

روش جدید جستجوی C_3d متصل به گلبول‌های قرمز در جریان فعالیت مکمل

دکتر افشین افشاری* دکتر الیزابت هلم**

Introducing a new method to detect bound C_3d on erythrocytes during complement activation

A. Afshari E. Holme

□ Abstract

Background : Measurement of complement activation products has recently been the popular means of assessing the complement activation.

Objective : To introduce a new method to detect bound C_3d on erythrocytes during complement activation and to compare it with free C_3d levels.

Methods : An indirect ELISA used in routine measurement of free C_3d levels was developed together with the modified ELISA. To capture bound C_3d on erythrocytes, ELISA plate were coated with anti - C_3d and after incubation, blood samples were added for two hours. Bound erythrocytes were lysed with 100 μ l water perwell and the OD were read at 405 nm.

Findings : The levels of free C_3d and bound C_3d on the erythrocytes during complement activation was significantly increased compared to the control (800% and 500% respectively).

Conclusion : Both free C_3d and bound C_3d as final degradation product of C_3d reflect the ongoing complement activation.

Keywords : C_3d , Complement Activation, Erythrocyte

□ چکیده

زمینه : اخیراً اندازه‌گیری محصولات فعالیت مکمل برای بررسی دقیق‌تر فعالیت این سیستم مورد استقبال عمومی قرار گرفته است.

هدف : مطالعه به منظور معرفی روش جدید الیزا برای جستجوی گلبول‌های قرمز حاوی محصولات نهایی سیستم مکمل (C_3d) به منظور تسهیل بررسی دامنه فعالیت سیستم مکمل و مقایسه آن با C_3d آزاد (سرمی) انجام شد.

مواد و روش‌ها : الیزای غیرمستقیم که در اندازه‌گیری رایج C_3d آزاد به کار می‌رود، به همراه روش جدید الیزا برای بررسی اتصال عناصر مکمل به گلبول‌های قرمز مورد استفاده قرار گرفت. میکروپلیت الیزا برای به دام انداختن گلبول‌های قرمز حاوی C_3d ، با آنتی C_3d پوشانده و گلبول‌های قرمز (1×10^8 سلول در میلی‌متر) به مدت ۲ ساعت به آن اضافه شد. پس از شستشو، سلول‌های قرمز مکمل شده توسط ۱۰۰ میکرولیتر آب لیز و میزان رنگ آنها در طول مدت ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.

یافته‌ها : میزان C_3d آزاد و متصل شده بر روی گلبول‌های قرمز در جریان فعال شدن سیستم مکمل به طور چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (به ترتیب ۸ و ۵ برابر کنترل). تمام عوامل مکمل مورد بررسی از جمله فاکتور B و پروپدین روی گلبول‌های قرمز قابل جستجو بودند.

نتیجه‌گیری : میزان C_3d آزاد و نیز C_3d متصل شده به گلبول‌های قرمز می‌تواند منعکس‌کننده فعالیت جاری سیستم مکمل باشد.

کلید واژه‌ها : فعالیت مکمل - گلبول قرمز

□ مقدمه :

علت دقت بیشتر به خصوص در بیماری‌های کمپلکس ایمنی مورد استقبال قرار گرفته است. (۲)

در این مطالعه برای روشن شدن ارتباط فعالیت مکمل با دامنه تولید C3d از کمپلکس‌های تیروگلوبولین و آنتی بادی خرگوش ضد آن استفاده شد و C3d آزاد و متصل به گلبول‌های قرمز با روش جدید بررسی گردید.

□ مواد و روش‌ها :

IgG ضد تیروگلوبولین از سرم ایمنی شده خرگوش (اهدایی خانم دکتر هلم - بیمارستان وسترن گلاسکو انگلستان) توسط روش اسید کاپری لیک (*Sigma*) جداسازی و خلوص آن با ایمنوالکتروفورز امتحان شد.

نقطه اکی‌والانس تشکیل کمپلکس ایمنی تیروگلوبولین با روش پرسی پی تاسیون کمی با اضافه نمودن مقادیر افزایش‌یابنده تیروگلوبولین (*Sigma*) به مقدار ثابت آنتی بادی (۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر آنتی بادی) تعیین گردید (۱۰ میکروگرم تیروگلوبولین و ۱۰۰ میکروگرم *IgG*).

C3d سرمی با روش الیزای غیرمستقیم اندازه‌گیری شد. میکروپلیت‌ها (*Dynatech*) با آنتی‌بادی‌های خرگوش ضد C3d انسانی (*DAKO*)، ۵ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر) به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد پوشانده شد. میکروپلیت‌ها با محلول *PBS* در *Tween (Sigma)* شسته شد و برای

فعالیت بیولوژیک سیستم مکمل که امروزه به خوبی شناخته شده عبارت است از: لیز باکتری‌ها، تقویت فاگوسیتوز، کموتاکسی (آزاد سازی آنافیلاتوکسین‌ها)، جابه‌جایی و تأثیر روی کمپلکس‌های ایمنی و تنظیم تولید ایمونوگلوبولین‌ها. این سیستم شامل حداقل سی گلیکوپروتئین سرمی و جدار سلولی است که فعالیت آن به صورت واکنش‌های آبشاری از طریق دو راه کلاسیک و آلترناتیو بروز می‌کند. (۵)

C3 تقریباً ۱ تا ۲ درصد پروتئین‌های سرم را تشکیل می‌دهد و دارای زنجیره‌های آلفا (*118 KD*) و بتا (*75 KD*) است. زنجیره آلفا محل شکسته شدن C3 و همچنین محلی برای اتصال آن به جداره‌های مختلف است. با شکسته شدن C3، C3a به فاز محیطی آزاد می‌شود و C3b که پیوند تیواستر آن شکوفا شده و در دسترس قرار گرفته است به کمپلکس‌های ایمنی یا جداره سلول‌ها متصل می‌شود. (۷)

فاکتور *I* از عوامل کنترل توسعه فعالیت مکمل است که C3b را به نوع غیر فعال آن تبدیل می‌کند (*iC3b*). پروتولیز *iC3b* به C3c و سپس به C3d نیز از طریق فاکتور *I* و احتمالاً پلاسمین صورت می‌گیرد. (۵)

C3d یکی از محصول‌های مشخص‌کننده فعال شدن مکمل است که هم به صورت آزاد و هم به صورت متصل به گلبول‌های قرمز در سرم دیده می‌شود. (۸)

علی‌رغم وجود روش‌های متعدد بررسی فعالیت این سیستم، اخیراً اندازه‌گیری محصول‌های مکمل به

حرارت اتاق نگهداری شد تا واکنش صورت گیرد ، سپس به طور مکرر و گسترده در PBS دیالیز شد.

برای تعیین C3، پروپرین و فاکتور B متصل شده به گلبول‌های قرمز ، پلیت‌های الیزا به ترتیب با آنتی‌بادی‌های ضد C3 ، ضد پروپرین و فاکتور B (۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر ، Incstar) پوشانده شد و پس از ۱۲ ساعت نگهداری در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد با PBS - Tween شسته و برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی با سرم گاوی ۱ درصد در PBS بلوکه شد.

گلبول‌های قرمز از یک نمونه خونی فعال شده توسط کمپلکس‌های ایمنی تیروگلوبولین یا نمونه خون غیر فعال شده ، شسته شد و به میزان 10^8 سلول در هر میلی‌لیتر در محلول آلبومین گاوی ۱ درصد بازسازی و استاندارد گردید. برای استاندارد کردن گلبول‌های قرمز ۰/۱ میلی‌لیتر از آنها را که از حجم مشخصی برداشته شده بودند به ۲/۹ میلی‌لیتر آب اضافه و میزان رنگ سلول‌های لیز شده در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد و سپس طبق فرمول زیر حجم کلی گلبول‌های قرمز تنظیم گردید :

$$\frac{0.327 \times \text{حجم اولیه}}{\text{میزان رنگ}} = \text{حجم مورد نیاز}$$

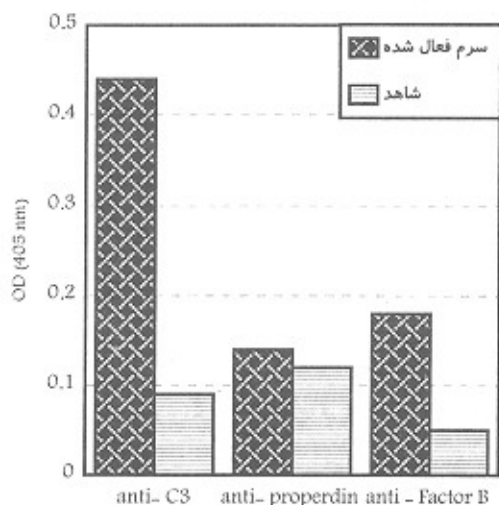
۱۰۰ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز استاندارد شده به حفره‌های میکروپلیت اضافه و به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق نگهداری شد. پلیت به آهستگی به وسیله یک پیپت چندکاناله ، در سه نوبت شسته شد تا گلبول‌های متصل نشده خارج شوند. گلبول‌های قرمز ، متصل شده با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آب به هر

جلوگیری از اتصال غیراختصاصی توسط آلبومین گاوی (Sigma) ۱ درصد در محلول نمکی فسفات‌ه (PBS) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر در هر حفره به مدت یک ساعت مسدود گردید. برای تنظیم منحنی استاندارد ، پس از شستن سرم فعال شده توسط کمپلکس‌های ایمنی تیروگلوبولین حاوی C3d ، رقت $\frac{1}{5000}$ محلول ۲۰ میلی‌مول EDTA (Merck) در PBS به میکروپلیت‌ها اضافه شد. نمونه‌های مورد آزمایش نیز به بقیه حفره‌ها اضافه و پس از یک ساعت نگهداری در درجه حرارت اتاق شسته و با محلول $\frac{1}{10000}$ آنتی‌بادی ضد IgG خرگوش (SAPU) که با بیوتین (Sigma) نشان‌دار شده بود ، پوشیده شدند. پس از نیم ساعت پلیت‌ها شسته و ۱۰۰ میکرولیتر Avidin-horseradish Peroxidase (Merck) به حفره‌ها اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه پلیت‌ها شسته و رنگ آن به وسیله O-phenyldiamine (Sigma) ظاهر گردید و واکنش توسط اسید سولفوریک ۴ نرمال متوقف و میزان رنگ (Optical Density) در طول موج ۴۹۰ نانومتر با یک اسپکتروفتومتر خودکار (Dynatech) خوانده شد. برای تهیه IgG نشان‌دار ، IgG در PBS به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. لوله دیالیز Medical International و غلظت آن ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. ۳ میلی‌گرم از استریوتین‌ان هیدروکسی سوکسینامید (Biotin N - Hydroxi - Succinimide , Sigma) حل شده در ۱۰۰ میکرولیتر دی‌متیل فلورامید (Merck) به IgG اضافه و به مدت ۲ ساعت در درجه

ایمنی به نمونه سرم تحریک شده مقدار $C3d$ در مدت ۵ دقیقه به ۵۰ واحد در میلی لیتر، طی ۱۵ دقیقه به ۸۰ واحد در میلی لیتر و طی ۳۰ دقیقه به ۶۰ واحد در میلی لیتر رسید.

تمام عوامل مکمل مانند $C3$ ، پروپدرین و فاکتور B روی گلبول های قرمز در مقایسه با کنترل (سرم تحریک نشده) قابل تجسس بودند (نمودار شماره ۱).

گلبول های قرمز حاوی $C3$ ، پروپدرین و فاکتور B در دو گروه



$C3d$ متصل به گلبول های قرمز نیز توسط روش الیزا در مقایسه با کنترل قابل تجسس بود ($P < 0.05$). دقت اندازه گیری $C3d$ متصل شده به گلبول های قرمز ۱۷ درصد (۶ آزمون) و پایایی آن ۲۳ درصد (۵ آزمون) محاسبه شد. حداکثر اتصال با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر آنتی بادی ضد $C3d$ مشاهده گردید (۷۸ درصد بیش از کنترل) (نمودار شماره ۲).

حفره لیز شدند و میزان رنگ آنها در ۴۰۵ نانومتر با یک اسپکتروفتومتر خودکار (Dynatech) خوانده شد.

برای بررسی $C3d$ متصل شده به گلبول های قرمز میکروپلیت ها با آنتی بادی خرگوش ضد $C3d$ انسانی (Dakopatt) از ۰/۶۲۵ میکروگرم تا ۸۰ میکروگرم در بافر کربنات سدیم ($PH = 9/6$) به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتی گراد پوشانده شد.

گلبول های قرمز در خون فعال شده یا فعال نشده به شرحی که گفته شد به پلیت ها اضافه گردید و میزان رنگ گلبول های متصل شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر به شرح فوق خوانده شد. دقت و پایایی اندازه گیری $C3d$ متصل شده به گلبول های قرمز نیز تعیین گردید.

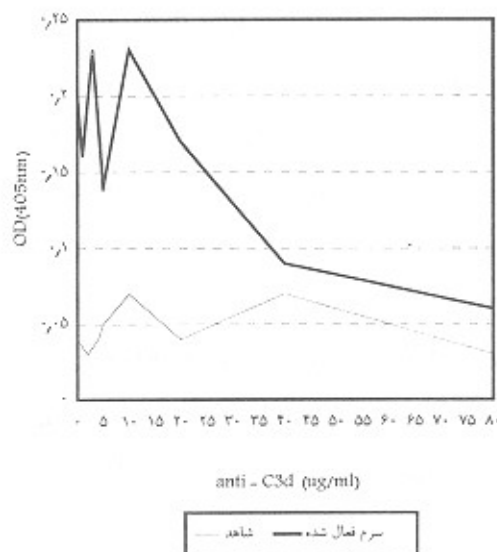
یافته ها :

دقت آزمایش اندازه گیری $C3d$ سرمی ۱۱ درصد (چهار آزمون) و پایایی آن ۲۲ درصد (پنج آزمون در روزهای مختلف) تعیین گردید. کینتیک تشکیل $C3d$ در جریان فعالیت مکمل به وسیله کمپلکس های ایمنی تیروگلوبولین در مدت ۳۰ دقیقه و در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد مطالعه شد. $C3d$ تشکیل شده در سرم فعال در مدت ۵ دقیقه افزایش یافت و طی ۱۵ دقیقه به حداکثر خود یعنی ۹۰ درصد بیشتر از مقدار زمان شروع آزمایش رسید.

مقدار $C3d$ که در زمان شروع ۱۰ واحد در میلی لیتر برای نمونه تحریک شده یا نشده بود، در سرم فعال نشده تغییر قابل ملاحظه ای در زمان نگه داری در ۳۷ درجه سانتی گراد نشان نداد با اضافه کردن کمپلکس

نمودار ۲:

شناسایی گلبول‌های قرمز حاوی C3d توسط مقادیر افزایش‌یابنده آنتی C3d و مقایسه آن با گروه شاهد



مقادیر به دست آمده در طول موج ۴۰۵ نانومتر از سلول‌های به دام افتاده با غلظت آنتی‌بادی ضد C3d هماهنگی نشان دادند ($r=0.72$ و $P<0.02$).

بحث و نتیجه‌گیری:

در این مطالعه میزان آزاد و نیز متصل به گلبول‌های قرمز، هر دو منعکس‌کننده فعالیت سیستم مکمل بودند که می‌توانند برای بررسی دامنه فعالیت این سیستم به کار گرفته شوند.

اندازه‌گیری عناصر فعال شده مکمل C3 و C4 که به طور رایج برای بررسی بیماران مختلف استفاده می‌شود، نمای دقیقی از فعالیت مستمر این سیستم را به دست نمی‌دهد، زیرا افزایش تولید این عناصر برای جبران مصرف آنها در جریان بیماری‌های مختلف

اغلب به صورت طبیعی یا حتی افزایش یافته دیده می‌شود. (۲) بنابراین اندازه‌گیری محصولات فعال شده این سیستم مثل *INH - cl* و *CIs : cl - P - C3b* امکان قضاوت بهتری را فراهم می‌آورد. (۱) مثلاً اندازه‌گیری C3d سرمی که یکی از محصولات نهایی پروتولیز C3b توسط فاکتور I است می‌تواند کمک شایانی بنماید. روش‌های الیزا و راکت ایمنونوآسی برای اندازه‌گیری C3d آزاد استفاده شده است. (۴ و ۶) در جریان فعال شدن مکمل، عناصر فعال شده هم روی سرم و هم بر روی گلبول‌های قرمز جایگزین می‌شوند.

در این مطالعه برای جستجوی C3d متصل شده روشی جدید با استفاده از تکنیک الیزا که تا اندازه‌ای شبیه به تکنیک ELISPOT است (برای جداسازی لنفوسیت‌های B و T استفاده می‌شود) معرفی گردید.

اتصال عناصر مکمل مثل فاکتور B، پروپدین و C3 به گلبول‌های قرمز از طریق کمپلکس‌های ایمنی نشان‌دار شده توسط این عناصر و با واسطه‌گیرنده مکمل شماره ۱ (CR1 و CD35) قابل توضیح است. پایین‌تر بودن دامنه اتصال فاکتور B و پروپدین نسبت به C3 به این دلیل است که این عناصر بیشتر در تشکیل مجموعه C3 کانور تاز راه آلترناتیو شرکت می‌نمایند در حالی که C3 از اجزای اصلی نشان‌دار کردن کمپلکس‌های ایمنی است.

بالا بودن تغییرهای دقت و پایایی اندازه‌گیری C3d متصل به گلبول‌های قرمز می‌تواند به علت سهولت ته‌نشین شدن گلبول‌های قرمز در لوله‌های آزمایش و تغییراتی که در تعداد آنها در هنگام انتقال به حفره‌های

diseases. *Rheumatol Int* 1990 ; 10 : 185-9

3. Davies KA , Savill J , Walport MJ. *In vitro transfer of immune complexes from erythrocytes to monocytes and macrophages. compl Inflamm* 1989 ; 6 : 324

4. Freys dottir J , ormarsdottir S , sigfusson A. *Evaluation of invivo immune complex formation and complement activation in patients receiving intravenous streptokinase. Clin Exp Immunol* 1993 ; 94 : 286-90

5. Law SKA and Reid KBM. *Activation and control of complement system. compl* 1993 ; 9-29

6. Mollnes TE. *Quantification of the C3d split product of human complement by a sensitive enzymelinked immunosorbent assay. Scand J Immunol* 1985 ; 21 : 607-13

7. Whaley K , Loos M and Weiler. *Complement , immune complexes and immune complex diseases , complement in health and disease. 2nd ed , London Dordrecht Boston , 1993 , 199-221*

8. Yokoyama I , Wazman F. *Differential susceptibility of immune complexes to release from erythrocytes by factor I. Mol Immunol* 1994 ; 31 : 227-400

میکروپلیت ایجاد می‌شود ، بیان نمود.

اندازه‌گیری C3d آزاد در بیماران مختلف چندی است که در بخش‌های ایمنویاتولوژی مورد توجه قرار گرفته است. (۴) در مطالعه‌ای بر روی ۱۳ بیمار دچار حمله حاد قلبی که با استرپتوکیناز تحت درمان بودند ، تولید C3d به دنبال مصرف این داروی فعال‌کننده سیستم مکمل از ساعت اول تجویز تا روز هفتم پس از درمان قابل پی‌گیری بود. (۴)

با وجود آن‌که حدود ۱۰ سال از آگاهی ما نسبت به اتصال C3d به گلبول‌های قرمز در جریان فعال شدن سیستم مکمل می‌گذرد و اندازه‌گیری آن به روش فلوسایتومتری (FACSscan) صورت می‌گیرد که مستلزم هزینه زیاد بوده و برای بسیاری از مراکز غیر قابل انجام است ، (۳) استفاده از روش الیزا هزینه ، زمان و تجهیزات کمتری نیاز دارد و با استاندارد شدن این روش می‌توان آن را جای‌گزین مناسبی برای روش فعلی قرار داد.

📖 مراجع :

1. Afshari A , Holme E. *Effect of streptokinase immune complex on activation of the complement and Intreaction with Erythrocytes. J Qazvin Univ of Med. SC* 1999. 11 : 5-12

2. Auda G , Holme ER , Davidson JE et al. *Measurement of complement activation products in patients with chronic rheumatic*