مجلهٔ علوم دانشگاه تهران جلد ۱۶ شماره های ۱ و ۲ سال ۱۳۶۶ از صفحه ۲۹ تا ۳۵

تهیه ریزدانه‌های پلیمری فلورسانت و کاربرد آن در تثبیت آنتی بادی جهت هدف‌گیری سلولها[1]

فروزنده جلیلوند ، زهرا اوسطی آشتیانی و دکتر محمدنبی سربلوکی

آزمایشگاه شیمی ــ فیزیک ماکرومولکولها و غشاء ها ، مرکز تحقیقات بیوشیمی ــ بیوفیزیک دانشگاه تهران

چکیده

ریزدانه های پلی‌گلوتارالدئید بااندازه کمتر از یک میکرون تحت شرایط قلیائی قابل تهیه است. افزودن یک ماده فلورسانت مثل فلوئورسین ایزتیوسیانات[2] درطی سنتز باعث فلورسانت شدن آنها میگردد. از آنجا که این ریزدانه ها داری‌گروههای فعال آلدئیدی می باشند احتمالا قادرند علاوه بر جذب سطحی ، پادتن ضدگلبولهای قرمز انسان‌را از طریق پیوند کووالانسی در pH فیزیولوژیک بخود متصل نمایند.

ازاین ریزدانه های پادتن‌دارو فلورسانت می‌توان به‌عنوان وسیله‌ای‌برای نشانه‌گیری سلولهای مورد نظر استفاده نمود. لذا با توجه به اشاره فوق دراین بررسی هدف‌گیری‌گلبول های قرمز مورد بررسی قرارگرفته است باین‌ترتیب که ریزدانه‌پادتن‌دار را باسخلوط‌گلبول ها مجاورمیکنند تااینکه‌از طریق جفت شدن پادتن‌ـ پادگن دانه ها بطور اختصاصی به‌گیرنده سطح گلبول دارای پادگن‌مربوط متصل‌گردند وسطح خارجی سلول‌را بپوشانند. این پوشش در زیر میکرومسکوپ معمولی و فلورسانت به‌آسانی قابل رویت است.

Preparation of fluorescent polymeric immunomicrospheres and their applications in cell targeting

F. Jalilvand, Z. Ousati - Ashtiani and Dr. M. N. Sarbolouki

Institute of Biochemistry and Biophysics Tehran University, P. O. 13145 - 1384

Tehran, Iran

Abstract

Polyglutaraldehyde microspheres can be prepared under alkaline conditions. Addition of fluorescin isothiocyanate (FITC) during the synthesis of microspheres results in the formation of fluorescent microspheres. The abundance of the aldehyde groups in the microbead's gel matrix makes it probable for them, in addition to pure adsorption, to form covalent bonds with bioplymers like antibodies. It was possible to bind rabbit anti - human IgG to the e flurescent beads at physiological pH. These conjugate microsphere - IgGs were then used as a means of speciiic labeling of human RBCs by observing their attachment to RBC surface receptors under fluorescent microscope.

۱- این مقاله براساس نتایج حاصل ازسال اول طرح پژوهشی‌شماره ۵۰۸ مصوب شورای پژوهشی دانشگاه تهران تهیه‌گردیده است.

2 - Fluorecin Isothio Cyanate = FITC.

مقدمه*

در سال های اخیر پژوهشگران کوشش های فراوانی درجهت دست یابی به‌روش های مناسبی جهت مشخص کردن سراکزخاص موجود در سطح سلول ها بمنظور شناسائی، جداسازی ویادارورسانی انتخابی به‌آنها مبدول داشته‌اند. این‌مسئله ازلحاظ کلینیکی‌بسیار حائزاهمیت است. زیرا اغلب‌اوقات آن غلظت ازداروئی که در نابودی سلول های غیرطبیعی (مثل سرطان) موثر است، درحدی قرار می‌گیرد که سلول های‌سالم وطبیعی‌وبه‌ویژه آن‌هائی راکه از سرعت‌تکثیر بالائی برخوردارند (مثل مغزاستخوان، امعاءواحشاء) راهم دچارصدمه نماید.

لذا یکی از معقول‌ترین راه‌های مقابله با چنین مشکلی این است که توزیع دارو را دربدن‌به‌گونه‌ای انتخابی وبه‌سمت نقطه موردنظر متمرکز نمایند تابه‌این‌وسیله بتوان بااستعمال اندکی‌از دارو به اثرات درمانی قابل توجهی دست یافت . پال ارلیش (Paul Ehrlich درسال ۱۹۰۶) نخستین کسی است که پیشنهاد می کند از ملکول های متمایل به‌بافت های ویژه، می‌توان به‌عنوان حامل برای عوامل کشنده سلولها استفاده کرد.

درحال‌حاضر هدف‌گیری سلول های ویژه به کمک پادتن های متناظر[1] باپادگن های[2] ویژه سطح سلول های مورد نظر ، یکی از راه‌های موردبررسی است‌و نتایج نویدبخشی‌را به‌ارمغان آورده‌است. استفاده ازاین شیوه، به‌ویژه درباره عواملی که فعالیت خود رادر سطح سلول ها بروز می‌دهند (مثل فسفولیپازهای زهرمار، کاردیو توکسین ها) وبرای اثرکشندگی خود نیازی به‌رفتن به‌درون سلول را ندارند، برای مبارزه بااسراضی چون‌سرطان داروهائی آرمانی (ایدآل) محسوب می‌شود.

باتوجه به‌این‌مطلب که تقریباً می‌توان برای هرجزئی ازاجزاء سلول مثل پلی‌پپتیدها، پروتئین ها پروتئوگلیکان های پیچیده‌و هاپتن های کوچک پادتن باویژگی و تمایل[3] بالا ایجاد نمود، موضوع دارو رسانی هدف‌دار به‌حداعلاء دقت‌وظرافت‌خود می‌رسد. زیرا پادتن ها اصولا نشانه‌روهائی آرمانی برای هدفگیری هستندو اگر منظور نابودی سلول موردهدف باشد اینها قادرند مستقیماً ویا به‌صورت سینرژتیکی این نقش‌را ایفا نمایند ویااینکه از طریق Capping ویا تراواتر نمودن غشاء سلولی ، عمل اندوسیتوز[4] را درآن نسبت به‌داروی متصل به‌پادتن ویامنفک ازآن، تشدید نمایند .

علیرغم این که هنوز درمورد مسئله وجود پادگن های ویژه سرطانی در سطح یاخته های مربوطه توافق‌نظر عمومی وجود ندارد اکثریتی را عقیده براین است که‌در تبدیل های نئوپلاستیک،اجزاء پادگنی[5] ویژه‌ای ظهور می‌نمایند که در بافت های طبیعی و عادی مشاهده نمی‌گردند (قوزوهمکارانش در ۱۹۷۸ Ghose, T. et al) این مواد رانشانه های توموری[6] و یا پادگن های وابسته به تومر[7] می‌نامند . قابل ذکراست که پادتن های‌مجموعه خالص تک‌تبار که متناظر برخی از تومرهای انسانی مثل کارسینومای روده‌بزرگ ملانوماو کارسینومای پستان هستند،تولید شده‌اند (۱۹۷۳،۱۹۷٤ Davies, D, A. et al 1973, 1974). علاوه براین ثابت شده است مزدوج های[8] حاصل ازمولکول های عوامل سمی وپادتن ها قادرند سلول های دارنده پادگن متناظرشان‌را نابود سازند (مثل توکسین دیفتری‌متصل به‌آنتی ۲ و ٤ ـدی نیتروفنیل، ویاگلوکز اکسیداز متصل به‌پادتن‌آنتی‌تری‌نیتروفنیل(Moolten, etial, 1972)، کمپلکس داروهای الکیله کننده (کلرامبوسیل) و Ig ها ، (Ghose, et al 1972, Rubeus, et al, 1974) ، متوترکسات‌متصل به‌Ig (ازطریق بند آزوئیک) ، فیبرینوژن ویا آلبومین سرم‌انسانی . کار این نوع نشانه‌گیری ها با استفاده از پاره مولکولهای ایمونولوژیکی فعال و مناسب(مثل F(ab) ویا F(ac)) تقویت‌گردیده ، عبورشان نیز از مویرگها آسانتر می‌شود .

اما متاسفانه مشکل اساسی این‌گونه ذرات مزدوج دراین‌است که هر ملکول ایمنی اغلب نمی‌تواند بیش از یک ملکول داروبه خود متصل وحمل نماید ودرعین‌حال خود دستخوش تغییرات ناهنجار نگردد وخواص ایمنی خود را ازدست ندهد. لذابرای جبران این مشکل نخست ازملکول های پلیمری متصل به‌پادتن (پلی‌لایزین،گلوتامیک اسید، دکستران، ویا مشتقات‌آنها) به‌عنوان رشته های رابط جهت پیونددادن ملکول های متعددارو استفاده گردیدو ادامه این کار امروز منجر به‌استفاده از ریزدانه های‌پلیمری انجامیده است که هریک قادرند تا . ٥ درصد ازوزن خود داروحمل نمایند. این ریزدانه ها از امتیازات زیربرخوردار هستند:

۱- انواع واندازه ریزدانه‌ها دقیقاً قابل انتخاب و مهاراست.

۲- می‌توان ریزدانه های مربوطه را فلورسانت نمود.

۳- می‌توان‌آنها را بطریقی تهیه کرد که خاصیت مغناطیسی داشته باشند.

٤- می‌توان ازاین نوع ریزدانه‌ها به‌عنوان‌عاملی چسباننده سلولهای ویژه به‌دور خودودر نتیجه انعقاد آن‌ها استفاده کرد.بدین

---

* باطلاع خوانندگان عزیز می‌رساند که به‌علت تازگی‌داشتن‌موضوع موردبحث مقدمه این مقاله ازحد معمول طولانی تر شده است

1 - antibody 2- antigen 3 - affinity 4 - endocytosis 5 - antigen

6 - tumor markers 7- TAA - tumor associated antigens 8 - conjugates

ترتیب هنگامی که این ریزدانه ها ازطریق پیوند پادتن-پادگن به سطح سلول چسبیدند به آسانی میتوان سلولهای مزبوررا زیرمیکروسکوپ نوری رویت نمود و با این روش امکان جداسازی و دسته بندی جمعیتهای سلولی نیز میسر می شود.

واضح است که در پیونددادن پادتن ها به ریزدانه ضرورت دارد که هردوی آن ها در نقاط مناسب داری گروه های شیمیایی که قادر به ترکیب با همدیگر باشند وجود داشته باشد وعلاوه برآن پیوند در نقطه ای از مولکول پادتن صورت گیرد که برفعالیت ایمونولوژیکی آن تاثیر سوء نداشته باشد. جهت اینکار اغلب لازم است ریزدانه پلیمری را مورد تغییرات شیمیایی قرار داد. دراین خصوص اکثراً از ترکیباتی که دارای دوگروه عاملی هستند مثل گلوتارالدئید، تولوئن دی ایزوسیانات ویا کربودی ایمید، در شرایطی که این مواد موجب ایجاد پیوند های عرضی (Crosslink) در پادتن نگردند، استفاده می شود. دراین گزارش ملاحظه خواهد شد که بااستفاده از ریزدانه های پلی گلوتارالدئید که خود فطرتاً دارای مقدارزیادی عوامل شیمیایی واکنش دهنده هستند ودرنتیجه مراحل آماده سازی فوق را نیاز ندارد، می توان جهت پیونددادن مستقیم پادتن ها به آنها استفاده کرد (فعال بودن گروه آلدئیدی را می توان باتوجه به نقش آن درکارهای تثبیت سلولی بیاد آورد).

اخیراً مشخص شده است که گلوتارالدئید در محیط قلیایی خود بخود و از طریق مکانیسم تراکم آلدولی [1]. پلیمریزه می گردد (Margel, et al, 1980). پلیمریزاسیون گلوتارالدئید تحت شرایط قلیایی منجر به ایجاد پلیمرهای محلول ونامحلول درآب می شود. این پلیمر شامل گروههای آلدئیدی مزدوج، آلدئیدغیر مزدوج وهیدروکسیل و کربوکسیل است. درصورتی که پلیمریزاسیون در مجاورت مواد امولسیون کننده صورت پذیرد پلیمر حاصل بصورت ریزدانه در میآید. بطور کلی تشکیل پلیمرواندازه ریزدانه به غلظت مونومر، نوع ومقدارماده امولسیون کننده، ودمای واکنش بستگی دارد. تاکنون موفق شده اند بدین طریق ریزدانه هایی بااندازه هائی بین ۰/۵ نانومتر تا ۱/۵ میکرومتر تهیه کنند وهمچنین مشخص شده است که پلیمرگلوتارالدئید عامل فعالتری نسبت به مونومر آن جهت اتصال به پروتئین میباشد (Margel. et al, 1979) و می توان لیگاندهای مناسب مثل پادتن و یادارو را ازطریق پیوند کووالانسی در pH فیزیولوژیک به وسیله گروههای آلدئیدی به این ریزدانه ها متصل کرد وازاین ترکیب ریزدانه-لیگاند بعنوان عاملی برای نشان دارکردن سلولهای ویژه مثل گلبول قرمز انسان و انواع لنفوسیت های B و T، سلولهای عصبی وشووان استفاده کردو یااینکه ازآنها برای جداکردن گلبول قرمز انسان ازگلبول قرمزخون بوقلمون ویابرای نشان دارکردن سلولهای سرطانی ازنوع ائوزینوفیل بهره گرفت. ریزدانه ها را به دوصورت فلورسانت ومغناطیسی می توان تهیه کرد که نوع مغناطیسی آن برای جداسازی سلول ونوع فلورسانت برای نشان دارکردن سلول، تثبیت آنزیم، دارووپروتئین استفاده می شود. هدف مادراین بررسی، تهیه ریزدانه های فلورسانتی است که بتوان ازآنها بعنوان پایه یامحل جهت نصب پادتن ها استفاده کرده وبکمک آن بتوان سلولهای خاصی رامورد هدف قرارداد.

روش کار

بطورخلاصه روش کار مورداستفاده مشتمل به بخشهای زیر است:

۱-تهیه ریزدانه پلی گلوتارالدئیدفلورسانت.
۲-تهیه ایمونوگلوبولین.
۳-اتصال ایمونوگلوبولین به ریزدانه.
۴-۴-نشان دارکردن گلبول قرمز انسانی بوسیله ریزدانه های مرحله ۳.

تهیه ریزدانه های گلوتارالدئید

ریزدانه پلیمری گلوتارالدئید راسی توان از پلیمریزاسیون محلول آبی گلوتارالدئید در مجاورت ماده فعال سطحی مثل Tween 80 pH = ۱۱ تهیه کرد. با تغییر غلظت مونومرو یک ماده فعال سطحی و pH اندازه دانه هارا می توان تغییرداد. درآزمایشات مشروح درزیر محلول ۵٪ گلوتارالید استفاده گردیدو عمل پلیمراسیون در حضور فلوئورسین ایزوتیوسیانات ۰/۱٪ انجام گرفت.

محلول (۳) نیز به نسبت ۱:۲ در اتیلن دی آمین تهیه گردید. تشخیص گروههای آلدئیدی موجود درریزدانه ها بوسیله طیف سنجی مادون قرمز IR (شکل ۱) وهمچنین بااستفاده از دی نیتروفنیل هیدرازین صورت گرفت. در حالت اخیر ریزدانه ها رادر اتانول قرارداده و سپس دی نیتروفنیل هیدرازین افزوده، رسوب زرد حاصل معرف گروههای آلدئیدی است.

تهیه ایمونوگلوبولین

ایمونوگلوبولین ضدگلبول قرمز انسان باین ترتیب تهیه شد که گلبول قرمز انسانی راپس از جداکردن ازخون (بکمک سانتریفوژ در ۱۰۰۰g) ورقیق کردن آن به نسبت ۱:۱۰ با محلول P. B. S. (بافرنمکین فسفات [2] pH=۷/۲ درچندین نوبت به خرگوش تزریق گردید. پس ازطی مدت زمان لازم جهت پیدایش آنتی سرم درحیوان ازخرگوش خون گرفته وپس ازجداکردن سرم (سانتریفوژدر ۱۰۰۰g

1 - Aldol condensation

2- phosphate buffer saline

ایمونوگلوبولین ضدگلبول‌قرمز انسانی بااستفاده از روش رسوب‌دادن باسولفات آمونیوم ۴۵٪ و ۴۰٪ تهیه‌گردید. غلظت پروتئین با اسپکتروفتومتربکمن[1] در ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

اتصال ریزدانه به پادتن و نشاندار کردن گلبول‌قرمز

برای اتصال پادتن به‌ریزدانه‌ها به ۲میلی‌گرم از ریزدانه ، ۰/۲ میلی‌گرم پادتن‌وه/. میلی‌لیتر P. B. S. افزوده ومجموع حاصل به مدت ۲ساعت در ۴°C تکان داده شد. پس از آن ۰/۱ میلی‌گرم اوره اضافه کرده، بمدت ۱ساعت دردمای اتاق‌تکان دادیم. سپس محلول حاصل رادر 750g به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کرده ورسوب حاصل را دوبار با محلول P. B. S. مورد شستشو قرار دادیم و سپس رسوب حاصل‌را دره/. میلی‌لیتر از P.B.S بحالت تعلیق در آوردیم.

جهت نشاندار کردن‌گلبول قرمز انسان، به ۰/۲۰۰میکرولیتر از محلول‌بدست‌آمده در بالا، ۰/۵ میکرولیترازگلبول قرمز انسانی ۱ به ۱۰ رقیق شده افزوده وبه‌مدت نیمساعت در انکوباتور ۳۷°C قرار داده شد و پس از این مدت وقتی‌گلبولها را در زیر میکروسکوپ نوری مطالعه کردیم مشاهده شد که سطح سلول‌ها توسط ریزدانه احاطه شده است. (شکل ۲).

کاربرد ریزدانه درآگلوتیناسیون پادگن بروسلا

جهت کاربرد احتمالی این روش برای تشخیص بیماری تب مالت مراحل یادشده فوق درمورد پادتن وپادگن بروسلا باین‌ترتیب بکار برده شد که پس ازاتصال ریزدانه به‌پادتن بروسلاومجاورت ترکیب ریزدانه ـپادتن باپادگن بروسلا، آگلوتیناسیون مشاهده گردید، (شکل۳). (پادتن‌وپادگن بروسلا در دانشکده بهداشت دانشگاه‌تهران تهیه شده‌بود). بدیهی است مطالعات دراین‌خصوص باید ادامه یابد.

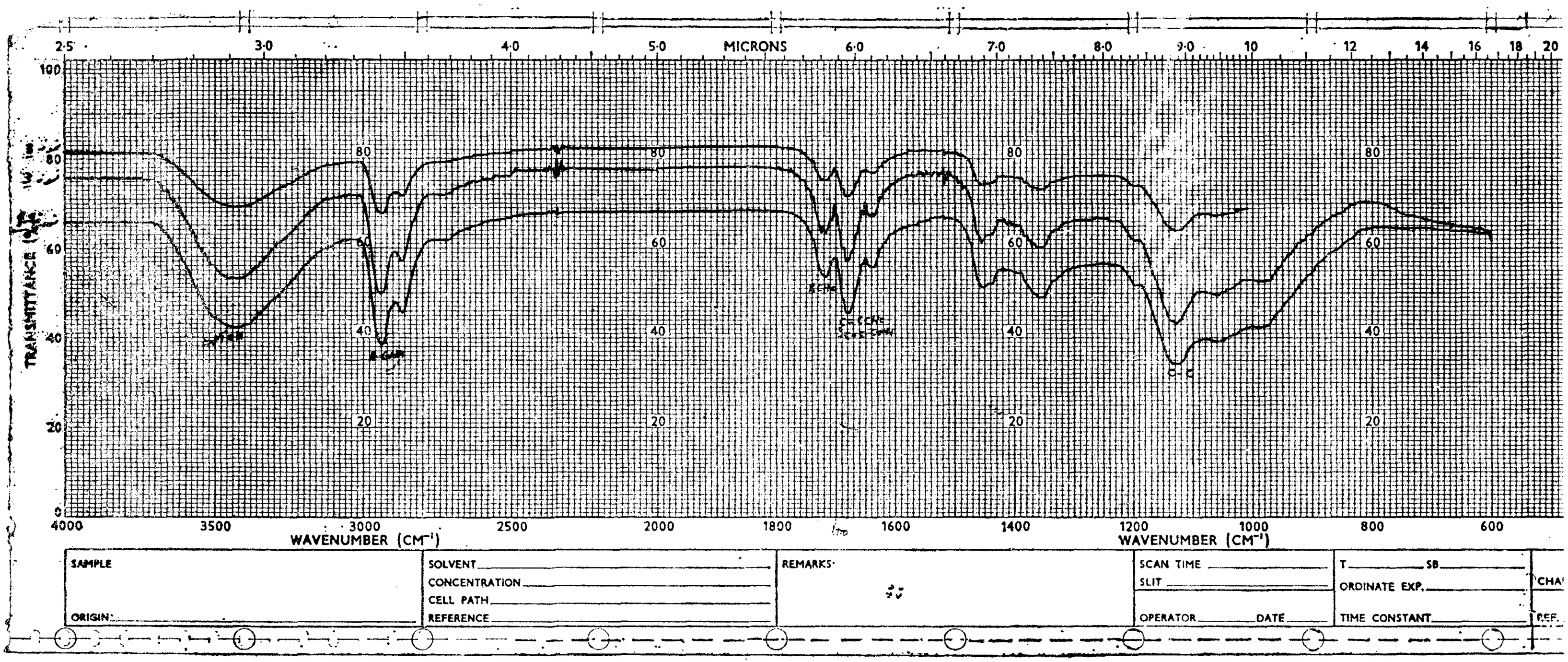
بحث ونتیجه‌گیری

ریزدانه‌های مورد استفاده که طبق روش (Margel, 1982) تهیه‌گردید آبدوست ودارای عوامل شیمیائی فعال هستند واین خصوصیات برای پوشیدن‌سطح آنها از پادتن‌امری ضروری است. حضورگروههای آلدئیدی موجود درریزدانه باطیف‌سنجی مادون قرمز و۲و ۴ دی‌نیتروفنیل هیدرازین مشخص شده است‌همانطورکه در شکل ۱ مشاهده می‌گردد طیف جذبی پلی‌گلوتارالدئید در Cm^{-1} ۱۷۲۰ و ۱۶۸۰ و ۱۶۳۵ به‌ترتیب مربوط به‌گروهها آلدئیدی غیرمزدوج، مزدوج پیونددوگانه کربن ـ کربن درموقعیت α نسبت به‌عامل آلدئیدی است. این‌گروهها‌احتمالا در اتصال‌بین پادتن‌با ریزدانه شرکت می کنند. تیتراسیون‌پادتن ضدگلبول قرمز تهیه شده در آزمایشگاه نشان داد که حتی تا ۱۶۰۰۰ بار رقیق شدن بازهم‌از خود فعالیت‌نشان می‌دهد. پروتئین اندازه‌گیری شده بااستفاده از اسپکتروفتومتر به‌میزان حدود ۳میلی‌گرم درهر میلی لیتربود.

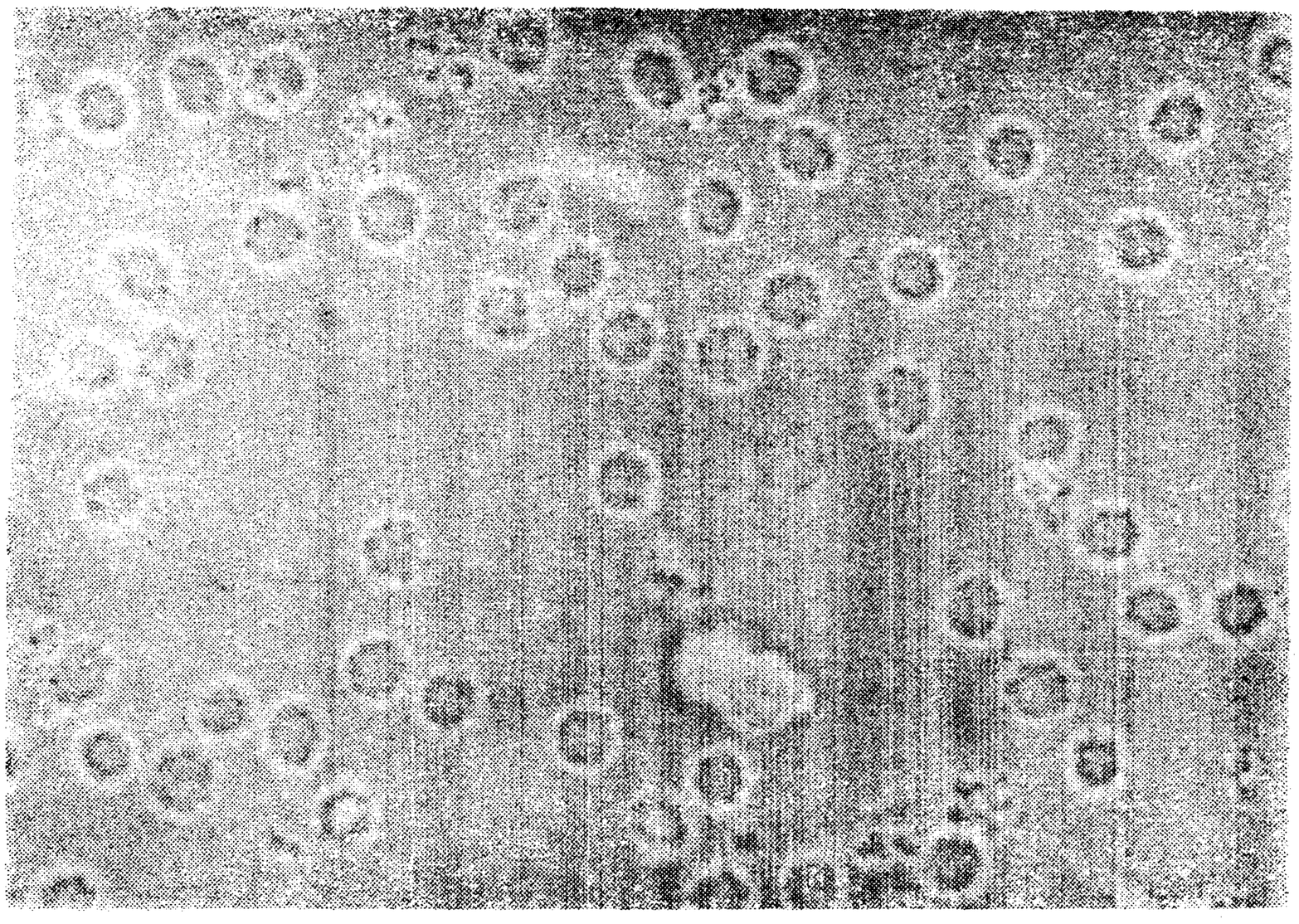
همانطورکه در شکل ۲مشاهده‌می‌شود ریزدانه‌های‌پادتن‌دار اطراف‌گلبولهای قرمز را بصورت هاله‌ای احاطه کرده‌اند. این‌امر نشان می‌دهد که اولا پادتن بخوبی به‌ریزدانه‌ها متصل شده‌است وثانیاً پادتن متصل شده از طریق‌گیرنده‌های سطح سلول قرمزخون باآن پیوند حاصل کرده‌اند. احتمالا اتصال پادتن به‌ریزدانه از طریق‌گروههای فعال آلدئیدی انجام‌می‌گیرد. ریزدانه‌های‌فلورسانت نیزباافزودن فلورسئین‌ایزوسیانات‌تهیه شدالبته باید یادآورشویم که اتصال ماده فلورسانت نیز ازطریق‌گروههای فعال‌آلدئیدی ریزدانه صورت می‌گیرد ولی تعداد این‌گروهها دررریزدانه بقدری زیاد است که بازهم به‌مقدار کافی‌ازآنها جهت‌اتصال پادتن‌آزادباقی می‌ماند.

آزمایشاتی که درمورد پادتن ضدبروسلا انجام‌گرفت نیزنتایج خوبی ببار آورد آگلوتیناسیون حاصله پس از مجاور قراردادن‌ریز دانه پادتن‌دار باپادگن حکایت ازاتصال ریزدانه وپادتن‌وهمچنین جمع‌شدن وپیوند این ترکیب باپادگن‌بروسلا است. نمونه‌ای‌ازاین آگلوتیناسیون در شکل ۳نشان داده شده است. ازاین‌خاصیت شاید بتوان جهت تشخصیص این بیماری باین‌ترتیب استفاده کرد که پادگن‌را در مجاورت ریزدانه قرارداد وترکیب حاصل را به‌سرم خون بیمار اضافه کرد. البته موفقیت‌دراین کار مستلزم آزمایشات متعددی علاوه برآزمایشاتی که برای استفاده ازریزدانه جهت هدف‌گیری سلولها در حال انجام می‌باشد درآن زمینه نیزانشاا... فعالیت را ادامه خواهیم داد.

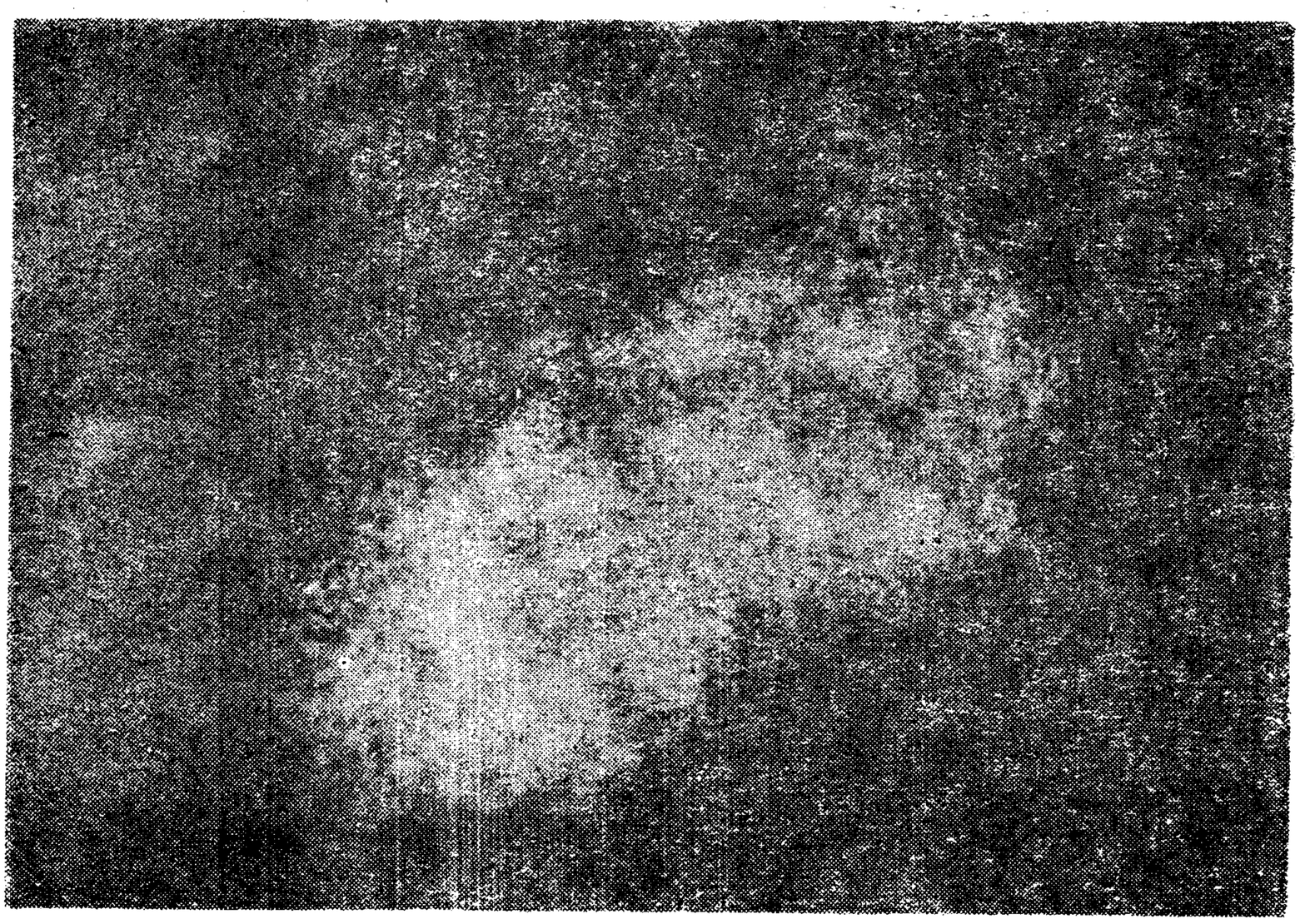
1- Beckman.



شکل ۱ـ طیف جذبی IR ریزدانه‌های پلی‌گلوتارالدئید بصورت فلورسانت (نمونه ۱)
و غیرفلورسانت (نمونه۳).



شکل ۲- گلبولهای قرمز انسانی محاصره شده توسط ریزدانه های پلی‌گلوتارالدئید فلورسانت.



شکل ۳- مشاهده آگلوتیناسیون هنگام مجاورت ریزدانه‌های دارای پادتن بروسلا با پادگن مربوطه.

References

Davies, D. A. L. and O'Neil, C. J. (1973). In vivo and invitro effects of tumor specific antibodies with chlorambucil, *Br. J. Cancer.* **28,** Suppl., 285-298.

Davies, D.A.L. Buckham, S. and Manston, A. J.(1974). Protection of mice against synigeneic lympho - omata : II, Collaboration between drugs and antibodies. *Br. J. Cancer.* **30,** 305 - 311.

Ehrlich, P. (1906). «*On the relation between chemical constitution distr, ibution and pharmocologicalaction*»., in : Collected Studies on Immunity, John - Wiley, London, Chap. 34.

Ghose, T. and Nigam, S. P. (1972). Antibody as carrier of chlorambucil. *Cancer.* **29,** 1398. - 1400.

Ghose, T. and Blair, A. M. (1978). Antibody - linked cytotoxic agents in the treatment of Cancer : Curreut status and future prospects, *J. Natl. Cancer Inst.* **61,** 657 - 676.

Margel, S. Zisblatt, S, and Rembaum, A. (1979). Polyglutaraldehyd:A new reagent for coupling- proteins to microspheres and for labeling cell-surface receptors. II Simplified labeling method by means of non - magnetic and magnetic polyglutaraldehyde microspheres, *J. Immunol. Methods.* **28,** 341 - 353.

Margel, S. and Rembaum, A. (1980). Synthesis and characterization of poly (glutaraldehyde). A potential reagent for protein immobilization aud cell separations, *Macromol.* **13,** 19 - 24.

Margel, S. (1982). Polyaldelyde microspheres as probes for cell membranes. *Ind. Eng. chem. Prod. Res. Dev.* **21,** 343 - 348.

Moolten, F, L. Capparell. N. J. and Cooperband. S. R. (1972). Antitumor effect of antibody - diphth - eria toxin conjugates : Use of hapten - coated tumor cells as an antigenic target. *J. Natl . Cancer Inst.* **49,** 1057 - 1062.

Rubens, R. D. and Dulbeco, R. (1974). Augmentation of cytotoxic drug action by antibodies directed at cell surface, *Nature.* **248,** 81 - 82.