مجله دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
سال ۶۲ ، شماره ۲، صفحات ۸۹ تا ۹۸، (۱۳۸۳)

تهیه و تخلیص IL-2 از محیط کشت سلولهای Jurkat

مریم نوری‌زاده، دکتر جمشید حاجتی، مریم حسینعلی ایزد، دکتر طاهره موسوی‌شبستری
گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

مقدمه: نقش سایتوکاین‌ها بعنوان ملکولهای رابط بین سلولی وتنظیم کننده عملکرد ایمنی بدن از مدت‌ها پیش شناخته شده و IL-2 که یکی از مهم‌ترین سایتوکاین‌های بدن ذر تنظیم پاسخ‌های ایمنی می‌باشد ،بسیار مورد توجه محققان ایمونولوژی در زمینه‌های آزمایشگاهی و کلینیکی قرار دارد.

مواد و روشها: در تحقیق حاضر که هدف آن، تولید و جداسازی IL-2 می‌باشد، از یک ردهٔ سلولی انسانی T بنام Jurkat که منبع خوبی برای تولید IL-2 در مقایسه با سایر منابع بوده و مقادیر متنابهی از IL-2 را تولید می‌نماید ، استفاده شده است. از آنجا که زمان مناسب تحریک سلول، غلظت مناسب میتوژن و مدت زمان تحریک سلولها در تولید بهینهٔ IL-2 اهمیت دارد، لذا این سه پارامتر به طور جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از آن محیط رویی حاصل از تحریک سلولها به منظور دستیابی به مقادیر کافی از IL-2 و حذف مواد مداخله گر با استفاده از دستگاه، آمیکون تغلیظ شده و میزان کل پروتیین آن سنجیده شد و در نهایت جهت اندازه‌گیری میزان IL-2 تولید شده از روش الایزا و به منظور تعیین وزن مولکولی IL-2 بدست آمده از الکتروفورز SDS-PAGE استفاده گردید. ستون آنالیتیکال HPLC با روش Reverse phase نیز جهت تأیید و تطابق این ملکول با IL-2 استاندارد بکار گرفته شد. به منظور بررسی فعالیت بیولوژیک IL-2 نیز از روش سنجش بیولوژیک با استفاد ه از لنفوبلاست‌های انسانی استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از میانگین شمارش سلول‌ها در نمودار (۱) نشان می‌دهد که رشد لگاریتمی سلولها از روز دوم آغاز شده و با غلظت اولیهٔ 10^5 cell/ml در روز سوم به غلظت مطلوب برای تحریک یعنی 10^6 می‌رسند. مطابق نمودار پیک منحنی رشد سلول‌ها در روز پنجم می‌باشد. **میزان IL-2 تولید شده تحت تأثیر ConA با غلظت µg/ml ۲۰ و PMA با غلظت ng/ml ۱۰ و مدت زمان تحریک ۲۲-۲۰ ساعت بیش از سایر موارد می‌باشد و در صورت لزوم می‌توان بجای ConA از PHA با غلظت µg/ml ۱ نیز استفاده کرد.**

نتیجه گیری و توصیه ها: این مطالعه بدلیل استفاد ه از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جداسازی و عدم دسترسی به مقادیر زیادی ازآنتی‌بادی مونوکلونال جهت کروماتوگرافی Affinity مقدار IL-2 بدست آمده کمتر از مقادیر فوق‌الذکر می‌باشد اما به منظور انجام مراحل تزریق به موش و تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه IL-2 که از اهداف بعدی این مطالعه می‌باشد کاربرد دارد. از آنجا که دستیابی به مولکول خالص IL-2 در تهیه کیت‌های تشخیصی از اهمیت بسزایی برخوردار است، لذا تهیه مقادیر زیادی از محیط کشت رویی سلول‌های تحریک شده و استفاده از روشهای یک مرحله‌ای تخلیص پس از تغلیظ محلول خام توصیه می‌شود

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

مقدمه

اینترلوکین ۲ (IL-2) که سابقاً بعنوان فاکتور رشد سلول‌های T (TCGF) شناخته می‌شد، در سال ۱۹۷٦ توسط مورگان و همکارانش در محیط کشت لنفوسیت‌های تحریک شده با PHA مورد شناسایی قرار گرفت. اینترلوکین ۲ یک از سایتوکاین‌های مهم در پاسخ ایمنی بوده و نقش اساسی در هدایت و تکوین پاسخ‌های سلولی و هومورال به عهده دارد. این سایتوکاین عمدتاً توسط لنفوسیت‌های T کمکی (T helper) تحریک شده با آنتی ژن یا میتوژن ترشح شده و با اثر اتوکرین و پاراکرین موجب تحریک رشد و تمایز سلولهای دارای گیرندهٔ IL-2 و بروز پاسخ در آنها میگردد (۱). تعیین ویژگی‌های ملکولی و عملکردی IL-2 همانند سایر سایتوکاین‌ها بعلت مقادیر بسیار کم و مشکلات فراوان در تخلیص آنها به آسانی امکان پذیر نبوده است. با کشف لاین‌های سلولی تولید کنندهٔ IL-2 از جمله سلول‌های Jurkat که از ردهٔ سلولی لوسمیایی T می‌باشد، دسترسی به یک منبع ثابت تولید کننده IL-2 انسانی فراهم شد. سلول‌های Jurkat تحت تأثیر محرک‌هایی مانند ConA و یا PHA به همراه PMA بصورت in vitro مقدار زیادی IL-2 تولید می‌نماید (۲). IL-2 اولین لمفوکاینی است که بطور کامل مورد شناسایی قرار گرفت و فعالیت بیولوژیک آن با استفاده از لاین سلولی وابسته به IL-2 مانند سلولهای سیتوتوکسیک CTLL-2، سنجیده شد(۳). تعیین ویژگیهای ملکولی IL-2 امکان پذیر نبود مگر آنکه این ملکول بطور کامل تخلیص می‌شد. بدین منظور، دانشمندان از خصوصیات ذاتی ملکول از جمله سایز، بار الکتریکی،تمایل اتصال به رنگ، هیدروفوبیستی و اتصال به آنتی‌بادی‌های اختصاصی مونوکلونال در روش‌های مختلف تخلیص استفاده نمودند و توانستند IL-2 را با درجات خلوص متفاوتی تهیه کرده و علاوه بر تعین ویژگی‌های ساختاری، آنتی‌بادی منوکلونال اختصاصی علیه آن را نیز تهیه کنند (۲). آنالیز بیوشیمایی ملکول تخلیص شده نشان داد که ملکول IL-2 گلیکوپروتئینی هیدروفوب با وزن ملکولی ۱۵/۵ کیلودالتون و pH ایزوالکتریک حدود ٦/۵ می‌باشد (۱). Tanaguchi و همکاران در سال ۱۹۸۳ با استفاده از ویژگی‌های ساختاری IL-2 توانستند cDNA آنرا تعیین کرده و با کلون نمودن آن مقادیر زیادی IL-2 نوترکیب تهیه کنند (٤). تهیه مقادیر زیاد IL-2 راه را برای استفادهٔ درمانی از آن هموار نمود بطوری که در سالهای اخیر این سایتوکاین بعنوان یکی از عوامل مؤثر در درمان سرطانها از جمله ملانوما، کارسینومای سلول‌های کلیه، لمفومای غیرهوچکین و کارسینومای گسترش نیافتهٔ کلون، شناخته شده است (٥،٤). همچنین از IL-2 بعنوان ادجوانت در تهیه برخی واکسنها استفاده می‌شود (٦). در ضمن مصرف IL-2 طبیعی نسبت به نوترکیب عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کند. یکی دیگر از مصارف IL-2 علاوه بر ایمونوتراپی، تهیه کیت‌های تشخیصی با استفاده از IL-2 و آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آن می‌باشد که کاربرد فراوانی در تشخیص برخی بیماری‌های ایمنی و یا خود ایمن دارد.

بنابراین: هدف اصلی از تحقیق حاضر تولید اینترلوکین ۲ از رده سلولی Jurkat و تخلیص جزئی آن می‌باشد.

مواد و روشها

۱. کشت سلولهای Jurkat و تحریک آنها جهت تولید IL-2:

الف) رسم منحنی رشد لگاریتمی سلول‌های Jurkat: دانستن زمان آغاز رشدتصاعدی سلولهاجهت تحریک یا فریز نمودن آنها بسیار اهمیت دارد. بدین منظور سه غلظت (10^4)،($3x10^4$)،(10^5 cells/ml) از سلول‌های Jurkat به مدت ۸ روز کشت داده شد و پس از ۲٤، ٤۸، ۷۲،... و ۱۹۲ ساعت با تریپان بلو شمارش گردید و از میانگین سه عدد بدست آمده، منحنی رشد سلول‌ها رسم شد. درصد زنده بودن سلول‌ها طبق فرمول ۱ محاسبه می‌شود:

فرمول ۱:

$$\text{Viability} = \frac{\text{سلول‌های زنده}}{\text{سلول‌های زنده + سلول‌های مرده}} \times ۱۰۰$$

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

ب)روش تحریک کردن سلول‌ها:به منظور تعیین بهترین غلظت میتوژن، سلول‌ها به تعداد اولیه 10^5 cells/ml در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ١٠٠ u/ml پنی سیلین و ١٠٠ µg/ml استرپتومایسین و ٠/٣ mg/ml L- گلوتامین به اضافه ١٠٪FCS در پلیت ٩٦ خانه کشت داده شدند و در روز سوم که طبق نمودار منحنی رشد لگاریتمی به تعداد 10^6cells/ml رسیدند در محیط کشت فاقد سرم شمارش شده و با غلظت‌های متفاوتی از ConA+PMA و PHA+PMA تحریک شدند و محیط رویی سلول‌ها را پس از ٢٢ ساعت جمع‌آوری گردید. به منظور دستیابی به زمان مناسب جمع آوری محیط رویی، سلولها در شرایط مشابه ، با ٢٠ µg/ml conA و ١٠ ng/ml PMA تحریک شده و پس از ٢٤، ٢٢، ٢٠، ١٨، ١٦ ساعت سوپرناتانت آنها جمع‌آوری گردید. در نهایت میزان IL-2 سوپ حاصل از هر دو پلیت با کیت الایزای IL-2 اندازه‌گیری شد.

٢. تغلیظ مایع رویی حاصل از تحریک سلول Jurkat: برای این منظور چند روش درمقیاس کم مورد ارزیابی قرارگرفت. (تمام مراحل تغلیظ در دمای ٤°C انجام گرفته است.)

الف) تغلیظ با روش salting out :در این روش از نمک سولفات آمونیوم اشباع در دو مرحله استفاده شد. ابتدا رسوب‌گذاری با محلول نمک اشباع ٣٥٪ به منظور جداسازی مولکول‌های درشت مانند PHA و سپس رسوب‌گذاری محلول رویی حاصل از مرحله اول با محلول نمک اشباع ٨٥٪ به منظور جداسازی مولکول‌های کوچک مانند IL-2 انجام گرفت که رسوب حاصل جمع‌آوری و در بافر PBS حل شد و برای انجام SDS-PAGE در ٢٠°C- نگهداری گردید.

ب) تغلیظ با استفاده از دستگاه آمیکون(Amicon): دستگاه آمیکون یک سیستم بسته خلا و فشار را متعاقب اتصال به کپسول ازت جهت فیلتراسیون مایع مورد نظر برقرار مینماید.در این روش ملکول‌هایی که کوچکتر از منافذ فیلتر می‌باشند با فشار عبور کرده و ملکول‌های درشت تر باقی می‌مانند. به منظور دستیابی به ملکول‌هایی با وزن ملکولی ٣٠KD و کمتر ابتدا از فیلترPM ٣٠ استفاده شد و بدین ترتیب یک تخلیص جزیی صورت گرفت. پس از آن محلول خروجی حاوی مولکول‌های با وزن مولکولی KD ٣٠ و کوچکتر از آن با فیلتر ١٠PM تغلیظ گردید بطوریکه ملکول‌های اضافی کوچکتر از ١٠ KD خارج شده و محلول باقیمانده شامل ملکولهای بین ١٠ و ٣٠ KD خواهد بود.

ج) تغلیظ با استفاده از centriprep: اساس این وسیله جداسازی مولکول با فیلتراسیون تحت تأثیر سانتریفوژ با دور بالا می‌باشد. در این آزمایش از centriprep با فیلتر YM-3 که ملکول‌های با اندازهٔ 10KD و کوچکتر را از خود عبور داده و ملکول‌های درشت‌تر را در محفظهٔ داخلی نگه‌می‌دارد استفاده شده است. بنابراین محلول موجود در محفظهٔ داخلی در ٢٠°C- نگهداری گردید.

د)تغلیظ با دستگاه concentrator :این دستگاه که نام دیگر آن speed vaccum می‌باشد همانند یک میکروفیوژ عمل می‌کند وبا ایجاد همزمان حرکت سریع دورانی و خلاء موجب تبخیر حلالهای موجود در محلول می‌گردد.

نتایج حاصل از الکتروفورز SDS-PAGE (نشان داده نشده) نشان داد که روش تغلیظ با آمیکون در بین سه روش اول نتیجه بهتری دارد بنابراین در مقیاس حجیم نیز از این روش استفاده نمودیم و محلول حاصل را با concentrator مجدداً تغلیظ کردیم. بطوریکه از 600ml محلول خام در نهایت 7cc محلول تغلیظ شده بدست آوردیم، یعنی محلول در حدود ٨٥ برابر تغلیظ شد.

٣. سنجش پروتئین: درروش برادفورد سنجش پروتئین بر اساس اتصال رنگ به پروتئینهای محلول انجام می‌شود .حساسیت این روش ٢٠٠- ٢٥ میکروگرم پروتئین درمیلی لیتر می‌باشد. در روش برادفورد ١ml از محلول working برادفورد با ١٠٠ ml از نمونه مجهول و استاندارد به مدت ١ دقیقه مخلوط شده و میزان جذب آنها در طول موج nm ٥٩٥ توسط اسپکتروفتومتر خوانده می‌شود، سپس با رسم منحنی استاندارد و در دست داشتن میزان جذب محلول‌های استاندارد می‌توان غلظت پروتئین نمونه‌ها را بدست آورد.

٤. تایید وجود IL-2 با استفاده از SDS-PAGE: در این مرحله از ژل انبار کننده ٣٪ و ژل جدا کننده١٢/٥٪ استفاده شد. انتخاب حجم نمونه‌ها بر اساس غلظت بدست آمده از

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

سنجش پروتیین صورت می‌گیرد تا غلظت همه نمونه‌ها تقریباً یکسان باشد. رنگ‌آمیزی ژل با روش نیترات نقره انجام گرفت.

۵. تأیید وجود IL-2 با استفاده از RP-HPLC: ما در این مطالعه از ستون C_4 آنالیتیکال استفاده گردید. کروماتوگرافی فاز مایع بر اساس تمایل اتصال مولکول‌ها به فاز ثابت (ماتریکس داخل ستون) و جدا شدن آنها از فاز ثابت در اثر عبور فاز متحرک (گرادیان بافرها) از ستون انجام می‌گیرد.فاز متحرک شامل بافرهای A و B می‌باشد. بافر A: آب دوبار تقطیر+ : 0.1% TFA و بافر B : استونیتریل+ 0.05% TFA سرعت عبور بافر[1] از ستون ۰/۸ ml/min و گرادیان خطی عبور بافر ۸۰٪ می‌باشد. 10µl از نمونه استاندارد با غلظت ۳۵ U/ml به ستون تزریق شد و پیک IL-2 استاندارد در دقیقهٔ ۲٤ و هنگام عبور ٦۰-۵۰ درصد از بافر B مشاهده و رسم گردید. سپس ۵۰µl از نمونه مجهول به ستون تزریق و پیک آن در دقیقهٔ ٦ و ۲٦/ مشاهده شد. جهت تطابق پیک‌های استاندارد و نمونه مجهول co-chromatogrphy انجام گرفت یعنی اینکه مخلوطی از نمونه استاندارد و مجهول با غلظت‌های قبلی به ستون تزریق و در نهایت یک پیک واحد رسم شد که نشان دهندهٔ مطابقت دو مولکول با یکدیگر است. پس از انجام کروماتوگرافی با استفاده از سطح زیر منحنی پیکها میزان تقریبی IL-2 با استفاده از فرمول ۲ تخمین زده شد:

فرمول ۲:

$$\text{غلظت نمونه مجهول} = \frac{\text{غلظت نمونه استاندارد براساس حجم تزریق شده} \times \text{سطح زیر منحنی نمونه مجهول}}{\text{سطح زیر منحنی نمونه استاندارد}}$$

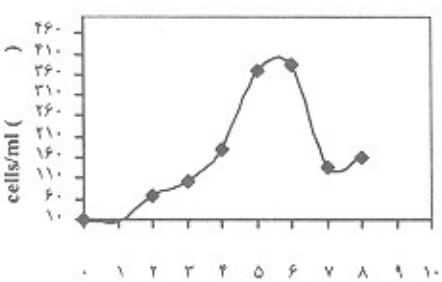
٦. Bioassay محلول تغلیظ شده:

یکی از روش‌های سنجش بیولوژیک IL-2 بررسی میزان تأثیر آن در رشد لنفوبلاست‌ها می‌باشد. به منظور تهیه لنفوبلاست بایستی تعداد 2×10^6 cells/ml از لنفوسیت‌های خون محیطی با ۱٪ PHA به مدت ۷۲ ساعت در محیط حاوی ۵٪ FCS و 5×10^{-5} 2-ME تحریک شوند. سپس لنفوبلاست‌های بدست آمده به تعداد cells/ml 10^6 و به مدت ۱۸ ساعت در محیط مشابه و در مجاورت نمونه‌های تغلیظ شده و نشده قرار داده شدند.پس از آن تست MTT(MTT ۱۰ µl/well با غلظت ۵ mg/ml) جهت ارزیابی میزان رشد و تکثیر لنفوبلاست‌ها انجام می‌گیرد و پس از ٤ ساعت OD آن در ۵۷۰nm خوانده می‌شود.

یافته‌ها

۱- رسم منحنی رشد لگاریتمی سلول‌های Jurkat:

نتایج حاصل از میانگین شمارش سلول‌ها در نمودار (۱) نشان می‌دهد که رشد لگاریتمی سلولها از روز دوم آغاز شده و با غلظت اولیهٔ 10^5 cell/ml در روز سوم به غلظت مطلوب برای تحریک یعنی 10^6 می‌رسند. مطابق نمودار پیک منحنی رشد سلول‌ها در روز پنجم می‌باشد.



نمودار۱- منحنی رشد لگاریتمی سلول‌هایJURKAT با غلظت اولیه 10□cell/ml در طی۸ روز کشت متوالی

۲- نتایج حاصل از بررسی میزان تولید IL-2 توسط تست الیزا:

۱-۲- تأثیر غلظت‌های متفاوتی از دو میتوژن ConA و PHA بر تولید IL-2 از سلول‌های Jurkat و اثر زمان در تولید آن:نتایج حاصل در جدول (۱) و (۲) و (۳) نشان می‌دهد که میزان IL-2 تولید شده تحت تأثیر ConA با غلظت µg/ml ۲۰ و PMA با غلظت ng/ml ۱۰ و مدت زمان تحریک ۲۲-۲۰ ساعت بیش از سایر موارد می‌باشد و در صورت لزوم می‌توان بجای ConA از PHA با غلظت µg/ml ۱ نیز استفاده کرد.

[1] flow rate

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

جدول۱- نتایج اثر غلظت‌های مختلف ConAو PHA به همراه PMA در تولید IL-2 از سلول‌های JURKAT

نمونه‌ها	غلظت PHA (µg/ml)	غلظت ConA (µg/ml)	غلظت PMA (ng/ml)	جذب نوری	غلظت IL-2
١	–	–	–	٠/١٠٤	٠
٢	–	١٠	٥	٠/١٩٠	٢٠٠٠
٣	–	١٠	١٠	٠/١٩٥	٢١٥٠
٤	–	١٠	٢٠	٠/١٩٥	٢١٥٠
٥	–	١٠	٥٠	٠/٢٠٩	٢٢٥٠
٦	–	٢٠	٥	٠/٢١٤	٢٦٥٠
٧	–	٢٠	١٠	٠/٢٣٧	٢٨٠٠
٨	١/٥	–	١٠	٠/١٥٦	١٤٧٠
٩	١	–	١٠	٠/٢٠٠	٢٢٠٠

جدول۲- نتایج حاصل از اثر زمانهای مختلف تحریک سلولهای JURKAT در تولید IL-2

مدت زما ن تحریک سلولها	جذب نوری	غلظت IL-2
بدون میتوژن پس از ٢٠ ساعت	٠/٠٢٥	٠
١٦ ساعت پس از تحریک	٠/٢٧٥	٤/٥
١٨ ساعت پس از تحریک	٠/٢٩٨	٥
٢٠ ساعت پس از تحریک	٠/٣٩٨	٧/٩
٢٢ ساعت پس از تحریک	٠/٣٩٥	٧/٨
مدت زما ن تحریک سلولها	جذب نوری	٦/٥

جدول ۳- نتایج بررسی میزان IL-2 قبل و بعد از تغلیظ

نمونه‌ها	غلظت IL-2 (Pg/ml)	
قبل از تغلیظ	١٥	
ملکول‌های کوچکتر از ١٠ کیلو دالتون	٠	
بعد از تغلیظ (رقیق نشده)	١٩٠	
بعد از تغلیظ (٢ برابر رقیق شده)	١٢٠	میانگین:
بعد از تغلیظ (١٠ برابر رقیق شده)	٢٥	٢٢٥ (Pg/ml)
بعد از تغلیظ (١٠٠ برابر رقیق شده)	٠	

جدول۴- میانگین جذب وغلظت نمونه‌ها با روش برادفورد

نمونه ها	جذب نوری	غلظت IL-2	فاکتور رقت
قبل از تغلیظ	٠/٤١٥	٣٨٢	٣/٣
بعد از تغلیظ با فیلتر 30PM	٠/١٧١	٢٧١/٦	٧
بعد از تغلیظ با فیلتر 10 PM	٠/٢١٧	٢٦٦/٦	٥

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

۳- نتایج سنجش پروتئین مایع رویی قبل و بعد از تغلیظ:

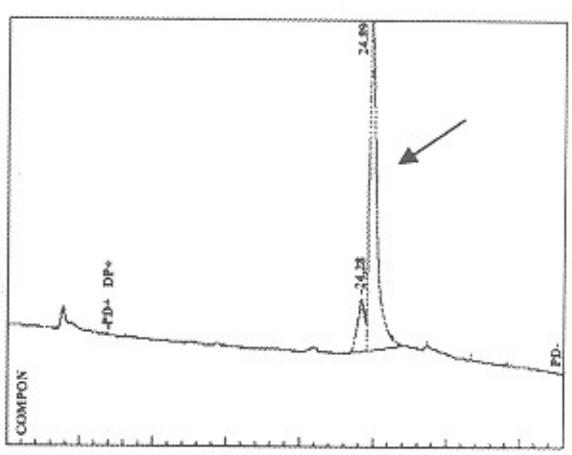
به منظور تعیین میزان پروتئین در محلول رویی حاصل از تحریک سلول‌ها، قبل و بعد از تغلیظ از روش سنجش برادفورد استفاده گردید. بدین منظور ابتدا، منحنی استاندارد برادفورد با استفاده از محلول‌های استاندارد BSA رسم شد وسپس غلظت نمونه‌های مجهول با کمک آن، محاسبه گردید. نتایج سنجش پروتئین در جدول (٤) نشان داده شده است.

٤- نتایج الکتروفورز SDS-PAGE:

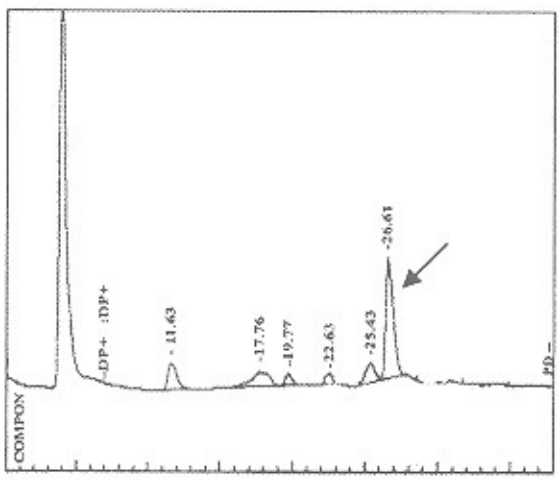
الکتروفورز SDS-PAGE نمونه تغلیظ شده با فیلترهای PM 30و10 توسط دستگاه آمیکون و همچنین نمونه قبل از تغلیظ و نمونه حاوی ملکول‌های کوچکتر از ۳۰KD در شکل (۱) نشان داده شده است.

۵- نتیجهٔ حاصل از کروماتوگرافی با روش RP-HPLC:

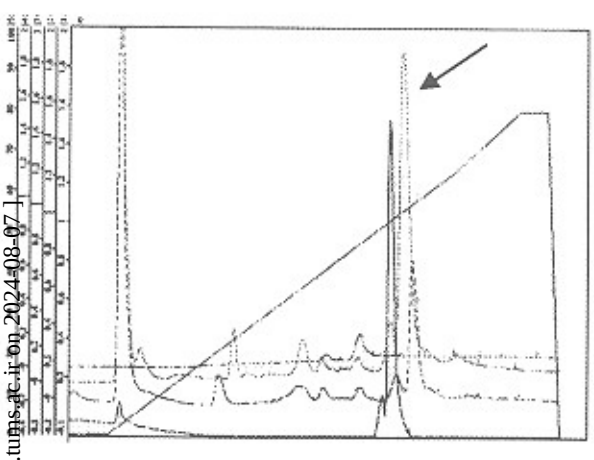
پیک‌های مربوط به IL-2 استاندارد و نمونه پس از تخلیص در نمودارهای (۲) و (۳) نشان داده شده است. نتیجه حاصل از Cochromatography هر دو نمونه نیز در نمودار (٤) مشاهده می‌شود.



نمودار ۲- - پیک استاندارد IL-2



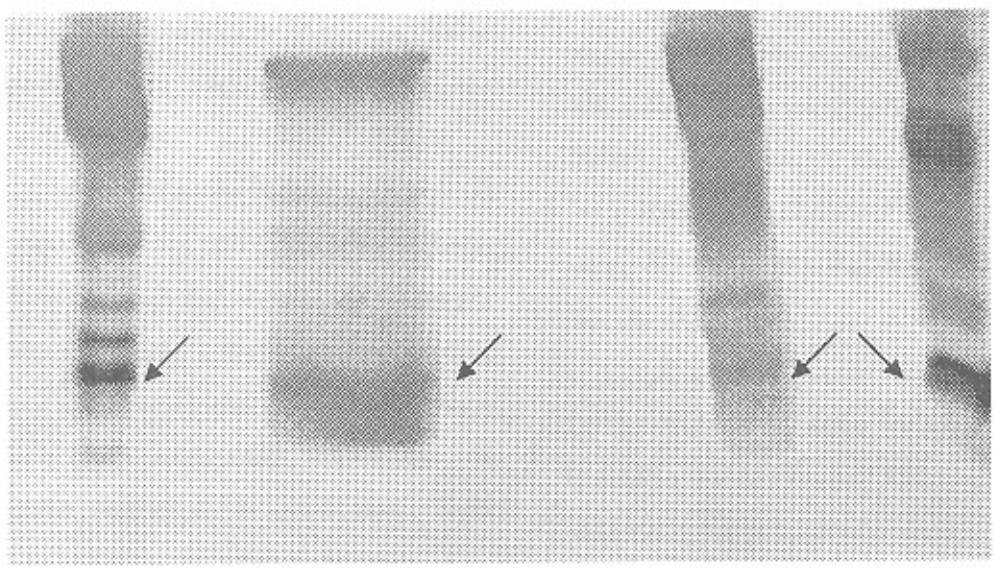
نمودار ۳- پیک‌های مربوط به نمونهٔ مجهول (پیک ۳ مربوط به IL-2 جدا شده)



نمودار ۴- Co-chromatography نمونهٔ استاندارد و مجهول (پیک ۲) نمونهٔ استاندارد (پیک ۱)- نمونهٔ مجهول (پیک ۳)

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

سایز مارکر قبل از تغلیظ بعد از تغلیظ با آمیکون IL-2 استاندارد



شکل ١- الکتروفورز SDS-PAGE از نمونه‌های تغلیظ شده

با استفاده از فرمول ٢ میزان تقریبی IL-2 بدست آمد: غلظت نمونه مجهول در 50µl نمونه تزریق شده ١٤٨ unit /٠ بود که غلظت نهایی نمونه در 1ml، ٢/٩٦ U/ml معادل ٢٢٢ pg/ml بدست آمد.

٦- نتایج حاصل از **Bioassay** :

نتایج حاصل از اثر IL-2 بر روی لنفوبلاستها در جدول(٥) نشان داده شده است. رسم نمودار استاندارد بدلیل عدم دسترسی به غلظتهای متفاوتی از استانداردهای IL-2 امکانپذیر نبود ، بنابراین غلظت IL-2 موجود در نمونه هابدست نیامد و تنها به ذکر جذب نوری حاصل، اکتفا شده است.

جدول٥- نتایج bioassay نمونه‌هابا استفاده ، ازلنفوبلاست‌های انسان

نمونه‌ها	جذب نوری
کنترل منفی	٠/٠٢٧
کنترل مثبت	٠/٣١٥
قبل از تغلیظ	٠/٢٠٦
ملکولهای کوچکتر از ١٠ کیلودالتون	٠/٠٦٠
ملکولهای بزرگتر از ٣٠ کیلودالتون	٠/١١٠
ملکولهای بین ١٠ و ٣٠ کیلودالتون:	
بدون رقت	٠/٣٢٠
٢ برابر رقیق شده	٠/٢٧٢
١٠ برابر رقیق شده	٠/٢٠٠

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

بحث

مطالعه بر روی لنفوسیت‌ها و عملکرد آنها سابقهٔ طولانی دارد اما آنچه مسلم است آن است که کشف سایتوکاینها به عنوان ملکولهای رابط بین سلولی، تحول عظیمی در علم ایمونولوژی به شمار می‌رود.

در تحقیق حاضر که هدف آن تهیه و تولید IL-2 طبیعی می‌باشد. از بین منابع in vitro مختلف سلول‌های Jurkat را انتخاب نمودیم ، زیرا سلولهای Jurkat تحریک شده ۱۰۰ تا ۳۰۰ برابر بیش از لنفوسیت‌های خون محیطی تحریک شده با میتوژن IL-2 تولید می‌نماید (۷). در ضمن اینکه استفاده از این رده سلولی مشکل تغییرات منحصر به فرد لنفوسیت‌های خون محیطی که می‌تواند در تیتر IL-2 اثر داشته باشد را ایجاد نمی‌کند (۸،۹) در کاربردهای بالینی IL-2 تولیدشده از سلول‌های Jurkat نسبت به IL-2 نوترکیب، صرفنظر از گلیکوزیلاسیون، عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌نماید (۱۰).

فعال‌سازی ژن IL-2 به دو سیگنال اولیه و ثانویه نیاز دارد که سیگنال اولیه با تحریک TCR/CD3 از طریق اتصال با کمپلکس پپتید-MHC در سطح سلولهای عرضه‌کنندهٔ آنتی‌ژن ایجاد می‌شود که لکتین‌ها نیز می‌توانند این سیگنال را ایجاد کنند و سیگنال ثانویهٔ غیراختصاصی آنتی‌ژن نیز توسط سلولهای کمکی از جملهٔ منوسیتها و سلولهای عرضه‌کننده آنتی‌ژن تأمین می‌شود و مهمترین آنها IL-1 می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که اولین سیگنال منجر به ظهور IL-2 mRNA و دومین سیگنال منجر به ترجمهٔ آن می‌گردد (۱۱).

PMA یک مشتق اسید چرب غیراشباع می‌باشد و می‌تواند جایگزین خوبی برای سیگنال دوم ایجاد شده توسط سلول‌های کمکی و ماکروفاژها باشد (۱۲). در ضمن اینکه موجب افزایش و تقویت تولید IL-2 می‌گردد (۱۳،۱٤). PMA بطور سینرژیسم با میتوژنها در تولید IL-2 نقش داشته و مستقیماً آنزیم پروتئین کیناز C را فعال می‌نماید(۷،۱۵) و با متوقف نمودن سلولها در فاز G_1 و همچنین کاهش بیان رسپتور IL-2 موجب کاهش مصرف IL-2 و تجمع آن در محیط کشت می‌گردد (۱٦،۱۷).

غلظت میتوژن، دانسیتهٔ سلول، زمان تحریک و جمع‌آوری سلولها پس از تحریک در تولید بهینهٔ IL-2 از اهمیت زیادی برخوردار است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد که بهترین زمان جهت تحریک سلول‌های Jurkat روز سوم پس از کشت با غلظت اولیهٔ Cell/ml 10^5 و غلظت نهایی Cell/ml 10^6می‌باشد. از آنجا که حضور FCS در مراحل بعدی کار با محیط رویی حاصل از تحریک سلول‌ها ممکن است تداخل ایجاد کند سلول‌ها را در شرایط بدون سرم و در حضور ConA با غلظت ۲۰µg/ml و PMA با غلظت ۱۰ng/ml و یا همین غلظت از PMA و ۱٪ PHA تحریک نمودیم که مشابه غلظت‌های مورد استفاده در بسیاری از مقالات بود. جمع‌آوری محیط رویی نیز ۲۲-۲۰ ساعت پس از تحریک انجام شد که در سایر گزارشات زمان ۲٤-۱۸ ساعت در نظر گرفته شده است (۷،۸،۱۸).

در مرحلهٔ بعد، پس از تحریک سلول Jurkat و جمع‌آوری مایعات رویی با توجه به اینکه انجام پروسه‌های متعدد تخلیص مانند ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی تعویض یونی و در نهایت کروماتوگرافی تمایلی[2] به حجم‌های بسیار بالایی حدود ۵۰ لیتر مایع رویی حاصل از تحریک نیاز داشت و این خود مستلزم وجود چندین لیتر FCS و محفظه‌های کشت بزرگ می‌باشد، بنابراین تنها به تغلیظ مایع رویی حاصل از تحریک با دستگا آمیکون پرداختیم و پس از سنجش میزان پروتئین موجود در محلول تغلیظ شده، وجود IL-2 را در SDS-PAGE و RP-HPLC تأیید نمودیم. وجود باند مشخص در محدودهٔ ۱۷-۱٤ کیلودالتون حاکی از تخلیص جزئی محیط خام اولیه می‌باشد. در ضمن آنکه این باند در محدودهٔ وزن مولکولی IL-2 که در اکثر مقالات نیز بین ۱۷-۱۵ کیلودالتون عنوان شده، بوجود آمده است. لازم به ذکر است که بسیاری از درشت مولکول‌های

[2] Affinity chromatography

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

موجود در محیط خام همانند PHA در مرحلهٔ نخست فیلتراسیون خارج می‌شوند و اثر مداخله‌گر آنها نیز از بین می‌رود. نتایج حاصل از کروماتوگرافی فاز معکوس نیز حاکی از خلوص تقریبی مولکول IL-2 می‌باشد و علاوه بر آن با استفاده از گراف‌های موجود توانستیم مقدار تقریبی مولکول را تخمین بزنیم. میزان IL-2 موجود در ml ۶۰۰ محیط کشت پس از ۸۵ برابر تغلیظ حدود u/ml ۲/۹۶ معادل pg/ml ۲۲۲ بدست آمد. نتایج تست الایزا نیز این مقدار را تائید میکند. در مقایسه با مطالعات انجام شده برروی تخلیص مولکول IL-2 با استفاده از روش‌های مختلف تخلیص نتایج متفاوتی مشاهده می‌شود مثلاً Welte و همکاران از ml ۳۰۰۰ محلول خام با استفاده از روش‌هایAPS، GF، IEC، Procion-red ، Blue agarose حدود µg/lit ۱۹ و Bohlen و همکاران از ml ۲۰۰۰ محیط خام با استفاده از روش‌های Amicon ، RP-HPLC،GF حدود µg/lit ۹ و Godard و همکاران از ml ۹۰۰ محیط خام با روش‌های GF،ASP، Affinity-chromatography حدود µg/lit ۶۸، IL-2 بدست آورده‌اند. اختلاف موجود در مقادیر بدست آمده از ملکول IL-2 بدلیل استفاده از روش‌های متفاوت تهیه و تخلیص ملکول می‌باشد. بطوریکه با استفاده از کروماتوگرافی Affinity که یکی از بهترین و جدیدترین روش‌های تخلیص می‌باشد میتوان ملکول مورد نظر را با درجه خلوص بسیار بالا بدست آورد.در این مطالعه بدلیل استفاده از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جداسازی و عدم دسترسی به مقادیر زیادی ازآنتی‌بادی مونوکلونال جهت کروماتوگرافی Affinity مقدار IL-2 بدست آمده کمتر از مقادیر فوق‌الذکر می‌باشد اما به منظور انجام مراحل تزریق به موش و تهیه آنتی‌بادی مونوکلونال علیه IL-2 که از اهداف بعدی این مطالعه می‌باشد کاربرد دارد. سنجش بیولوژیک IL-2 با استفاده از سلولهای CTLL-2 حساس به IL-2 و همچنین لنفوبلاست‌های خون محیطی انسان و یا سلول‌های طحالی تحریک شده موش انجام میشود که به علت در دسترس نبودن CTLL-2 از لنفوبلاست‌های خون محیطی انسان استفاده نمودیم و مشاهده کردیم که نمونه تغلیظ شده نسبت به محلول خام اثر چشمگیرتری در تکثیر لنفوبلاست‌ها دارد. بنابراین ما توانستیم با تغلیظ یک مرحله‌ای محیط کشت میزان IL-2 قابل توجه ای بدست آوریم.

چشم‌انداز آینده:

از آنجا که دستیابی به مولکول خالص IL-2 در تهیه کیت‌های تشخیصی از اهمیت بسزایی برخوردار است، لذا تهیه مقادیر زیادی از محیط کشت رویی سلول‌های تحریک شده و استفاده از روشهای یک مرحله‌ای تخلیص پس از تغلیظ محلول خام توصیه می‌شود، که این روش یک مرحله‌ای می‌تواند شامل کروماتوگرافیAffinity و یا کروماتوگرافی فاز معکوس HPLC با سیستم Preparative باشد که در بسیاری از مقالات نیز بکار رفته است

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]

منابع

1. Robb، R.J. IL-2: the molecule and its function. Immunology Today. 1984. 5(7): 203-209.

2. Robb، R.J. Human IL-2. Methods in Enzymology. 1985. 116: 493-530.

3. Kendall A. Smith. IL-2: Inception، Impact and Implications. Science 1988. 240: 1169-1176.

4. Taniguchi T. ، Matsui H.، Fujita T. and et al. Structure and expression of a cloned cDNA for human IL-2. nature (London) ، 1983.302: 305-307.

5. Joshua T.R. IL-2: its biology and clinical application in patient with cancer. Can Investigation. 1993. 11(4): 460-472.

6. Son young-IK ، Mailliard R.B.، Watkins S.C. and et al. Dendritic cells pulsed with apoptotic squamous cell carcinoma have anti-tumor effects when combine with IL-2. Laryngoscope. 2001. 111(8): 1472-1478.

7. Gillis، S.، Smith، K. and et al. T cell Growth Factor: parameters of production and a quantitative microassay for activity. J Immunol. 1978. 120(6): 2027-2032.

8. Gillis، S.، Watson، J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an IL-2 producing human leukemia، T cell line. J Exp Med. 1981. 154: 1455-1474.

9. Gearing، A.J.H.، Bird، C.R. A practical approach lymphokine and interferon. 1989. P: 291-300.

۱۰. مصطفی زاده، امرا... .جداسازی اینترلوکین ۲ از سلولهای لایـن لنفومایـی (EL-4) مـوش. پایـان نامـه کارشناسـی ارشـد ایمونولوژی ، دانشگاه تربیت مدرس، ۱۳۷۱.

11. Weis، A.، Wiskocil، R.C. and Stobo، J.D. The role of T3 surface molecules in the activation for IL-2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J Immunol. 133(1): 336-342.

12. Janssen، R.A.J.، Mulder، N.H. and Hauw، T. The immunobilogical effects of IL-2 invivo. Can Immunol Immunotherapy. 1994. 39: 207-16.

13. Farrar، J.J.، Mizel، S.B. and Fuller-Farrar، J. Macrophage independent activation of helper T cell. I: production of interleukin 2. J Immunol. 1980. 125: 793-800.

14. Didier، M.، Claude، A.، Ferrua، B. and Fehlmann، M. Regulation of IL-2 synthesis by cAMP in human T cells. J Immunol. 1987. 139: 1179-1184.

15. Barton، F.، Watson، F.J.، Mochizuki، D.، Gillis، S. Biochemical and biologic characterization of IL-2 from a human T cell leukemia. J Immunol . 1981. 127(6): 2361-2365.

16. Bubenik J. Local and regional immunotherapy of cancer with IL-2. J Can Res Clin Oncol. 1990. 116: 1-7.

17. Gillis، S.، Scheid، M. and Watson، J. Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. J Immunol. 1980. 125(6): 2570-2578.

18. Kuziel، W.A.، Greene، W.C. IL-2 and the IL-2 receptor: new insights into structure and function . J Inves Derm. 1990. 94(6). (suppl 1): 27s-32s.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-07]