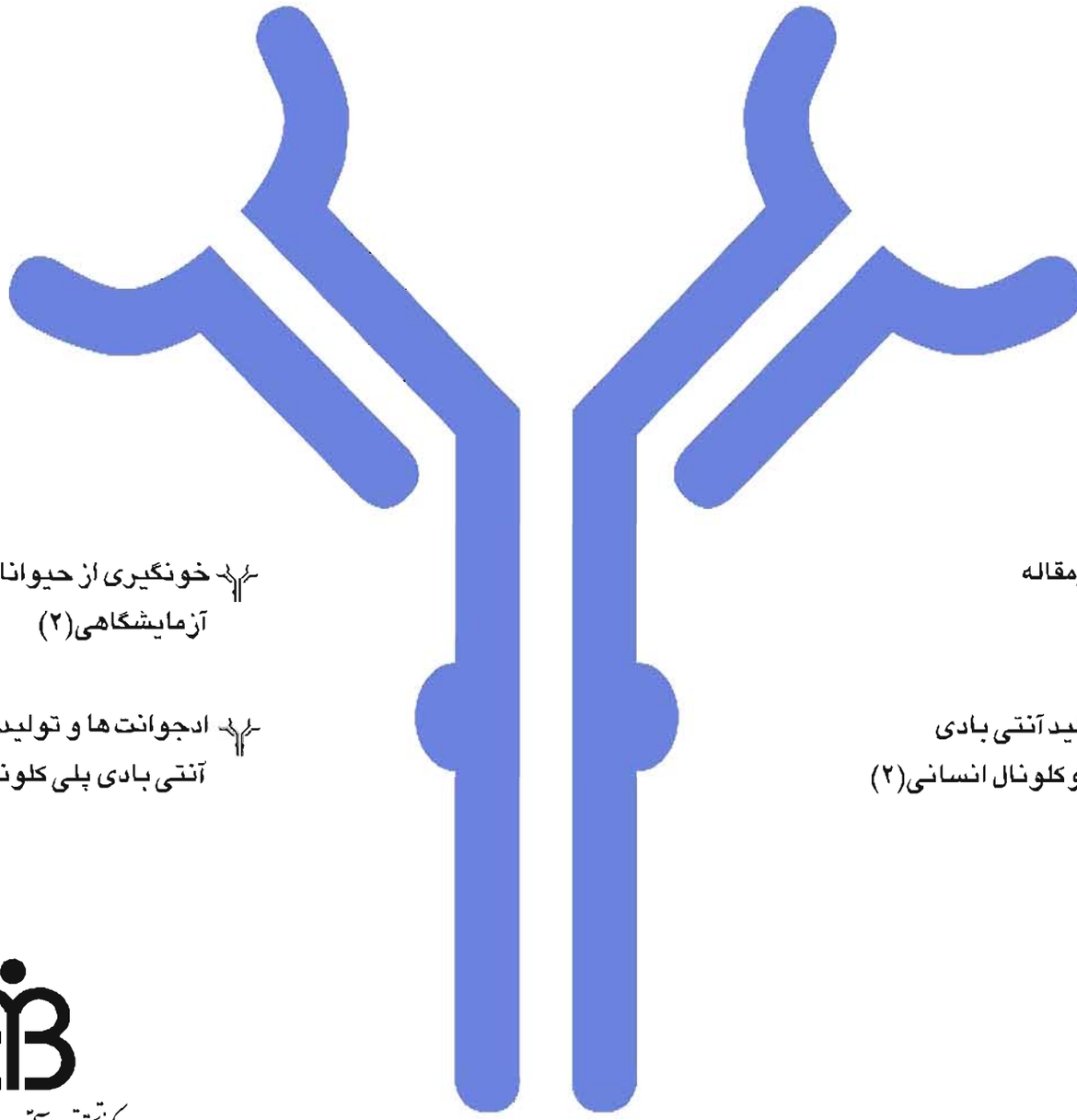
ماهنامه علمی تخصصی

آنتی بادی منوکلونال

سال اول ، شماره ۱۱

بهمن‌ماه۱۳۸۲



سرمقاله

خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی(۲)

تولید آنتی بادی منوکلونال انسانی(۲)

ادجوانت ها و تولید آنتی بادی پلی کلونال(۲)

مرکز تحقیقات آنتی بادی منوکلونال

پژوهشکده ابن سینا

جهاد دانشگاهی

تک شماره - ۱۰ تومان

بسمه تعالی

ماهنامه تخصصی آنتی‌بادی منوکلونال
سال اول، شماره یازدهم،
بهمن‌ماه 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

یازدهمین شمارهٔ آنتی‌بادی منوکلونال به لطف الهی و با تلاش همکاران تقدیم خوانندگان گرامی می‌گردد. در این شماره ادامه مقاله علمی آنتی‌بادی منوکلونال انسانی تقدیم می‌گردد.

با توجه به محدودیتهای بیولوژیک آنتی‌بادیهای حیوانی جهت تزریق به حیوانات دیگر و خصوصاً به انسان از یک سو و استفادهٔ روزافزون درمانی آنتی‌بادیها از سوی دیگر، نیاز مبرمی به تولید آنتی‌بادیهای انسانی دیده می‌شود. در شمارهٔ پیش قسمت اول مقالهٔ تولید آنتی‌بادی منوکلونال انسانی با تاکید بر روشهای تولید آنتی‌بادیهای کاملاً انسانی و نیز نحوهٔ ایمونیزاسیون انسانی با توجه به ملاحظات اخلاقی آن و روشهای ایمونیزاسیون in-vitro مورد بحث قرار گرفت. در این شماره ادامهٔ این مقاله تقدیم همکاران می‌گردد. همچنین با توجه به اینکه از عمده راههای دستیابی به آنتی‌بادیهای تولید شده در بدن حیوانات استفاده از نمونه خون آنها می‌باشد، ادامهٔ بحث مهم خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی به نظر همکاران گرامی خواهد رسید.

بسیاری از آنتی‌ژنهای مورد استفاده در تحقیقات بصورت موردی و در قالب یک پروژهٔ تحقیقاتی خاص مورد استفاده قرار می‌گیرند. لذا در این موارد امکان دستیابی به آنتی‌بادیهای منوکلونال و پلی‌کلونال بصورت تجاری وجود ندارد و یا بسیار گران خواهد بود. در اینگونه موارد، معمولاً محققین خود اقدام به تولید آنتی‌بادی اختصاصی و در مرحلهٔ اول آنتی‌بادی پلی‌کلونال می‌نمایند. در این ارتباط اطلاع از نوع و نحوهٔ عملکرد ادجوانت‌ها می‌تواند در انتخاب نوع ادجوانت و نحوهٔ استفاده از آن بسیار مفید واقع شود. لذا ادامهٔ مقالهٔ " ادجوانت‌ها و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال" به منظور ارائهٔ راهکارهای مناسب جهت تولید اینگونه آنتی‌بادیها تقدیم می‌گردد.

امید است مطالب ارائه شده در این شماره مورد استفادهٔ همکاران ارجمند قرار گیرد.

پیشنهادات و انتقادات شما عزیزان ما را در هر چه بهتر ارائه نمودن این ماهنامه یاری خواهد نمود. همچون گذشته از دانشمندان گرامی دعوت می‌نمایم مقالات علمی خود را در زمینهٔ آنتی‌بادیها جهت چاپ به دفتر این ماهنامه ارسال فرمایند.

و من ا... توفیق

تولید آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی (قسمت دوم)

دکتر سهیلا قره‌گزلو

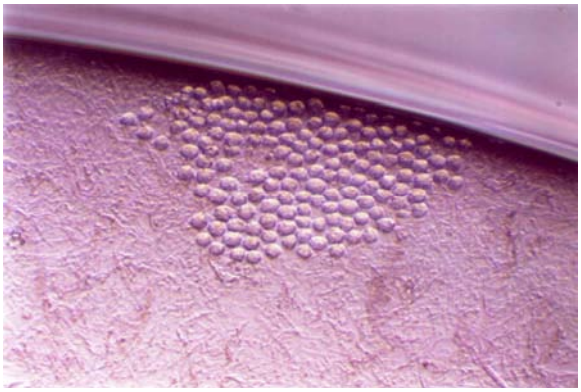
۲- روشهای نامیراسازی سلولهای B انسان

نامیراسازی پروسه‌ای است که در طی آن سلولها توسط یک عامل خارجی تغییر یافته و قادر به تکثیر و همانندسازی نامحدود در شرایط in-vitro می‌گردند. اولین بار Olsson و Kaplan در سال ۱۹۸۰ تولید هیبریدوم‌های انسانی ترشح کننده آنتی‌بادی ضد هاپتن ۲، ۴ دی نیتروفنیل را از طریق فیوژن لنفوسیتهای طحال با یک رده سلول میلوم گزارش کرده‌اند. از آن زمان، فیوژن بعنوان معمول‌ترین روش نامیراسازی باقی‌مانده است. بهرحال امروزه روشهای متعددی برای تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال انسانی از قبیل متدهای تهیه هیبریدوم ترشح کننده اتوآنتی‌بادی بر علیه طیف وسیعی از آنتی‌ژنهای خودی مورد استفاده قرار می‌گیرند. در رابطه با فیوژن علاوه بر مشکل انتخاب بافت لنفوئید، مسئله انتخاب سلول میلومی مناسب نیز مطرح می‌باشد. بر خلاف فیوژن لنفوسیت‌های موشی که در آن می‌توان از میلوم‌های متعددی استفاده نمود در مورد انسان تعداد میلومهای موجود بسیار محدود است. در طی تکامل تکنولوژی تهیه هیبریدوم انسان، سلولهای میلومی متعددی شامل میلومهای انسانی و موشی، لاین‌های سلولی لنفوبلاست حاصل از ترانسفورماسیون با EBV، هیبریدوم‌های بدست آمده از لاین‌های لنفوبلاست و میلوم انسان یا موش و هتروميلوم انسان × موش ایجاد شده‌اند. به هر حال در همه موارد پلی‌اتیلن گلیکول (Poly Ethylene Glycol;PEG) بعنوان عامل ایجاد فیوژن مورد استفاده قرار گرفته است.

الف- فیوژن سلولهای خون محیطی با میلوم مناسب

اگر چه مجموعه لنفوسیت خون محیطی واجد لنفوسیتهای B با ویژگیهای متنوع و متفاوت می‌باشد، معذالک سلولهای B اختصاصی یک آنتی‌ژن خصوصاً در افراد ایمن نشده در خون محیطی به تعداد بسیار پائین بوده و اغلب در حالت استراحت می‌باشند که برای انجام فیوژن موفق مناسب نیستند. فراوانی سلولهای B اختصاصی آنتی‌ژن در لنفوسیتهای خون محیطی انسان بین 10^{-7} تا 10^{-5} تخمین زده شده است که به آنتی‌ژن و وضعیت ایمنی فرد دهنده بستگی دارد. همانگونه که ذکر شد تعداد این لنفوسیتها را در موارد محدودی مانند تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژن D (Rhesus) می‌توان با ایمونیزاسیون افزایش داد ولی بهر حال این روش برای اکثریت آنتی‌ژنها عملی نیست. در موارد دیگر می‌توان از ایمونیزاسیون in-vitro با آنتی‌ژن و نیز تحریک با میتوژن و یا هر دو استفاده نمود. در مورد تحریک میتوژنی، سلولهای تولید شده حاصل تحریک پلی‌کلونال بوده و بنابراین نماینده جمعیت سلولی B فعال شده در in-vitro نمی‌باشند. بهرحال در مورد ایمونیزاسیون in-vitro نیز شمارش کم لنفوسیتهای B اختصاصی آنتی‌ژن همچنان مسئله ساز است و این روش در مورد مولکولهائی که ایمونوژن ضعیف هستند امکان پذیر نمی‌باشد. بهر حال امروزه در برخی از موارد از روش فیوژن مستقیم سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی با یک سلول میلوم مناسب استفاده می‌شود.

سلولهای هیبریدوم انسانی ترشح کننده آنتی بادی مونوکلونال



ب- ترانسفورماسیون لنفوسیتی

لنفوسیتهای B را می‌توان از طریق ترانسفورماسیون با ویروس نامیرا کرد. ترانسفورماسیون پدیده‌ای است که متعاقب آن سلولها از لحاظ مورفولوژی، تکثیر و ساختار ژنتیک تغییر می‌یابند. ویروس مورد استفاده در این تکنیک ویروس ابشتاین‌بار (EBV) بوده و منبع معمول آن سوپرناتانت کشت رده سلولی B95.8 (رده سلولی مارموست) می‌باشد. EBV یک هرپس ویروس می‌باشد که ترجیحاً لنفوسیت‌های B انسان را آلوده کرده و می‌تواند گاهاً به ژنوم وارد شده و باعث ترانسفورماسیون گردد. آلودگی با EBV اکثراً در کودکان رخ داده و بدون نشانه می‌باشد. بالغین آلوده شده با EBV عموماً مبتلا به مونوکلئوزعفونی می‌شوند. در انسان علیرغم پاسخ ایمنی شدید، ویروس بصورت یک آلودگی نهفته (Latent) بدون نشانه باقی می‌ماند. در صورت سرکوب سیستم ایمنی فرد و یا بروز تغییرات ژنتیک وسیع در سلولهای آلوده به ویروس، طیفی از بیماریها همراه با نشانه بروز خواهد کرد. این بیماریها شامل اختلالات لنفوپرولیفراتیو در افرادی که ایمنی آنها سرکوب شده است، بیماری هوچکین، کارسینوم نازوفارنکس و لنفوم بورکیت می‌باشد. گیرنده EBV در روی لنفوسیتهای انسان C3d رسپتور کمپلمان (CR2) یا CD21 بوده که یک گلیکوپروتئین ۱۴۰ کیلو دالتونی می‌باشد و در سطح تمام سلولهای B وجود دارد. ظاهراً EBV می‌تواند به تمام سلولهای B اتصال یافته و در آنها نفوذ کند اما نسبت کمی از آنها ترانسفورم می‌شوند. بطوریکه فقط ۰/۱ تا ۵ درصد از لنفوسیتهای آلوده شده با EBV در جهت ترشح ایمنوگلبولین فعال شده که عمدتاً متعلق به کلاس IgM هستند. اتصال EBV کشته شده به سطح

سلول تحریک، سلولها را القاء می‌کند، همانطور که آنتی‌بادی ضد رسپتور C3d عمل می‌کند و این مطلب نشانگر آن است که تحریک و ترانسفورماسیون به هم مرتبط بوده ولی وقایع جداگانه‌ای هستند.

برخی از محققین پیشنهاد کرده‌اند که جمعیت سلولی پاسخگو، یک جمعیت کوچک در حال استراحت با دانسیته بالا است و گروهی نیز جمعیت حساس را جمعیت سلولهای بزرگ فعال شده می‌دانند. این جمعیت IgM و IgD سطحی ($sIgD^+$ و $sIgM^+$) را بارز کرده و IgM ترشح می‌کنند. از طرف دیگر جمعیت کوچک در حال استراحت تبدیل به جمعیت ترشح کننده IgG و IgA شده که پیش‌ساز آنها $sIgG^+$ یا IgA^+ و $sIgD^-$ هستند.

ظاهراً حساسیت به ترانسفورماسیون بیشتر وابسته به ورود به سیکل سلولی است تا بروز رسپتور EBV. مطلب قابل توجه آن است که برخی از رده‌های سلول ترشح کننده آنتی‌بادی با طول عمر زیاد که از طریق ترانسفورماسیون EBV بدست آمده‌اند، ایزوتیپ IgG و بویژه IgG_1 را ترشح می‌کنند. این قضیه ممکن است بیانگر آن باشد که رده‌های سلولی ترشح کننده IgG در میحط کشت پایدارتر بوده و یا اینکه اساساً منعکس کننده یک سونگری در روشهای انتخاب بوده است.

در افراد ناقل بدون نشانه، EBV بحالت نهفته در لنفوسیتهای B خاطره‌ای در حال استراحت موجود در خون محیطی باقی می‌ماند. این سلولها فاقد مولکول کمک تحریکی B7 (CD80,CD86) در سطح خود بوده و بنابراین از تخریب توسط سیستم ایمنی فرار می‌کنند. تعداد مطلق سلولهای B خون محیطی که با EBV آلوده شده‌اند در سراسر عمر ثابت می‌مانند. از مشکلاتی که در رابطه با ترانسفورماسین با EBV وجود دارد، تحریک موقتی لنفوسیتهای B بدون ترانسفورماسیون متعاقب آن می‌باشد. بعلاوه برخی از رده‌های سلولی فقط یک تا دو ماه قبل از آنکه تیتر آنتی‌بادی افت ناگهانی نماید بخوبی رشد می‌کنند. این افت تیتر در آنتی‌بادی همراه با تغییر مشهود در فنوتیپ سلولی بوده بطوریکه از سلولهای کوچک با شکل نامنظم و بحالت کلامپ، تبدیل به سلولهای بزرگتر، واحد و کروی می‌شوند. اگر چه کلونینگ در مراحل اولیه باعث رهائی لاین‌های ترشح کننده می‌گردد، معهذا کارآئی کلونینگ بسیار پائین است.

ادامه دارد

خونگیری از حیوانات آزمایشگاهی (قسمت دوم)

دکتر امیرحسن زرنانی

۳- خونگیری از ورید ژگولار

یک حلقه سیمی و یا نخی محکم را به یک قطعه گاز وصل کرده و حلقه سیمی را دور دندانهای پیشین حیوان ببندید. تکه گاز را بین دو انگشت اشاره و میانه بگیرید. همزمان پوست ناحیه پشت گردن موش را با دو انگشت شست و اشاره بگیرید. سر را به طرف بالا و عقب و تکه گاز را به سمت عقب بکشید تا گردن کاملاً در وضعیت hyperextend قرار بگیرد. موهای ناحیه پشت گردن را با اسکاپل بتراشید و یا با الکل خیس کنید. در این وضعیت ورید ژگولار به صورت یک خط آبی رنگ در ۴-۲ میلی‌متری کناری ناحیه Sternoclavicular Junction دیده خواهد شد.

با استفاده از سرسوزن ۲۵G و سرنگ یک میلی لیتری، خونگیری کنید. توجه داشته باشید که جهت ورود سوزن از دم به سر (مطابق شکل۳) باشد. سوزن را از ناحیه ۴-۲ میلی‌متری کناری ناحیه مذکور و به عمق ۳-۱ میلی‌متر واردکنید. پیستون سرنگ راجهت جلوگیری از کلاپس شدن رگ خیلی آهسته عقب بکشید. اگر در اولین مرحله موفق نشدید سرسوزن را اندکی بیرون بکشید و مجدداً امتحان کنید.

شکل (۳)

۴- خونگیری از دم با قطع کردن انتهای دم

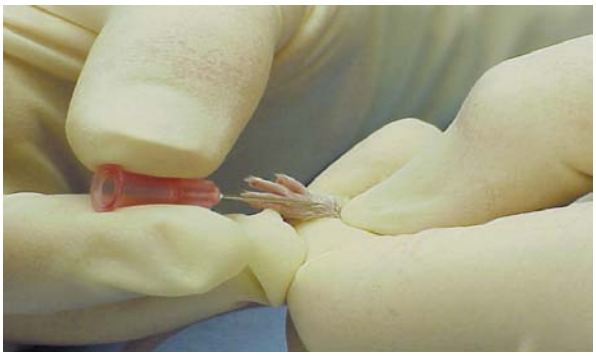
این روش معمولاً مواقعی استفاده می‌شود که نیاز به خونگیری مکرر در حجم کم وجود دارد. برای خونگیری، ۱- ۰/۵ میلی‌متری انتهای دم را توسط قیچی جراحی بریده و خون سرازیر شده را بلافاصله توسط لوله میکروهماتوکریت و یا در یک میکرو تیوب جمع‌آوری نمائید. بلافاصله پس از اتمام خونگیری، توسط یک گاز روی ناحیه خونگیری را پوشانده و فشار دهید. با زدودن لخته ناحیه خونگیری، خونگیری مجدد امکان پذیر است.

ب) خونگیری‌هایی که نیاز به بیهوشی ندارند:

۱- خونگیری از وریدهای پشت پا

موش را با قراردادن یک لامپ روشن بمدت ۵ دقیقه در بالای قفس، گرم کنید و آنرا در درون نگهدارنده ویا فالکون ۵۰ml قرار

دهید، بطوریکه دم و یک پای آن بیرون بماند. با انگشت شست و سبابه پای حیوان را در ناحیه زانو بفشارید (شکل ۴). انگشت شست باید در بالای پا قرار گیرد (مطابق شکل) و بدین ترتیب ورید پشت پا قابل مشاهده خواهد بود. جهت جلوگیری از سرازیرشدن خون بطرف موهای ناحیه، مقداری روغن دور پای حیوان بمالید. با استفاده از یک سر سوزن ۲۵G–۲۷G رگ را سوراخ کرده و خون را توسط لوله میکروهماتوکریت جمع‌آوری نمائید.



شکل (۴)

۲- خونگیری از ورید سافن:

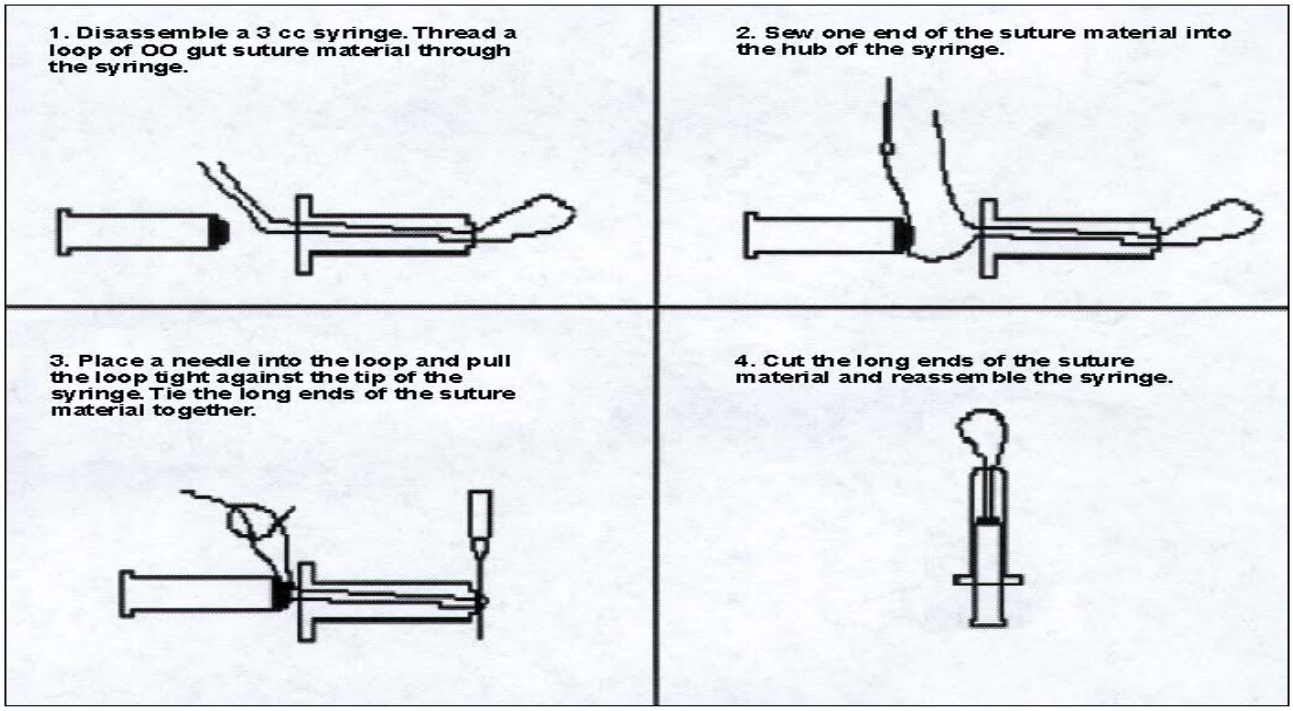
برای اینکار ابتدا موش را بطریق فوق الذکر گرم نمائید و آنرا در نگهدارنده قرار دهید. پوست ناحیه بین دم و ران موش را با دست راست بگیرید و بکشید. ورید سافن در ناحیه پشتی سطح ران قرار گرفته است. با استفاده از یک تیغ بیستوری موهای ناحیه را بتراشید و یا در موضع خونگیری مقداری روغن سدر بمالید. رگ بند (tourniquet) را در قسمت بالای پا ببندید. روش ساخت رگ بند در شکل ۵ آمده است.

با استفاده از یک سر سوزن ۲۵G خونگیری کرده و خون جاری شده را توسط لوله میکروهماتوکریت جمع آوری کنید (شکل ۶).

شکل (۶)

خونگیری از ورید سافن در رت مشابه با موش است. با این تفاوت که بجای نگهدارنده می‌توان حیوان را در یک حوله پیچید بطوریکه پاهای حیوان بیرون باقی بماند (شکل ۷).

شکل (۷)



شکل(۵)

ج) روشهای خونگیری نهایی

۱- خونگیری از ورید اجوف تحتانی (Inferior vena cava)

حیوان را بیهوش کرده و محوطه شکمی آنرا باز کنید. روده‌ها را به سمت چپ و کبد را به سمت بالا برانید از عریض‌ترین ناحیه ورید اجوف تحتانی (بین کلیه‌ها) با استفاده از سر سوزن ۲۵G- ۲۳G و سرنگ ۱ میلی‌لیتری خونگیری کنید. پس از خالی شدن رگ صبر کنید تا رگ مجدداً باخون پر شود و سپس خونگیری را ادامه دهید.

۲- خونگیری از عروق زیر بغل (Axillary vessels)

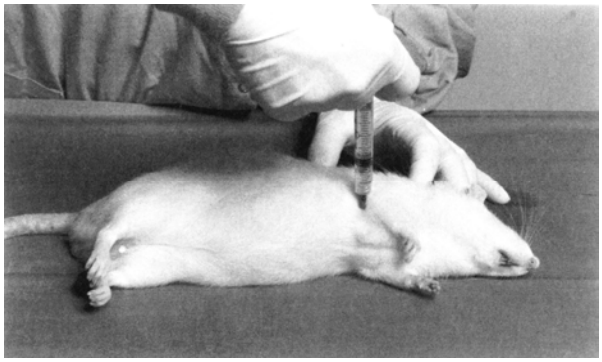
حیوان را بیهوش کرده و به پشت بخوابانید. یکی از دست‌های حیوان را کاملاً کشیده و با سنجاق روی تخته جراحی فیکس کنید. با استفاده از اسکاپل یا قیچی پوست ناحیه زیر بغل را بریده و آنرا به طرف پایین کشیده و با پنس نگه دارید. با استفاده از یک اسکاپل یا قیچی، عروق ناحیه زیر بغل را بریده و خون جاری شده را جمع‌آوری نماید. در این نوع خونگیری مایع بافتی با خون جمع‌آوری شده مخلوط خواهد شد.

۳- خونگیری از قلب

سه گرایش مختلف در خونگیری از قلب موش یا رت وجود دارد:

۱-پوست ناحیه بالای شانه‌های حیوان را با دست راست بگیرید بطوریکه حیوان بالا و پاهای آن پایین قرار گیرد. سرسوزن ۲۲G را از قسمت پایین جناغ سینه به عمق ۱۰-۵ میلی‌متر به طرف چانه حیوان وارد کنید. زاویه سرنگ با سطح قفسهٔ سینه حیوان باید حدود ۳۰-۲۵ درجه باشد.

۲-حیوان را به پهلو خوابانده و سرسوزن را بطور عمود با دیواره قفسهٔ سینه از ناحیه زیر آرنج وارد کنید (شکل ۸).



شکل (۸)

۳-حیوان را به پشت خوابانده و سوزن را به طور عمودی از ناحیه جناغ وارد نمایید.

پیستون سرنگ را بآرامی عقب بکشید تا خون وارد سرنگ شود. از کشیدن ناگهانی پیستون سرنگ خودداری کنید. این عمل موجب کلابس شدن قلب می‌شود. در صورت موفقیت‌آمیز نبودن خونگیری، سرسوزن را بدون خارج کردن آن از پوست، اندکی عقب بکشید و مجدداً خونگیری را با زاویه دیگر تکرار کنید.

پایان

ادجوانت ها و تولید آنتی بادی پلی‌کلونال (قسمت دوم)

دکتر پونه دوکوهکی

ادجوانتهایی که در حال حاضر برای تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال در دسترس می‌باشند به اختصار عبارتند از:

۱- ادجوانت کامل فروند (CFA): این ادجوانت یک روغن معدنی است که از امولسیون آب در روغن ساخته می‌شود. مدتهای مدیدی تنها انتخاب ادجوانت جهت تزریق آنتی‌ژن و تولید آنتی‌بادی پلی‌کلونال این ادجوانت بود. این ادجوانت در حالیکه یک تحریک‌کننده بسیار قوی سیستم ایمنی است عوارض جانبی زیادی از جمله ایجاد آبسه، گرانولوما و نکروز بافتی نیز دارد. مواد تشکیل دهنده آن عبارتند از روغن پارافین، میکوباکتریوم کشته شده و mannide monoleate. در این ترکیب روغن پارافین متابولیزه نمی‌شود و در نتیجه یا از طریق پوست بصورت گرانولوم یا آبسه به بیرون رانده می‌شود و یا توسط ماکروفاژها فاگوسیته می‌شود. مواجهه مکرر با CFA سبب واکنش‌های ازدیاد حساسیت شدید می‌شود. مواجهه تصادفی پرسنل آزمایشگاه با CFA ممکن است به مثبت شدن کاذب تست توبرکولین منجر شود.

۲-ادجوانت ناقص فروند (IFA): این ادجوانت نیز یک روغن معدنی است. از لحاظ مواد تشکیل دهنده شبیه ادجوانت کامل فروند است اما فاقد مایکوباکتریوم کشته شده است و بنابراین واکنش‌های شدیدی ایجاد نمی‌کند. از این ادجوانت در ایمونیزاسیون‌های بوستر (booster immunization) بدنبال تزریق اولیه آنتی‌ژن به همراه ادجوانت کامل استفاده می‌شود. در مواردی که آنتی‌ژن مصرفی یک ایمونوژن قوی هست، می‌توان از این ادجوانت در دفعات اولیه تزریق نیز استفاده کرد.

۳- مونتانیدها(Montanides) یا ادجوانت ناقص سپیک:
این ادجوانت یک روغن معدنی است. در این ترکیب از مانیداولئات (mannide oleate) که ترکیب اصلی سورفاکتانت است استفاده شده است. میزان آنتی‌بادی تولید شده با این ادجوانت مشابه IFA است ولی پاسخهای التهابی کمتری ایجاد می‌کند.

۴- سیستم ادجوانت Ribi(RAS): این ادجوانت یک امولسیون روغن در آب است و حاوی آندوتوکسین سم زدایی شده (detoxified) و دیواره سلولی مایکوباکتریوم در ۲٪ اسکوالین است. فرمولاسیونهای متعدد تجاری از این ادجوانت‌ها در دسترس هستند که موارد استفاده متفاوت دارند. این ادجوانت می‌تواند به عنوان جایگزینی برای ادجوانت کامل فروند باشد و بدلیل ویسکوزیته کمتری که دارد احتمال باقی ماندن آن در بافت و التهاب طولانی

مدت کمتر است. بر خلاف روغن پارافین که در ترکیب CFA بکار رفته است روغن اسکوالین متابولیزه می‌شود و بنابراین واکنش‌های توکسیک کمتری دارد.

۵- تایتر مکس (Titer max): ادجوانت دیگری است که امولسیون روغن در آب است. در این ادجوانت از ذرات بسیار کوچک (Microparticulate) سیلیکا و روغن قابل متابولیزه اسکوالین استفاده شده است. برای تحریک سیستم ایمنی از یک کوپلیمر استفاده شده است که این کوپلیمر به آنتی‌ژن وصل می‌شود و به سلولهای ایمنی در غلظت بسیار زیاد عرضه می‌شود. این ادجوانت با وجود اینکه نتایج قابل مقایسه‌ای با CFA تولید می‌کند ولی سمیت آن کمتر است.

۶- فرمولاسیون ادجوانت سینتکس (Syntax adjuvant formulation): یک امولسیون روغن در آب است و به ازای هر ملکول سورفکتانت در آن از یک بلوک کوپلیمر استفاده شده است. مشتقات مورامیل دی‌پپتید که در این ادجوانت بکار رفته‌اند خاصیت تحریک سیستم ایمنی را دارند. تمام این اجزاء در اسکوالین که یک روغن قابل متابولیزه شدن است قرار گرفته‌اند. دیده شده است که با استفاده از این ادجوانت پاسخ هومورال موش به سمت تولید IgG2a سوق پیدا می‌کند.

۷- نمکهای آلومینیوم: در غالب موارد به عنوان ادجوانت‌هایی برای حمل آنتی‌ژنهای واکسنها و تحریک سیستم ایمنی در مقابل آنها بکار می روند. بطور معمول ادجوانتهایی با قدرت کمتری نسبت به ادجوانت‌های امولسیونی هستند و در نتیجه بهتر است با آنتی‌ژنهایی که شدیداً ایمونوژن هستند بکار روند. در مقایسه با ادجوانتهای امولسیونی واکنش‌های التهابی کمتری ایجاد می‌کنند.

۸- آنتی‌ژن جذب شده به نیتروسلولوز: نیتروسلولز در حالت عادی ملکولی خنثی است و در نتیجه واکنش التهابی ایجاد نمی‌کند. به همین دلیل نیز بسیار کند تخریب و متابولیزه می‌شود و در نتیجه آنتی‌ژن متصل به آن تا مدت طولانی در بدن باقی می‌ماند و کم‌کم آزاد می‌شود. پاسخ ایمونولوژیک قوی مانند CFA ایجاد نمی‌کند ولی برای تزریق آنتی‌ژن جدا شده تنها از یک باند در ژل بسیار مفید می‌باشد. همچنین میتوان پروتئین موجود در باندهای جدا شده در ژل اکریلامید را به همراه ژل به حیوان تزریق کرد.

۹- کمپلکسهای تحریک کننده ایمنی ISCOMs (Immune Stimulating Complexes) :

اینها میسل (Micelle)هایی از کلسترول و ساپونین هستند که اندازه آنها با توجه به نوع آنتی‌ژن و ساختار آن متغیراست. این ادجوانت‌ها پس از تزریق، ساختمانهای پایداری ایجاد میکنند و سریعاً به لنف نودهای موضعی انتقال می‌یابند. بنابراین هم پاسخ‌های سلولی و هم پاسخهای هومورال را تحریک میکنند و به همین دلیل قادرند که تولید آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال را به میزان قابل توجهی افزایش دهند. در ضمن سمیت این ادجوانتها بسیار کمتر از ادجوانت‌هایی است که به همین میزان تولید آنتی‌بادی را افزایش می‌دهند. Quil A و QS-21 از مثالهای این نوع ادجوانت‌ها هستند.

مطالبی که در این شماره و شماره قبل در رابطه با انواع ادجوانتها و مصارف آنها در تولید آنتی‌بادیهای پلی‌کلونال ذکر شد عمدتاً در رابطه با مبانی تئوری و تازه‌های مرتبط با این مبحث بود در حالیکه از لحاظ عملی اولاً تمام انواع ادجوانتها به آسانی در دسترس قرار ندارند و ثانیاً در غالب موارد اصولاً نیازی به کاربرد ادجوانتهای متنوع برای ایجاد پاسخ آنتی‌بادی پلی‌کلونال نمی‌باشد. با این حال آنچه که بصورت عملی در بسیاری از آزمایشگاهها منجمله آزمایشگاه ایمنوشیمی مرکز تحقیقات آنتی‌بادی منوکلونال پژوهشکدهٔ ابن‌سینا در مورد استفاده از ادجوانتها رعایت می‌شود این است که ابتدا برای طراحی پروتکل مناسب جهت دستیابی به آنتی‌بادی پلی‌کلونال مطلوب باید به نوع آنتی‌ژن توجه گردد. بدین ترتیب که با توجه به نوع آنتی‌ژن چه از نظر ساختار و یا وزن مولکولی، پروتکلهای متفاوتی از ایمونیزاسیون بکار می‌رود، اما به طور کلی می‌توان گفت که برای آنتی‌ژنهای پروتئینی بزرگ، تزریق اول به میزان ۱mg از پروتئین برای گوسفند و ۲۵۰ µg برای خرگوش با ادجوانت کامل فروند و تزریقات بعدی (معمولاً چهار تزریق با نصف مقدار آنتی‌ژن در تزریق اول) با ادجوانت ناقص فروند انجام می‌شود. تزریقات به صورت عضلانی حداکثر حجم ۲ml در گوسفند و ۰/۵ml در خرگوش و حداقل در دو نقطه صورت می‌گیرد. فاصلهٔ تزریق اول تا دوم، سه هفته و فواصل بقیه تزریقات دو هفته‌ای می‌باشد. لازم به ذکر است که پاسخ حیوان به آنتی‌ژن مورد نظر از تزریق اول تا پایان تزریقات و افزایش تیتر آنتی‌بادی با آزمون الایزا مورد بررسی قرار می‌گیرد.

پایان

همکاران گرامی در صورت تمایل به چاپ مقالات خود در این نشریه می‌توانند مقالات خود را به آدرس دفتر نشریه ارسال نمایند تا پس از تایید در شورای نشریه، به ترتیب الویت در نشریه به چاپ برسد.