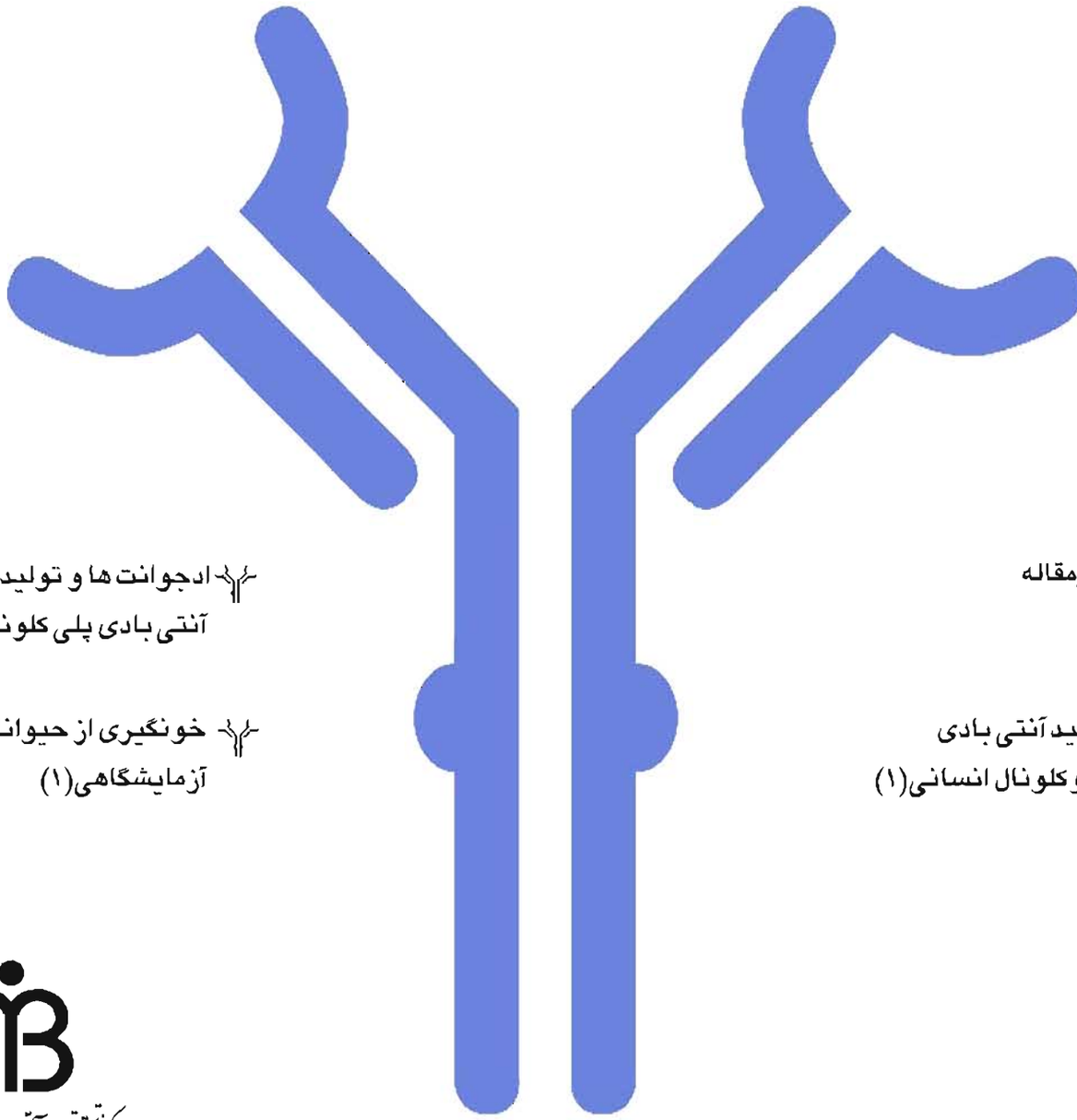
ماهنامه علمی تخصصی

آنتی بادی منوکلونال

سال اول ، شماره ۱۰

دی ماه۱۳۸۲



سرمقاله

ادجوانت ها و تولید آنتی بادی پلی کلونال(۱)

تولید آنتی بادی منوکلونال انسانی(۱)

خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی(۱)

مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال

پژوهشکده ابن سینا

جهاد دانشگاهی

تک شماره - ۱۰ تومان

بسمه تعالی

ماهنامه تخصصی آنتی‌بادی منوکلونال
سال اول، شماره دهم،
دی‌ماه ۱۳۸۲

صاحب امتیاز : پژوهشکده ابن سینا
مدیر مسئول : دکتر محمود جدی تهرانی
سر دبیر : دکتر پونه دوکوهکی
شورای علمی نشریه (به ترتیب حروف الفبا) **:**
دکتر محمد باباشمسی، دکتر رضا بهجتی، علی‌احمد بیات، دکتر محمود جدی تهرانی، دکتر لیلی چمنی، دکتر پونه دوکوهکی، دکتر امیر حسن زرنانی، دکتر فاضل شکری، دکتر محمدرضا صادقی، دکتر علی‌اکبر صبوریراقی، رویا قدس
مدیر داخلی : شمیسه اسکندری
همکاران علمی این شماره: دکتر سهیلاقره‌گزلو
همکاران اجرایی : محمد خوش‌قدم، علی رحیمی، اکرم روزبهانی، ابوالفضل زارع، فاطمه شاکری، مهدی شجاعی‌پور، علی لروند، مژده مظهری، لیلا نورزاده
طراحی جلد : اعظم سلطان‌محمدی
گسترهٔ توزیع : سراسر کشور
ترتیب انتشار : ماهنامه
روش : خبری، آموزشی
این نشریه برای شنیدن هر گونه اظهار نظر، پیشنهاد و انتقاد سازنده اعلام آمادگی می‌نماید. علاقمندان می‌توانند نقطه نظرات خود را به نشانی زیر ارسال نمایند.
تهران: بزرگراه شهید چمران، دانشگاه شهید بهشتی، انتهای بلوار، پژوهشکده ابن‌سینا
تهران: صندوق پستی، ۱۷۷– ۱۹۸۳۵
تلفن: ۲۴۰۲۰۱۱ نمابر: ۲۴۰۳۶۴۱
E-mail: jmab@avesina.ir
Website: http://www.avesina.ir

سرمقاله

دکتر محمود جدی تهرانی

بحول وقوه الهی دهمین شماره ماهنامه آنتی‌بادی منوکلونال با تلاش فراوان و بی‌دریغ دست اندرکاران تقدیم همکاران گرامی می‌گردد.

در سالهای اخیر نه تنها استفاده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال افزایش بسیاری یافته، بلکه نوع استفاده از آنها نیز دچار تحولاتی گردیده است و بعد استفادهٔ درمانی از این آنتی‌بادیها روزبروز وسیعتر می‌گردد. بدنبال این گسترش، بعد بیوانفورماتیک آن نیز در حال توسعه بوده و سایتهای اینترنتی متعددی با هدف معرفی و نحوهٔ استفاده از این آنتی‌بادیها ایجاد گردیده و بطور روزمره در حال ایجاد می‌باشند. یکی از این سایتها که در شماره‌های قبلی نیز حضور همکاران گرامی معرفی گردید و از طریق سایت Biocompare نیز می‌توان به آن دست یافت (www.biocompare.com/psearch.asp?antibody=y) می‌باشد.

سایت فوق اطلاعات مربوط به بیش از ۷۵۰۰۰ آنتی‌بادی تجاری موجود در جهان را براساس نوع آنتی‌ژن، نوع واکنش، حیوان میزبان، نوع کونژوگه، نوع ایزوتیپ و یا حتی بر اساس حروف الفبای نام آنتی‌ژن‌های مربوطه طبقه‌بندی نموده و بدون نیاز به ثبت نام و مجاناً در اختیار مراجعین به سایت قرار داده‌است. نظر به اهمیت وجود این سایت لازم دیدم که مجدداً آدرس و برخی خصوصیات آن را در اختیار همکاران قرار دهم. انشاء ا... در شماره‌های بعد نیز از ابعاد بیوانفورماتیک مربوط به آنتی‌بادی مطالبی تقدیم خواهد شد.

در این شماره همچنین مقالات ارزندهٔ همکاران ارجمند در مورد تولید آنتی‌بادی منوکلونال انسانی، روشهای مختلف خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی و نیز نقش ادجوانت‌ها در تولید آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال تقدیم همکاران عزیز می‌گردد.

امید است این مقالات بتوانند در پیشبرد اهداف تحقیقاتی همکاران گرامی مفید واقع شوند. ماهنامهٔ آنتی‌بادی منوکلونال آمادگی خود را جهت درج مطالب علمی مرتبط با موضوع آنتی‌بادیها اعلام نموده و از همکاران گرامی جهت چاپ مطالب علمی دعوت به عمل می‌آورد.

و من ا... التوفیق

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی (قسمت اول)

دکترسهیلا قره‌گزلو

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال (MAbs) امروزه جهت شناسائی طیف وسیعی از مواد بیولوژیک مورد استفاده قرار گرفته و بعنوان یک ابزار ضروری جهت آنالیز ساختمانی و عملی آنها شناخته شده‌اند. معمول‌ترین روش جهت تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، ایمونیزاسیون جوندگان همخون (inbred) با آنتی‌ژنهای مورد مطالعه نظیر سلولهای تومورال انسانی بوده است. این تکنیک یک اشکال بسیار مهم دارد و آن این است که برخی از آنتی‌بادی‌های حاصله بجای آنکه نشانگر ماهیت و ویژگی سلولها یا مولکولهای مربوطه باشد، نمایانگر اختلاف بین سلولهای موش و انسان بطور عام هستند زیرا سیستم ایمنی موش یا رت نسبت به سلولها و مولوکولهای اختصاصی انسان تحمل ندارد و در نتیجه به آنها پاسخ می‌دهد. از طرف دیگر پاسخ سیستم ایمنی انسان به آنتی‌بادیهای موشی نیز مسئله ساز است بطوریکه در استفاده کلینیکی از آنتی‌بادیهای مونوکلونال، انواع مشتق شده از جوندگان ایمونوژنیسیته بالائی برای انسان دارند. پاسخ ایمنی علیه ایمونوگلوبولین‌های (Ig) موش، مانع تداوم استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ویژه گردیده و نیمه عمر این آنتی‌بادیها در سرم بیماران بسیار کوتاه می‌گردد. بنابراین چه برای تحقیقات پایه‌ای و چه مصارف کلینیکی، توانائی و امکان تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال انسانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. بواسطه مشکلات عدیده‌ای که در رابطه با روشهای معمول برای تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال وجود دارد، تعداد آنتی‌بادیهای موجود واجد ارزش کلینیکی نسبتاً کم می‌باشد.

اگر چه کوششهای فراوانی جهت تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال انسانی صورت گرفته است، معهذا برخی از محققین هنوز به جهت انسانی کردن (Humanize) آنتی‌بادیهای موشی با ارزش (برای گریز از پاسخ ایمنی مخرب فرد گیرنده بر علیه گزنو آنتی بادی‌ها)، از روشهای دستکاری ژنتیک یا antibody engineering استفاده می‌کنند که در شماره‌های قبل به تفصیل به آن اشاره شد. با این وجود هنوز دو روش مهم برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال کاملاً انسانی در غالب موارد بکار گرفته می‌شود. این روشها عبارتند از:

۱) فیوژن کلاسیک لنفوسیتهای B انسانی با یک رده سلولی مناسب (نرمال یا ترکیب هتروهیبریدوم).

۲) ترانسفورماسیون با ویروس اپشتاین بار (EBV) به تنهایی یا به همراه فیوژن که بعنوان روش EBV- هیبریدوم اطلاق می‌شود.

۱- منابع لنفوسیتهای اختصاصی برای نامیراسازی

الف- ایمونیزاسیون in-vivo

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال موشی از جهت دسترسی به لنفوسیتهای ایمن (Immune Lymhocytes) با محدودیت مواجه نمی‌باشد. با بهینه سازی روشهای ایمونیزاسیون می‌توان تعداد کافی سلولهای اختصاصی برای فیوژن بدست آورد. اما در مورد انسان این مطلب مصداق ندارد. در این مورد طیف ایمونوژنهای قابل تزریق و نیز روشهای ایمونیزاسیون، به جهت ملاحظات اخلاقی و کلینیکی محدود می‌باشند. بعلاوه منبع لنفوسیت‌های ایمن محدود به خون محیطی بوده که منبع ایده‌الی بشمار نمی‌رود. از طرف دیگر شناخت درستی در رابطه با مرحله تمایزی ایده‌ال لنفوسیتها جهت فیوژن وجود ندارد.

امروزه منابع انسانی برای دستیابی به سلولهای ایمن شامل افراد دهنده‌ای است که توسط روشهای مصوب و اخلاقی ایمن گردیده یا مبتلا به بیماری شده و یا اینکه سهواً در معرض ایمونوژنها قرار گرفته‌اند. آنتی بادیهای مونوکلونال علیه مولکولهایی نظیر آنتی‌ژن D (Rhesus)، آنتی‌ژنهای HLA و هاپتن‌های مختلف، متعاقب ایمونیزاسیون فعال افراد بدست آمده است. آنتی‌بادیهای ضد برخی از باکتریها و ویروسها با استفاده از لنفوسیت‌های بیمارانی که متبلا به بیماری عفونی گردیده‌اند بدست آمده است. بالاخره لنفوسیت‌های حاصله از دهنده‌های نرمال غیر ایمن و یا افراد مبتلا به بیماری‌های اتوایمن، منجر به تولید اتوآنتی‌بادیهای اختصاصی علیه آنتی‌ژنهای متعدد داخلی و یا سطحی سلول گردیده است. نهایتاً ماحصل روشهای نامیراسازی سلولهای انسان متاثر از وضعیت سیستم ایمنی فرد دهنده، فواصل تزریقات یادآوری و یا مواجه مکرر با آنتی‌ژن و زمان برداشت لنفوسیت‌های ایمن بوده که خود مرحله تمایز و تکثیر و ویژگیهای آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

متاسفانه بدلایل عملی، مطالعات محدودی در رابطه با تعیین زمان برداشت سلولها انجام شده است. مطالعات مقایسه‌ای نشان داده‌اند که بهترین زمان برای برداشت سلولهای خون محیطی ۷-۶ روز، در حالیکه برای طحال ۳ روز پس از تزریق یادآور می‌باشد. بهر حال آنتی‌بادیهای منوکلونالی نیز تولید شده‌اند که لنفوسیت‌های آنها بین ۱ تا ۳ ماه بعد از تزریقات یادآور، برداشت شده‌اند.

ب- ایمونیزاسیون in-vitro

در پی تلاش جهت فائق آمدن بر مشکلات ناشی از نیل به لنفوسیت‌های ایمن مناسب از دهنده‌ها، توجه زیادی به روشهای حساس‌سازی و تقویت سلولهای B اختصاصی معطوف گردید. این روش بطور وسیعی درمورد تولید آنتی‌بادی مونوکلونال موشی کاربرد دارد. ایمونیزاسیون in-vitro لنفوسیت‌های انسان بسیار مشکل تر از معادل موشی آن است. بر اساس نظریه Borrebaeck این مطلب بواسطه آن است که مطالعات انسانی معمولاً در روی خون محیطی انجام می‌گیرد که در آن نسبت‌های نامطلوبی از سلولهای T مهارکننده وسلولهای B وجود دارد و یا سلولهای B گردشی در فازی متوقف (arrest) شده‌اند که نیاز به محرک‌های اضافی جهت القاء

تحریک کلونال ویژه آنتی‌ژن دارند. در حالیکه در موش از سلولهای طحال استفاده می‌شود که نسبت سلولها در آن ایده‌ال است.

امروزه ایمونیزاسیون in-vitro بر روی دهنده‌های seropositive با استفاده از لنفوسیت‌های خون محیطی، طحال و لوزه‌ها با موفقیت انجام شده است. هر چند در رابطه با طحال و لوزه‌ها نتایج بسیار بهتر بوده است.

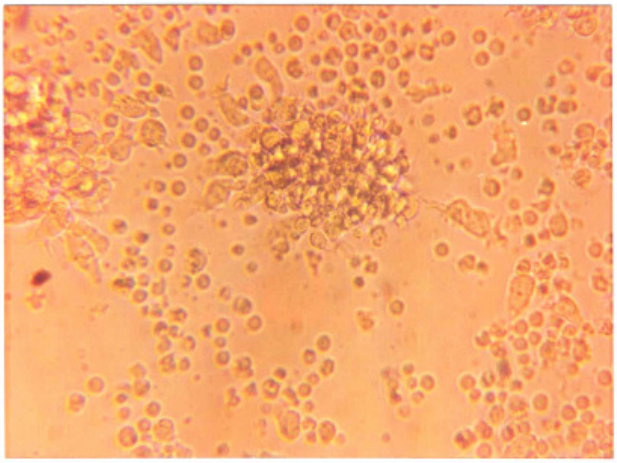
در اکثریت موارد ایمونیزاسیون in-vitro بر روی لنفوسیت‌های حاصل از جداسازی با روش گرادیان غلظت صورت می‌گیرد. در برخی از موارد که از روش نامیراسازی سلولها با EBV استفاده بعمل می‌آید؛ ایمونیزاسیون in-vitro بر روی سلولهای تک‌هسته‌ای خون محیطی که از سلولهای T CD8+ تهی شده‌اند انجام می‌گیرد. جهت تهی‌سازی می‌توان از:

۱- از دانه‌های مغناطیسی پوشیده شده از آنتی‌بادی ضد CD8،
۲- لیز سلولی با آنتی‌بادی مونوکلونال ضد CD8 و کمپلمان،
۳- استرهای متیل(Leucyl- leucine- methyl) استفاده نمود.

تهی‌سازی یا غیر فعال نمودن سلولهای T سیتوتوکسیک در شرایطی که سلولهای تحریک شده تحت تاثیر ترانسفورماسیون با EBV نامیرا خواهند شد؛ توصیه می‌شود. در این مواردااستفاده از سیکلوسپورین A به نحو موثری باعث رشد رده‌های سلولی B که توسط EBV ترانسفورم شده‌اند می‌گردد.

موفقیت روشهای in-vitro متاثر از دوز و احتمالاً فرم ایمونوژن مصرفی می‌باشد. در اکثریت موارد ایمونیزاسیون in-vitro از میتوژنهائی نظیر:

Pokeweed Mitogen (PWM) و نیز فیتوهماگلوتینین A (Phytohaemagglutinin A; PHA) و استافیلوکوکوس اورئوس‌کوآنI (Staphylococus aureus cowan I; SAC) بعنوان محرک لنفوسیت B همراه با آنتی‌ژن اختصاصی استفاده بعمل می‌آید.



سلولهای تک هسته ای خون محیطی بعد از ترانسفورماسیون با EBV

همچنین در برخی از موارد فاکتورهای رشد شامل Lymphocyte- conditioned media مورد استفاده قرار می‌گیرند. مدت زمان ایمونیزاسیون in- vitro متاثر از وضعیت ایمنی فرددهنده و نیز ماهیت محرکهای ایمونوژنیک دارد. بهرحال این زمان از ۳ تا ۷ روز متغیر است.

ج- انتخاب بافت لنفوئید

بر اساس مطالعات انجام شده مشخص گردیده است که همانند موش، سلولهای طحال، لوزه‌ها و غدد لنفاوی در مقایسه با سلولهای خون محیطی اعضای مناسب‌تری جهت استخراج سلولهای ایمن برای فیوژن می‌باشند. بنظر می‌رسد که لنفوسیتهای خون محیطی نه تنها دشوارتر از لنفوسیت‌های سایر اعضاء بصورت in- vitro ایمن می‌شوند بلکه تعداد کمتری رده‌های سلولی ترشح کننده آنتی بادی متعاقب نامیراسازی ایجاد میکنند. این عملکرد ضعیف به فاکتورهای متعددی نسبت داده شده است که بطور خلاصه عبارتند از: تعداد ناکافی سلول‌های B، تعدادناکافی سلولهای خاطره‌ای یا لنفوسیتهای B اختصاصی آنتی‌ژن، ظهور موقتی سلولهای B اختصاصی آنتی‌ژن درخون محیطی متعاقب ایمونیزاسیون، مرحله نامناسب تمایز لنفوسیتهای B، فعالیت میتوتیک ضعیف سلولهای B، تعداد ناکافی سلولهای عرضه‌کننده آنتی‌ژن یا سلولهای T کمکی و نیز تعداد زیاد سلولهای0020T سیتوتوکسیک و حضور سلولهای مهارکننده.

اگر چه خون محیطی بهترین منبع لنفوسیت برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی بشمار نمی‌رود، معهذا بجز موارد اسپلنکتومی و یا تونسیلکتومی به جهت ملاحظات اخلاقی و عملی بعنوان تنها منبع در دسترس محسوب می‌شود.

به جهت غنی‌سازی لنفوسیتهای B خون محیطی روشهای متعددی از قبیل تخلیه سلولهای T سیتوتوکسیک و یا سلولهای مهارکننده در موارد ایمونیزاسیون in- vivo پیشنهاد شده است. غنی‌سازی تعداد لنفوسیتهای B اختصاصی آنتی‌ژن در مواردی که ایمونیزاسیون in- vivo انجام شده است و تعداد سلولهای اختصاصی بسیار کم (۱ در هر یک میلیون یا ۱۰ میلیون لنفوسیت) می‌باشد از طریق انکوباسیون لنفوسیت با آنتی‌ژن و همچنین مخلوط کردن سلولها با آنتی‌ژن نشاندار شده و تفکیک با استفاده از FACS (fluorescence-activated cell sorting) می‌باشد.

انتخاب روش بستگی به نوع سلولهای مصرفی دارد. بطور کلی هنگامی که تعداد زیادی سلول B در دسترس می‌باشد (استفاده از طحال و غدد لنفاوی)، غنی سازی سلولهای B اختصاصی باعث افزایش راندمان فیوژن می‌گردد. زمانی که تعداد کمتری سلول اختصاصی در دسترس است (استفاده ازخون محیطی) روشهای تحریک نقش مهمی در افزایش تعداد کل سلولهای اختصاصی موجود دارد.

ادامه دارد

خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی
(قسمت اول)

دکتر امیرحسن زرنانی

همانگونه که می‌دانیم برای تولید آنتی‌بادیهای منوکلونال یا پلی‌کلونال نیاز به ایمن سازی حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد. از طرف دیگر بررسی تیتر آنتی‌بادی تولید شده، انتخاب حیوان ایمن شده برای انجام فیوژن و در نهایت جمع‌آوری نهایی خون جهت تخلیص آنتی‌بادی همه مستلزم عمل خونگیری می‌باشند. حجم خون مورد نیاز بسته به شرایط موجود ممکن است کم و یا زیاد باشد. با توجه به اینکه در روشهای مختلف خونگیری، حجم خون بدست آمده متفاوت است، لازم است متخصصینی که در این زمینه فعالیت می‌کنند کلیه روشهای خونگیری را بخوبی فرا گیرند.
نمونه خون را می‌توان از مناطق مختلفی از بدن و با تکنیک‌های متفاوت بدست آورد. وریدها، شریانها، سینوس‌ها و قلب از جمله مناطقی هستند که برای خونگیری استفاده می‌شوند. انتخاب روش خونگیری به فاکتورهای مختلفی نظیر: هدف خونگیری، حجم خون مورد نیاز، نیاز به خون سرخرگی یا سیاهرگی، زمان و تعداد دفعات خونگیری بستگی دارد. در حیوانات کوچک خونگیری از برخی از مناطق نظیر ورید ژگولار، به منظور کاهش استرس و درد، پس از بیهوش کردن حیوان انجام می‌شود ولی از حیوانات بزرگتر نظیر گوسفند و بز حتی در صورت نیاز به حجم زیاد خون، خونگیری بدون بیهوشی انجام می‌گیرد. خونگیری در حیوانات آزمایشگاهی کوچک بسته به نیاز و یا عدم نیاز به بیهوشی به سه دسته تقسیم می‌شوند:

۱- خونگیری با بیهوشی
ورید دم ، سینوس چشمی ، ورید ژگولار
۲- خونگیری بدون نیاز به بیهوشی
ورید سافن ، وریدهای پشت پا
۳- **روشهای خونگیری نهایی** (منظور روشهایی هستند که پس از خونگیری کشتن حیوان اجتناب ناپذیر است)
قلب ، عروق زیر بغل ، ورید اجوف تحتانی

تعداد دفعات خونگیری

خونگیری از سینوس چشمی را نباید بیش از یکبار در دو هفته انجام داد. در سایر روشها نظیر خونگیری از دم، عروق پشت پا، سافن، و ورید ژگولار می‌توان خونگیری را به دفعات با فواصل زمانی کوتاه انجام داد.

استفاده از بیهوشی

به منظور کاهش استرس و درد ناشی از خونگیری توصیه می‌شود که در برخی از روشها نظیر خونگیری از دم موشهای بالای ۲۸ روز و خونگیری از سینوس چشمی در تمام سنین، حیوان بیهوش شود. در خونگیری از ورید ژگولار بیهوشی الزامی است. به هنگام خونگیری از ورید سافن یا وریدهای پشت پا، با توجه به درد کم و استرس کمتر نیازی به بیهوشی نیست.

خونگیری استریل

برای تهیه خون به روش استریل می‌توان از سینوس چشمی یا ورید ژگولار خونگیری نمود. باید مراقب بود که خون با موی حیوان تماس پیدا نکند. در مواردی که نیاز به حجم زیاد خون استریل وجود دارد می‌توان از نواحی نظیر قلب یا ورید اجوف تحتانی جهت خونگیری استفاده کرد. منتهی در این روشها کشتن حیوان پس از اتمام خونگیری لازم است.

حجم خون مورد نیاز

به طور متوسط، کل حجم خون یک موش یا رت ۸٪- ۶٪ وزن بدن و یا به عبارت دیگر حدود ۸-۶ میلی‌لیتر به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن بدن است. حیوانات لاغرتر (به علت بالاتر بودن نسبی سطح بدن) بطور نسبی خون بیشتری دارند.
مناطقی نظیر ورید ژگولار، سینوس چشمی یا ورید سافن نسبت به وریدهای پشت پا یا دم خون بیشتری می‌دهند. در روشهای خونگیری نهایی نظیر خونگیری از قلب می‌توان تا ۱-۰/۸ میلی‌لیتر از یک موش خونگیری کرد. در سایر روشهای خونگیری نهایی نظیر خونگیری از وریدهای زیر بغل یا اجوف تحتانی خون کمتری جمع‌آوری می‌شود. یکی دیگر از روشهای خونگیری نهایی بریدن سر حیوان با قیچی یا گیوتین است. با استفاده از این روش از یک رت ۳۰۰ گرمی حدود ۹ میلی‌لیتر، از یک موش ۲۰ گرمی حدود ۰/۶ میلی لیتر و از یک خرگوش ۳/۵ کیلو گرمی حدود ۱۱۵ میلی‌لیتر می‌توان خونگیری کرد.

نکات اساسی در رابطه با حجم خونگیری

۱- به عنوان یک اصل کلی نباید بیش از ۱۰٪ کل حجم خون (یا ۱٪ وزن بدن و یا ۸ میلی‌لیتر به ازای هر کیلوگرم وزن) در فواصل کمتر از ۲ هفته خونگیری کرد. به عنوان مثال حداکثر حجم مجاز خونگیری در فاصله هر دو هفته از یک رت ۳۰۰ گرمی، ۳ میلی‌لیتر، از یک موش ۲۰ گرمی ۰/۲ میلی‌لیتر و از یک خرگوش ۳/۵ کیلوگرمی، ۳۵ میلی‌لیتر است. در صورت نیاز به حجم بالاتر باید خونگیری را در فواصل زمانی مناسب تکرار کرد و یا از یکی از روشهای خونگیری نهایی استفاده نمود.
۲- حجم خون در طی ۲۴ ساعت تامین می‌شود ولی گلبولهای قرمز و سفید در طی دو هفته جایگزین می‌شوند.
۳- خونگیری حداکثر ۱٪ حجم کل خون به صورت روزانه مجاز می‌باشد.

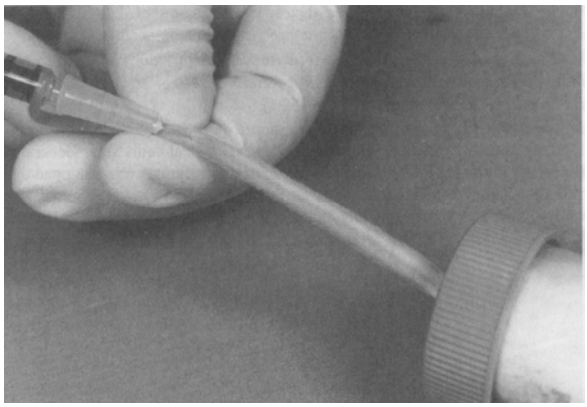
۴-خونگیری ۲۵٪- ۱۵٪ حجم کل خون حیوان سبب افزایش اپی‌نفرین، نوراپی‌نفرین و کورتیکوسترون خون می‌شود.
۵-خونگیری ۲۹٪- ۲۵٪ حجم کل خون سبب کاهش فشار خون، بازده قلب ، خونرسانی به اعضای حیاتی و هیپوکسی، ضعف عضلانی، کاهش سطح هوشیاری و لرز می‌شود. پس از انجام خونگیری، حیوان باید از نظر علائم استرس و کم خونی (تنفس سریع، رنگ پریدگی مخاطات و ضعف عضلانی) و نیز سایر علائم نظیر تروما و عفونت بررسی شود.
برای تهیه آنتی‌بادی منوکلونال از نژادهای مختلف موشهای هم‌خون (Inbred) و برای تهیه آنتی‌بادی پلی‌کلونال از گونه‌هایی نظیر خرگوش، بز، رت و گوسفند استفاده می‌شود در این بحث تکنیک‌های مختلف خونگیری ارائه می‌شود.

خونگیری از موش و رت

الف) خونگیری‌هایی که نیاز به بیهوشی دارند

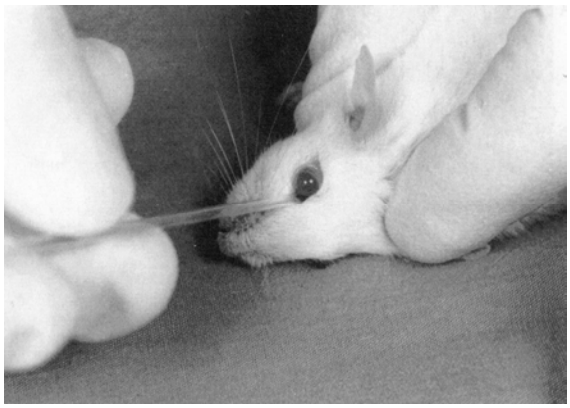
الف- ۱- خونگیری از ورید دمی

حیوان را توسط نگهدارنده (Restrainer) نگه داشته و دم آنرا بمدت یک دقیقه در داخل آب گرم قرار دهید تا عروق دم متسع شوند و بدین ترتیب سیاهرگ دمی بویژه در ناحیه یک سوم میانی دم بخوبی نمایان می‌شود. انتهای دم را با دست چپ گرفته و بکشید و با دست راست، سرسوزن ۲۵G را با یک زاویه بسیار کم (حدود ۱۰ درجه) و به عمق ۴-۳ میلی‌متر وارد رگ نمائید. پیستون سرنگ را با آهستگی عقب بکشید تا خون جریان یابد.(شکل۱)



شکل (۱)

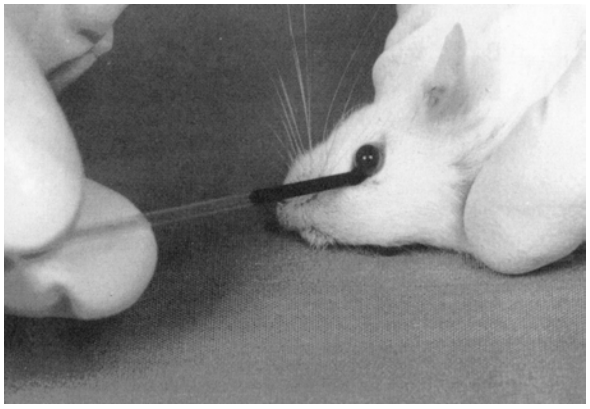
همچنین می‌توان فقط از یک سر سوزن بدون سرنگ استفاده کرد. در این موارد لازم است که خون جریان یافته توسط یک لوله میکروهماتوکریت جمع‌آوری گردد. پس از پایان خونگیری سرسوزن را خارج کرده و با یک تکه پنبه موضع خونگیری را بمدت چند ثانیه فشار دهید تا خون بند آید.
با استفاده از این روش می‌توان از یک رت حدود ۱ میلی‌لیتر و از یک موش حدود ۱۰۰ میکرو لیتر خونگیری کرد. در رت همچنین می‌توان از شریان دم نیز خونگیری نمود. برای اینکار باید پس از بیهوش کردن، رت را به پشت خواباند. شریان دمی در انتهای دم رت قابل مشاهده است منتهی برای برجسته شدن رگ بهتر است جریان خون را بواسطه بستن گارو و یا فشار انگشت در ۵ سانتی‌متری بالای ناحیه خونگیری متوقف کرد. بقیه مراحل مشابه با روش خونگیری از وریدهای دم می‌باشد.



شکل (۲)

الف- ۲- خونگیری از سینوس چشمی

حیوان را توسط یکی از تکنیک‌های رایج بیهوش کنید و آنرا به پهلو بخوابانید. انتهای یک لوله میکروهماتوکریت را زیر پلک بالایی و در گوشه داخلی چشم قرار داده و با حرکت چرخشی لوله هماتوکریت را با آرامی وارد زیر ملتحمه نمائید. به محض وارد شدن لوله به داخل سینوس چشمی خون وارد لوله خواهد شد. (شکل۲و۳) جهت تسهیل



شکل (۳)

جریان خون، انتهای لوله هماتوکریت را پایین‌تر از سطح بدن حیوان قرار دهید. پس از جمع‌آوری حجم مورد نیاز خون، لوله را به آهستگی خارج کرده و پنبه یاگاز را بمدت چندین ثانیه در موضع فشار دهید تا خون بند آید با این تکنیک از یک موش حدود ۳۰۰-۲۰۰ میکرولیتر و از یک رت حدود ۰/۵ تا ۳ میلی‌لیتر می‌توان خونگیری کرد. لازم به ذکر است که در تکنیک مذکور احتمال ایجاد تروما و آسیب چشمی وجود دارد.

ادامه دارد

ادجوانت ها و تولید آنتی بادی پلی‌کلونال (قسمت اول)

دکتر پونه دوکوهکی

تولید آنتی بادی پلی‌کلونال در بدن موجود زنده (in-vivo) و معمولاً در حیواناتی نظیر گوسفند، بز و خرگوش صورت می‌پذیرد و فرآیند بسیار پیچیده‌ای است. پاسخ دهی سیستم ایمنی حیوان به آنتی ژن تزریقی و در نتیجه میزان تولید و نوع آنتی بادی پلی‌کلونال بر علیه آنتی‌ژن مورد نظر در حیوان بستگی به نوع آنتی‌ژن، دوز آنتی‌ژن و نحوه تزریق آن دارد.

یکی از اهداف مهم در زمینه تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال تقویت پاسخهای ایمنی حیوان به حدی است که تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال در مقدار قابل توجه و به مدت طولانی تری پس از ایمونیزاسیون مقدور باشد. استفاده از ادجوانت‌ها در تولید آنتی بادیهای پلی‌کلونال این امکان را می‌دهد که پاسخ ایمنی به یک آنتی ژن خاص سریعتر ایجاد شوند و تیترهای بالایی از آنتی بادی با تمایل اتصال (avidity) بیشتر و مدت طولانی‌تری بدست آید و در نتیجه با دفعات ایمونیزاسیون و دوز آنتی‌ژن کمتری، آنتی‌بادی پلی‌کلونال در مقیاس بالاتری حاصل می‌شود. ادجوانتها قادرند بر تیتر، طول زمان تولید، ایزوتیپ، تمایل (avidity) آنتی‌بادی برای اتصال به آنتی‌ژن و نیز برخی وجوه سیستم ایمنی سلولی که در این امر نقش دارد اثر گذارند. علاوه بر این، در مورد برخی از آنتی ژنها که ایمونوژنهای ضعیفی هستند، استفاده از ادجوانتها ضروری است. این مورد بتازگی اهمیت بیشتری یافته است زیرا در حال حاضر بیشتر از پروتئین‌های نوترکیب و یا subunitهای پروتئینی به عنوان آنتی‌ژن استفاده می‌شود. ادجوانت‌ها در فرآیند تولید آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال با مکانیسمهای مختلفی اثر خود را القاء می‌کنند. آنها به عنوان ذخیره آنتی‌ژن عمل می‌کنند و آنتی‌ژن را با دوزکم ولی بطور مداوم به سیستم ایمنی عرضه می‌دارند. مواجهه طولانی تر سلولهای ایمنی با آنتی ژن، مدت زمان تولید آنتی بادی توسط آنها را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، بسیاری از ادجوانتها محرک یا تعدیل‌کننده عملکرد سلولهای ایمنی هستند و از این طریق نیز می‌توانند بر نحوه پاسخدهی سلولهای ایمنی به آنتی ژن مورد نظر اثر گذارند. ادجوانتها همچنین فاگوسیتوز ماکروفاژها پس از اتصال آنتی ژن به سطح آنها را افزایش می‌دهند.

ادجوانتهای متعددی برای تولید آنتی بادیهای پلی کلونال موجود هستند که غالباً در یکی از گروههای زیر جای می‌گیرند:

۱- **روغنهای معدنی** (مانند Montanides و ادجوانت فروند)

۲- نمکهای آلومینیوم

۳- ساپونین‌ها (مانند Quil A)

۴- اینولین گاما

۵-ادجوانت‌های ترکیبی (مانند ادجوانت کامل فروند، ISCOMs و آلگامولین)

انتخاب ادجوانت مناسب از نظر مقدار و نوع آنتی‌بادی پلی‌کلونال تولید شده و نیز از نظر رعایت سلامت حیوان اهمیت دارد. بسیاری از ادجوانتها اگر چه تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال را بشدت افزایش می‌دهند ولی سبب التهاب، نکروز بافت و درد قابل توجهی در حیوان می‌شوند. همچنین انتخاب ادجوانت مناسب به خصوصیات آنتیژن (سایز ملکولی، بار ملکولی و وجود یا عدم وجود گروه‌های قطبی) و نیز گونه حیوان مورد نظر بستگی دارد. ثابت شده است که برخی ادجوانتها در خرگوش تولید آنتی‌بادی را بشدت افزایش می‌دهند در حالیکه در گوسفند افزایش قابل توجهی ایجاد نمی‌کنند. البته در این گونه موارد خالص(Inbred) بودن حیوان مورد بررسی نیز در نتایج حاصله اثر می‌گذارد.

با وجود آنچه که در بالا ذکر گردید، پروتکل خاصی دربارهٔ انتخاب ادجوانت جهت تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال وجود ندارد و فعلاً انتخاب ادجوانت توسط هر محقق در اغلب موارد یک امر سلیقه‌ای و تجربی (empirical) است. با این وجود توصیه می‌شود که در مورد آنتی‌ژنهایی که در مقادیر زیاد در دسترس هستند و یا کیفیت آنتی‌بادی تولید شده بر علیه آنها خیلی حیاتی نمی‌باشد، ترجیحاً از ادجوانتهای که حداقل آسیب را ایجاد می‌کنند، استفاده شود. در مرحله بعدی اگر پاسخ آنتی‌بادی مناسب نبود، از ادجوانتهای قوی‌تری که التهاب زایی بیشتری نیز دارند استفاده شود. اگر آنتی‌ژن در مقادیر ناچیزی در دسترس می‌باشد و یا خالص سازی آن دشوار می‌باشد بهتر است از همان ابتدا آنتی‌ژن با ادجوانت‌های التهاب زایی مانند ادجوانت کامل فروند که قدرت ایمنی زایی بالایی دارند ترکیب شده و به حیوان تزریق شود. در مورد آنتی‌ژنهایی که وزن ملکولی کمی دارند و یا به عنوان ایمونوژنهای ضعیف شناخته می‌شوند بهتر است از همان ابتدا از ادجوانت‌های قوی استفاده شود.

البته باید توجه داشت که با بکارگیری تمهیداتی می‌توان پاسخ التهابی در نتیجه تلقیح آنتی‌ژن و ادجوانت را کاهش داد که مهمترین این روشها عبارتند از کاهش تعداد مکانهای تلقیح، انتخاب مناسب مکان تلقیح، کاهش حجمی که در هر مکان تلقیح می‌شود، عاری بودن آنتی ژن از هر ماده شیمیایی دیگر و حتی الامکان استریل کردن آنتی‌ژن. همچنین باید توجه داشت که خود آنتی‌ژن بشدت اسیدی یا بشدت بازی نباشد و نیز حیوان مورد نظر کاملاً سالم و عاری از هر بیماری زمینه‌ای باشد. با رعایت کردن موارد فوق می‌توان در عین حال که از ادجوانت قوی برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال در مقادیر مناسب بهره جست، عوارض التهابی تزریق چنین ادجوانتهایی را به حداقل رسانید.

ادامه دارد