 1986; 261: 10240 - 10247.
11. Catty D. Antibodies, a practical approach, IRL Press, Oxford, 1988: 81-104.

www.SID.ir