مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
دوره ۲۸ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۵ صفحات ۹۶- ۹۱

تولید و خالص سازی آنتی بادی های پلی کلونال ضد لنفوسیت های انسان (ALG)

دکتر جعفر مجیدی: دانشیار ایمونولوژی، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
E-mail: majidij@tbzmed.ac.ir
جلال عبدالعلی زاده: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
مریم بنازاده امیرخیز: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
حنیف جوانمرد خامنه: کارشناس آزمایشگاه، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
بابک بیاض: تکنسین آزمایشگاه، بیمارستان امام، آزمایشگاه ایمونولوژی اختصاصی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
فاطمه حمزوی: تکنسین آزمایشگاه، بیمارستان امام، آزمایشگاه ایمونولوژی اختصاصی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
سعیده مجیدی: دانشجوی پزشکی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

دریافت: ۸۴/۷/۱۲، پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۳

چکیده

زمینه و اهداف: آنتی لنفوسیت گلوبولین(ALG)، آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در حیوانات مختلف از جمله خرگوش است که علیه مارکرهای سطحی لنفوسیت های انسان بوجود می آید. ALG یکی از عوامل سرکوبگر ایمنی است که در موارد بسیاری، از جمله برای جلوگیری از وازنش اعضاء پیوندی و خصوصاً درمان بیماری آنمی آپلاستیک بکار رفته است. این آنتی بادی منجر به حذف لنفوسیت های انسان از گردش خون محیطی، تنظیم فعالیت های سیتوتوکسیک و بروز مرگ برنامه ریزی شده سلولی در آنها می گردد. هدف از مطالعه حاضر تولید ALG در داخل کشور می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ابتدا لنفوسیت های ۲۰ فرد سالم با استفاده از فایکول ـ های پاک جداسازی گردیده و با یکدیگر مخلوط شدند. حدود ۴×۱۰^{۹} لنفوسیت به عنوان ایمونوژن از طریق رگ مارژینال (حاشیه ای) به خرگوش تزریق گردید. پس از تولید ALG به دنبال ایمونیزاسیون های مکرر نسبت به خالص سازی آن با استفاده از روش کروماتوگرافی تبادل یونی که روشی ساده، نسبتاً سریع و کم هزینه می باشد اقدام شد. سرم خرگوش ایمون با لنفوسیت های انسان، با آمونیم سولفات رسوب داده شد. رسوب غنی از ایمونوگلوبولین (ALG) پس از شستشوی مجدد با سولفات آمونیوم و دیالیز در برابر بافر نمکی فسفات به ستون تبادل یونی حاوی رزین دی اتیل آمینواتیل سفاروز برده شد. فراکسیون غنی از ALG طی مرحله نخست با عبور جریان بافر تریس ـ فسفات از ستون خارج گردید. فراکسیون دوم، حاوی باقیمانده ALG نیز با اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم از ستون تخلیص و خارج گردید.

یافته ها: کارآئی رقت $\frac{۱}{۴۰}$ از ALG تولید شده در مقایسه با ALG استاندارد، در قالب انجام تستهای سازگاری نسجی اثبات گردید. همچنین خلوص ALG تخلیص شده با روش SDS-PAGE در شرائط احیا به تایید رسید.

نتیجه گیری: با توجه به اینکه ALG تولید شده در رقت یک چهلم نیز همانند ALG استاندارد عمل می کند لذا می توان از آن به عنوان کنترل مثبت در انجام تستهای سازگاری نسجی به گستردگی استفاده نمود که این امر از لحاظ اقتصادی بسیار مقرون به صرفه و گامی در جهت خودکفایی کشور در زمینه تولید این محصول تلقی می گردد. بعلاوه از ALG خالص سازی شده می توان به عنوان داروی مهار کننده ایمنی استفاده نمود.

کلید واژه ها: تولید، خالص سازی، آنتی لنفوسیت گلوبولین (ALG)

مقدمه

لنفوسیت ها از مهمترین سلولهای دفاعی سیستم ایمنی بدن انسان می باشند که مسئول ویژگی و خاطره در پاسخهای ایمنی اکتسابی هستند. این سلولها در ارگانهای لنفاوی اولیه تولید و در بافتها و ارگانهای لنفاوی ثانویه وظیفه شناسایی و پاسخ به آنتی ژنهای بیگانه را بر عهده دارند. لنفوسیت ها به سه گروه اصلی شامل لنفوسیت های T، لنفوسیت های B و سلولهای کشنده طبیعی تقسیم می شوند (۱). در مطالعه حاضر آنتی لنفوسیت گلوبولین آنتی بادی پلی کلونال تولید شده در بدن خرگوش بر ضد لنفوسیتهای انسان می باشد. این آنتی بادی از کلاس IgG بوده و برای تولید آن، حیوان توسط لنفوسیت های انسانی تخلیص شده ایمن سازی می گردد (۲). آنتی لنفوسیت گلوبولین (ALG) از جمله عوامل سرکوبگر ایمنی است که از دهه ۱۹۶۰ تا کنون به طور گسترده، مستقلاً و یا در ترکیب با عوامل سرکوبگر ایمنی[1] دیگر برای جلوگیری از وازنش اعضاء پیوندی (۳) و پیوند مغز استخوان (۴)، درمان بیماری هائی مثل پیوند علیه میزبان(۵)، آنمی آپلاستیک حاد و غیر حاد (۷ و۶)، برخی سرطانها (۸) و بیماری های خود ایمنی (۹) بکار رفته است. بعلاوه از ALG به عنوان کنترل مثبت در تست های تعیین سازگاری نسجی بین دهنده و گیرنده پیوند مثل HLA-typing و WBC X match استفاده تشخیصی به عمل می آید. بنابراین کاربردهای درمانی متعدد به شرح فوق و نیز کاربردهای تشخیصی ALG، ضرورت بررسی، تحقیق و تولید ALG را در جهت خودکفایی می طلبد. مضافاً

1. Immunosupressive agents

ایـنکه بـه منظور پاستوریزاسیون و تخلیص نهایی برای تولید شکل دارویـی آنتـی لنفوسـیت گلوبولـین و انجام آزمایش های بعدی بر روی مدل های حیوانی، تولید و تخلیص ALG به عنوان ماده اولیه ضـروری اسـت. دانشـمندان تا کنون به طور کامل به فرآیند نحوه عملکـرد ALG پـی نبرده اند ولیکن مکانیسمهای مختلفی را برای نحـوه عملکرد این آنتی بادی جهت سرکوب ایمنی بر شمـرده اند کـه از آن جملـه می توان به پاکسازی لنفوسیتها از گردش خون و تنظـیم فعالـیت لانه گزینی و عملکردهای سیتوتوکسیک آنها اشاره نمود. ALG همچنین قادر به سرکوب فرآیند خون سازی از طریق تهـاجم بـه رده هـای سلولی خونساز (۴) و نیز کاهش شدید نیمه عمـر پلاکتها می باشد (۱۰). ALG از طریق لیز وابسته به کمپلمان، سـلولهای دندریتـیک را تخریب نموده و از تحریـک سلولـهای T بواسطه آنها جلوگیری می نماید (۱۱). آنتی لنفوسیت گلوبولین به عـنوان محـرک ایمنـی قادر است تولید لنفوکاین ها و فاکتور رشد خون ساز را تحت تاثیر قرار داده و مستقیما پیش سازهای خونی را تحـریک نمایـد. بـدین معنـی کـه مطالعات invitro نشان داده اند ALG یـک اثرمحـرک ایمنـی (ایمونواسـتیمولاتور) بر لنفوکاین ها داشـته و نیـز تولـید فاکـتورهای رشـد هماتوپوئیتـیک را تحریک مـی نمایـد، لـذا از ایـن طـریق مـی تـواند سـلولهای پـیش سـاز هماتوپوئیتـیک را مسـتقیماً تحریک نماید و منجر به افزایش پدیده هماتوپوئز گردد (۴).

ALG حـاوی آنتـی بـادی هـای سیتوتوکسـیکی علـیه برخی مارکـرهای سـطحی لنفوسـیت هـا همچـون LFA، CD2، CD3، CD4، CD8، CD25، CD44، CD45، HLA-DR (۱۳ و ۱۲) و نیز CD5، CD11a، CD18، CD28، و آنتی ژن های آلفا و بتای گیرنده سلول T می باشد (۱۴).

ایـن آنتـی بـادی بـا بـیان ملکـول Fas (CD95، Apo-1) می تواند باعث بروز مرگ سلولی در سلولهای T فعال شده بوسیله اینتـرلوکین ۲ گردد (۱۵). همچنین ALG اثری ضد تکثیری[1] روی سلولهای B دارد (۱۶). در مطالعه حاضر ALG در خرگوش تولید و با روش کروماتوگرافی تبادل یونی تخلیص گردید.

روشـهای مختلفـی برای تخلیص آنتی بادیها وجود دارد که از آنجملـه مـی توان به ژل فیلتراسیون (GF)، کروماتوگرافی گرایشی (AC)، HPLC، و غیـره اشـاره نمود. کروماتوگرافی تبادل یونی از جملـه روشـهایی اسـت کـه در مقایسـه بـا روش های فوق الذکر مـزایای مـتعددی را داراسـت کـه از آنجملـه می توان به سادگی، سـرعت خالص سازی و هزینه کمتر آن نسبت به روشهای پیچیده خالص سازی اشاره نمود. ژل مورد استفاده در این روش دی اتیل آمیـنو اتـیل سـفاروز بـوده است که یکی از بهترین ژل های مورد استفاده در کروماتوگرافی تعویض یونی است.

مواد و روش ها

۱۰ میلـی لیتر خون محیطی از هر یک از ۲۰ فرد سالم مراجعه کننده به آزمایشگاه جهت پیوند کلیه اخذ شد. نمونه خونی هر فرد بطـور جداگانه به ارلن مایر حاوی کلیپس پلاستیکی منتقل شده، به مـدت ۲۰ دقیقه روی دستگاه روتاتور قرار گرفت تا خون دفیبرینه تشـکیل گـردد. ۵ میلـی لیتـر از این نمونه خونی با ۵ میلی لیتر از محلـول هـنکس (HBSS ،pH=۷/۴) مخلـوط شـد. ۵ میلی لیتر از مخلـوط مذکـور بر روی ۳ میلی لیتر محلول فایکول ـ های پاک با دانسـیته ۱/۰۷۷ معلـق گـردید. پـس از سـانتریفوژ نمـودن خون دفیبرینه حاوی فایکول، لایه غنی از سلولهای خونی تک هسـته ای از آن جداسـازی شـد. نمـونـه لنفوسـیت های حاصل به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰g سانتریفوژ گردید و پس از شستشوی مجدد با بافر هنکس، تعداد سلولها بوسیله شمارشگر سلولی تعیین شده و در رقـت تقریبـی ۴×۱۰^{۹} سـلول در هـر میلـی لیتر برای تزریق به خرگوش آماده شدند.

لنفوسـیت هـای انسـانی در رقت تقریبی ۴×۱۰^{۹} سلول در هر میلـی لیتر، بمقدار یک میلی لیتر از طریق رگ مارژینال (حاشیه ای) به خرگوش سفید نژاد نیوزیلندی تزریق گردیدند. تزریقات دوم و سـوم در فواصـل سـه هفـته ای بـا همان رقت از سلولها صورت پذیـرفتند. دو هفته بعد از ایمونیزاسیون اول (اوج تشکیل IgM) و سـوم (اوج تشکیل IgG) خونگیری از خرگوش به عمل آمده سرم غنی از ALG مربوطه جداسازی شد. سنجش میزان تیتر سرمی در مقایسـه بـا ALG استاندارد (SANGSTAT, France) با استفاده از تست های سازگاری نسجی مثل تعیین نوع آنتی ژن های لکوسیتی انسـان مبتنـی بـر روش میکروسیتوتوکسیسـیتی مورد بررسی قرار گرفت. بدین ترتیب که یک میکرولیتر از لنفوسیت های فرد در ته چاهکهای پلیت تراساکی حاوی آنتی بادی های ضد آنتی ژن های مخـتلف لنفوسـیتی اضـافه گـردید. در تـه چاهـک حاوی ALG تولـیدی و استاندارد نیز یک میکرولیتر از لنفوسیت های فرد اضافه شـد. پـس از انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه، کمپلمان خرگوش به مقـدار ۵ میکرولیتـر در هـر چاهـک اضافه و به مدت ۱/۵ ساعت انکـوبه گـردید. در نهایـت ائوزین و فرمالین در چاهک ها افزوده شـد و ۲۴ ساعت بعد در زیر میکروسکوپ معکوس مورد بررسی قـرار گـرفت. خونگیری از قلب خرگوش ایمون با لنفوسیت های انسـان بعمـل آمـد و سـرم خـون پس از جداسازی، با بافر نمکی فسفات (PBS ،pH=۷/۴) به نسبت ۱:۱ رقیق سازی شد.

رسوبدهی با سولفات آمونیوم:

بـه مـنظور رسـوبدهی ایمونوگلوبولـین هـای سـرمی، سـرم خـرگوش ایمـون بوسـیله سولفات آمونیوم اشباع در غلظت نهایی ۵۰٪ رسـوب داده شـد. مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه با دور g ۲۰۰۰ سـانتریفوژ گـردید و سـپس فراکسـیون غنـی از ALG دو بـار بـا سـولفات آمونـیوم ۵۰٪ شستشـو داده شـد. بـرای حـذف نمـک سـولفات آمونـیوم فراکسـیون غنـی از ALG تولـید شـده در بدن خرگوش به مدت یک شب در برابر بافر نمکی فسفات (pH=۷/۴) دیالیـز گـردید. فراکسـیون سرمی غنی از ALG با حجم تقریبی ۳ میلـی لیتـر بـه سـتون تـبادل یونی حاوی رزین دی اتیل آمینواتیل سفاروز با سرعت بالا (فارماسیا) که با بافر تریس- فسفات (تریس

1. Antiproliferative

۴۰ mM و فسفات ۲۵ mM، pH=۸/۱) متعادل شده بود برده شد. با عبور جریان بافر کار فراکسیون اول حاوی ALG تخلیص شده از ستون خارج گردید. فراکسیون دوم نیز با اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم تخلیص و از ستون تخلیه شد. به این منظور از جریان بافر کار حاوی ۵۰ mM کلرید سدیم استفاده شد.

جذب نوری نمونه های تخلیص شده توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۲۸۰nm قرائت شد و میزان غلظت پروتئین تخلیص شده در نمونه های با جذب بالای ۰/۱ برای هر فراکسیون محاسبه گردید (۱۷). این نمونه ها مخلوط شده و پس از رسوبدهی با سولفات آمونیوم در یخچال در دمای 4°+ سانتیگراد نگهداری شدند.

الکتروفورز پروتئین ها بر اساس روش Laemmli (۱۸) در حضور ۲- مرکاپتواتانول انجام گرفت. به این منظور از ژل پلی اکریلامید ٪۱۲ استفاده شد. چهار حجم نمونه تخلیص شده از هر فراکسیون به یک حجم از بافر نمونه (5x) افزوده شده و مخلوط به مدت ۵ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد جوشانیده شد. به هریک از چاهک های ژل مقدار ۱۵ میکرولیتر از هر نمونه اضافه گردید.به چاهک انتهائی نیز از مارکرهای با وزن ملکولی کم (فارماسیا) افزوده شد. الکتروفورز در ولتاژ ثابت تا رسیدن نوار سرمه ای رنگ بروموفنل به انتهای ژل ادامه یافت. سپس ژل با استفاده از رنگ آبی کوماسی G-250 (فارماسیا) رنگ آمیزی شد.

یافته ها

پس از ایمن سازی خرگوش با لنفوسیتهای انسان در مرتبه نخست، آنتی لنفوسیت گلوبولین پلی کلونال از کلاس IgM حاصل گردید که تیتر $\frac{1}{20}$ آن همانند نمونه استاندارد در سنجش میکروسیتوتوکسیسیتی قادر به لیز نمودن لنفوسیت ها بود.

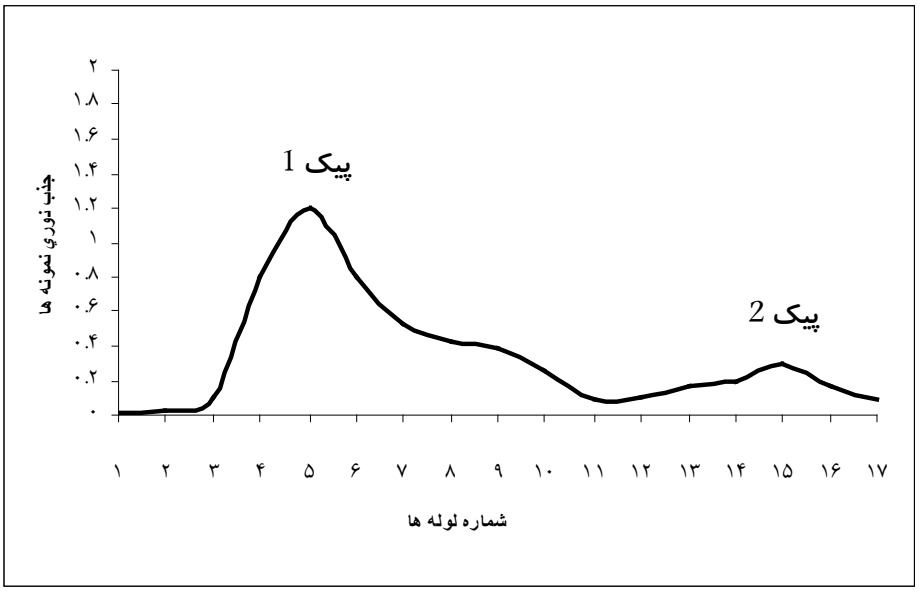
مراحل دوم و سوم ایمونیزاسیون نیز منجر به تولید ALG از کلاس IgG گردید که پس از ۴۰ بار رقیق سازی نیز بخوبی ALG استاندارد قادر به لیز نمودن لنفوسیتهای انسان بود. تیتر آنتی بادی تولیدی طی فرآیند تولید ۲ مرتبه افزایش نشان داد که این امر حاکی از ایمونیزاسیون مناسب و موثر حیوان طی تزریقات متوالی بود.

طی فرایند خالص سازی، اعمال جریان بافر تریس ـ فسفات باعث تخلیص و خروج حدود ۱۵ میلی گرم ALG در قالب فراکسیون اول از ستون تبادل یونی گردید.

همچنین اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم ۵۰mM مقدار ۲ میلی گرم دیگر از پروتئین تخلیص شده را از ستون خارج نمود. لذا در مجموع حدود یک سوم مخلوط پروتئینی ناخالص برده شده به ستون یعنی حدود ۱۷ میلی گرم ALG تخلیص شده از ستون خارج گردید. در مجموع دو قله[1] پروتئینی در فرآیند خالص سازی قابل مشاهده بود (شکل ۱).

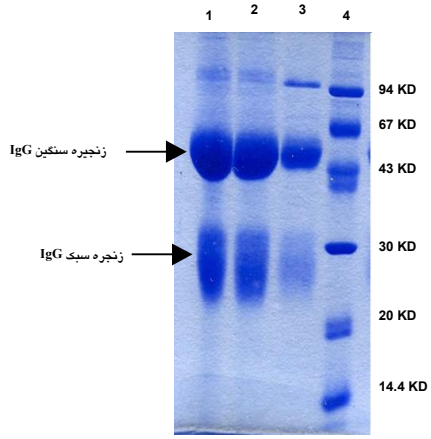
بررسی الگوی الکتروفورز پروتئین در شرائط احیا نشان داد که پروتئین تخلیص شده عمدتاً شامل یک باند پلی پپتیدی مشخص در محدوده وزن ملکولی ۵۰ کیلو دالتون و یک باند منتشر در محدوده وزن های ملکولی ۲۰ الی ۳۰ کیلودالتون است که به ترتیب مربوط به زنجیره های سنگین و سبک IgG خرگوش می باشند (شکل۲). تقریباً هیچگونه ناخالصی واضحی در فراکسیون اول (بافر کار) دیده نمی شود که حاکی از خلوص بسیار بالای ALG تخلیص شده می باشد.

همچنین کارآئی آنتی لنفوسیت گلوبولین تولید شده در قالب انجام تست های سازگاری نسجی از جمله تعیین نوع آنتی ژن های لکوسیتی انسان به عنوان کنترل مثبت و در مقایسه با ALG استاندارد به تایید رسید.



شکل ۱: منحنی جذب نوری نمونه های ALG خارج شده از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی حاوی DEAE-Sepharose 6B در طول موج ۲۸۰ نانومتر؛ پیک اول مربوط به فراکسیون اول (بافر کار تریس ـ فسفات pH=۸/۱)، پیک دوم مربوط به فراکسیون دوم (بافر کار حاوی ۵۰NaCl میلی مولار)

1. Peak



شکل ۲: آنتی لنفوسیت گلوبولین تخلیص شده با گروماتوگرافی تعویض یونی در شرایط احیا
ستون ها ی ۱و۲: فراکسیون اول (بافر کار تریس – فسفات pH=۸/۱)،
ستون ۳: فراکسیون دوم (بافر کار بهمراه NaCl ۵۰ میلی مولار)
ستون۴: مارکرهای وزنی

بحث

در مطالعـه حاضـر، آنتـی بادی پلی کلونال ضد لنفوسیت های انسـان (ALG) در خـرگوش تولید و با روش کروماتوگرافی تبادل یونـی روی ژل دی اتـیل آمیـنو اتـیل سـفاروز 6B خالص سازی گردید.

ALG ماهیـتاً از جمله عوامل سرکوبگر سیستم ایمنی است که سـالها بـرای درمـان آنمی آپلاستیک حاد، رد پیوند اعضاء، بیماری پیوند علیه میزبان، و برخی بیماری های خود ایمنی بکار رفته است (۹-۳). همانگـونه کـه ذکـر گـردید در جریان فرآیند تولید ALG رقـت های $\frac{۱}{۲۰}$ و $\frac{۱}{۴۰}$ سرم خرگوش ایمون با لنفوسیتهای انسان به فاصـله دو هفـته پـس از تـزریقات اول و سـوم مانند نمونه ALG اسـتاندارد قـادر بـه لیـز نمـودن لنفوسیت ها بود. همچنین ۲ مرتبه افـزایش در تیتـر آنتـی بادی تولیدی حین فرآیند تولید نشان دهنده تزریقات موثر با فواصل زمانی مناسب بود که این امر در تولید انبوه آنتـی بـادی هـای پلـی کلونال از اهمیت فوق العاده ای برخوردار اسـت. در مطالعـه حاضر حداقل ۵۰ میلی لیتر سرم غنی از ALG در هـر بـار خونگیری از خرگوش بدست آمد که با اعمال ضریب رقـت $\frac{۱}{۲۰}$ و $\frac{۱}{۴۰}$ حـدود ۱ لیتـر آنتی لنفوسیت گلوبولین با ماهیت IgM و۲ لیتر آنتی لنفوسیت گلوبولین با ماهیت IgG می توان از هر خـرگوش تهـیه نمـود. ایـن فـرآیند از لحاظ اقتصادی فوق العاده مقرون به صرفه و تولید بهینه محسوب میگردد.

در ایـن مطالعـه پـس از تخلـیص در فراکسیون اول (بافر کار تـریس ـ فسفات pH=۸/۱)، پروتئینی با غلظت بالای ۹۸٪ حاصل گـردید کـه خلوص آن توسط روش SDS-PAGE به تأیید رسید. در فراکسـیون هـای بعدی (بافر کار بعلاوه NaCl ۵۰ میلی مولار) مقادیر دیگری از پروتئین های باند شده به ستون خارج گردید. از آنجـا کـه پـروتئین جداشـده قابـل تـوجه نیسـت و بعلاوه دارای خلـوص بـالا (نسبت به فراکسیون اول) نیست، از اینرو استفاده از بافـر کـار بـرای خـالص سازی IgG خرگوش کافی است و دیگر نیازی به استفاده از اعمال غلظت پلکانی NaCl برای تخلیص بیشتر نیسـت. همچنـین ثابـت شد که پروتئین ۵۰ کیلودالتونی تخلیص شـده آنتـی لنفوسـیت گلوبولـین تولـید شده در بدن خرگوش، با ماهـیت IgG بوده است. همچنین کارآئی این آنتی بادی به عنوان کنتـرل مثـبت در مقایسـه با ALG استاندارد در تستهای سازگاری نسجی به تأیید رسید.

نـتایج بدسـت آمده همانند تجربیات پیشین حاکی از آن است کـه روش کروماتوگرافـی تبادل یونی که اساس آن اتّصال برگشت پذیر ملکولهای باردار محلول به گروه های ثابت تبادلگر یونی با بار مخالف است، روشی مناسب برای تخلیص آنتی بادی ها با ماهیت IgG اسـت (۱۹). این روش در مقایسه با برخی از روشهای دیگر همچون کروماتوگرافی تمایلی روی پروتئین A و پروتئین G، و ژل فیلتراسیون آسان و کم هزینه می باشد.

اسـتفاده از دی اتـیل آمیـنو اتـیل سفاروز با سرعت بالا بعنوان تبادلگر آنیونی برای انجام فرآیند خالص سازی گزینه مناسبی است چـرا کـه ایـن تبادلگـرها بـا توجه به ساختار آگاروزی و اتصالات عرضـی موجـود در آن و همچنـین محدوده وسیع pH عملکردی (۲ الی ۹)، برای استفاده در ستون تبادل یونی بسیار مناسب هستند. ایـن تبادلگـر جـذب غیراختصاصی بسیار ضعیفی داشته و آلودگی های میکروبی در آن مشاهده نمی شود. همچنین پایداری شیمیائی و فیزیکـی، ایـن ژل را کاندیـد مناسبی برای استفاده در امر خالص سازی می کند (۲۰).

از سـوی دیگـر یافـته ها نشان داد اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم در محدوده ای بین صفر تا صد میلی مولار قادر است حجم نسبتاً کمتری از پروتئین های خارج نشده از ستون طی شرایط اولیه

را تخلیص و تخلیه نماید. در جریان این عمل، تغییر قوای یونی بافر تریس ـ فسفات در pH ثابت (که بطور معمول ۰/۵ تا ۱ واحد بالاتر از نقطه ایزوالکتریک IgG در نظر گرفته می شود و در جریان کار روی ۸/۱ تثبیت شد) باعث گسسته شدن بسیاری از اندرکنش های موقتی بین یونهای با بار مخالف شده و آنچنانکه در مورد فراکسیون دوم با اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم ۵۰mM مشاهده شد، بخش دیگری از IgG را از ستون تخلیه نمود. به این ترتیب می توان گفت روش اعمال غلظت پلکانی نمک در مقایسه با روش پیچیده وپرهزینه اعمال شیب pH ، ساده تر و سریع تر عمل می نماید (البتّه این نکته هنگامی صادق است که مراحل مختلف خالص سازی منجمله رسوبدهی، آماده سازی نمونه و خالص سازی روی ستون تبادل یونی با دقت کامل انجام گیرند).

شایان ذکر است که خالص سازی اولیه و مقدّماتی سرم حاوی ALG از طریق رسوبدهی با سولفات آمونیوم ٪۵۰ و دیالیز فراکسیون نمکی در برابر بافر فسفات کمک قابل توجهی به حذف ناخالصی های عمده، پیش از انجام خالص سازی اصلی روی ستون تبادل یونی، نمود. به نظر می رسد تیمار مقدماتی[1] نمونه سرمی خرگوش به نوبه خود درصد خلوص نمونه را افزایش می دهد و در همراهی با مراحل بعدی شامل خالص سازی روی ستون تبادل یونی دی اتیل آمینو اتیل ـ سفاروز و اعمال غلظت پلکانی کلرید سدیم، یک فرآیند جامع خالص سازی موفق را شکل می دهند که محصول نهائی آن ایمونوگلوبولینی با درصد خلوص بالا است (۱۹). بعلاوه نتایج نشان می دهند که خالص سازی مقدماتی مناسب و نیز تخلیص با کیفیت و دقیق فراکسیون نخست، نیاز به اعمال غلظت پلکانی در مراحل متعدد و با غلظتهای متفاوت را مرتفع می سازند.

ALG تولیدی وتخلیص شده برای استفاده به عنوان کنترل مثبت در تست های سازگاری نسجی همچون تعیین نوع آنتی ژن های لنفوسیتی انسان و کاربردهای مطالعاتی، تحقیقاتی و آزمایشگاهی دیگر مناسب و کارآمد بوده و با لحاظ این نکته که ALG تولیدی در مقایسه با مشابه خارجی کیفیت و کارآئی بالا و قابل قبولی دارد می توان از روش مورد استفاده در انجام این تحقیق برای تولید و تخلیص ALG با خلوص بالا، با صرف هزینه کمتر و زمان کوتاه تر بجای تحمیل هزینه های گزاف به مراکز تحقیقاتی و درمانی برای خرید نمونه های مشابه خارجی با قیمتهای کلان، بهره گرفت.

تقدیر و تشکر

نگارندگان بر خود لازم می دانند از کارشناسان آزمایشگاه ایمونولوژی مرکز آموزشی و درمانی امام خمینی (ره) تبریز که در جداسازی لنفوسیت ها با فایکول همکاری بی شائبه داشته اند، صمیمانه قدردانی نمایند.

References

1. Lydyard P, Whelan A, Fanger MW. *Immunology-Instant Notes.* 2nd ed. Guildford-UK, BIOS Scientific 2004; P: 41-46.
2. Konomi K, Deodhar SD. Preparation and purification of horse antihuman lymphocyte globulin (ALG). *Cleve Clin Q* 1968; **35**(4): 199-205.
3. Di Filippo S. Anti-IL-2 receptor antibody vs polyclonal anti-lymphocyte antibody as induction therapy in pediatric transplantation. *Pediatr Transplant* 2005; **9**(3): 373-80.
4. Marsh JC, Gordon-Smith EC. The role of antilymphocyte globulin in the treatment of chronic acquired bone marrow failure. *Blood Rev* 1988; **2**(3): 141-8.
5. Bacigalupo A. Antilymphocyte / thymocyte globulin for graft versus host disease prophylaxis: efficacy and side effects. *Bone Marrow Transplant* 2005; **35**(3): 225-31.
6. Leong KW, Teh A, Bosco JJ, Jayaranee S, Sadat U. Anti-lymphocyte globulin therapy in aplastic anaemia-a university hospital experience. *Med J Malaysia* 1995; **50**(2): 158-61.
7. Locasciulli A, Bruno B, Rambaldi A, Saracco P, Dufour C, Finelli C, et *al*. Treatment of severe aplastic anemia with antilymphocyte globulin, cyclosporine and two different granulocyte colony-stimulating factor regimens: a GITMO prospective randomized study. *Haematologica*; **89**(9): 1054-61.
8. Aivado M, Rong A, Stadler M, Germing U, Giagounidis A, Strupp C, *et al.* Favorable response to antithymocyte or antilymphocyte in low-risk myelodysplastic syndrome patients with a 'non-clonal' pattern of X-chromosome inactivation in bone marrow cells. *Eur J Haematol* 2002; (4): 210-6.
9. Abdulkadyrov KM, Bessmel'tsev SS. Immunological and rheological parallels in patients with autoimmune thrombocytopenic purpura treated with antilymphocyte globulin. *Klin Med (Mosk)* 1990; **68**(6): 49-53.
10. Gratama JW, Brand A, Jansen J, Zwaan FE, Valentin RM, Eernisse JG. Factors influencing platelet survival during antilymphocyte globulin treatment. *Br J Haematol* 1984; **57**(1): 5-15.
11. Monti P, Allavena P, Di Carlo V, Piemonti L. Effects of anti-lymphocytes and anti-thymocytes globulin on human dendritic cells. *Int Immunopharmacol* 2003; **3**(2): 189-96.
12. Bourdage JS, Hamlin DM. Comparative polyclonal antithymocyte globulin and antilymphocyte / antilymphoblast globulin anti-CD antigen analysis by flow cytometry. *Transplantation* 1995; **59**(8): 1194-200.
13. Raefsky EL, Gascon P, Gratwohl A, Speck B, Young NS. Biological and immunological characterization of ATG and ALG. *Blood* 1986; **68**(3): 712-719.

1. Pretreatment

14. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991; **51**(3): 669-673.
15. Genestier L, Fournel S, Flacher M, Assossou O, Revillard JP, Bonnefoy-Berard N. Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antilymphocyte globulins. *Blood* 1998; **91**(7): 2360-2368.
16. Bonnefoy-Berard N, Flacher M, Revillard JP. Antiproliferative effect of anti-lymphocyte globulins on B-cells and B-cell lines. *Blood* 1992; **79**(8): 2164-2170.
17. Delves PJ. Measuring antibody concentration by UV adsorbence In: Wiley NY, Antibody application, essential techniques series. 1995; 16-17.
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
19. Stec J, Bicka L, Kuzmak J. Isolation and purification of polyclonal IgG antibodies from bovine serum by high performance liquid chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy* 2004; **48**: 321-327.
20. Amersham pharmacia biotech Ion Exchange Chromatography, Principles and Methods 2003; 46-48.