

تهیه و تخلیص IL-2 از محیط کشت سلولهای Jurkat

مریم نوری زاده، دکتر جمشید حاجتی، مریم حسینعلی ایزد، دکتر طاهره موسوی شبستری
گروه ایمنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

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

مواد و روشها: در تحقیق حاضر که هدف آن، تولید و جداسازی IL-2 می‌باشد، از یک رده 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 میتوزن و مدت زمان تحریک سلولها در تولید بهینه 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 پروتئین آن سنجیده شد و در نهایت جهت اندازه‌گیری میزان IL-2 تولید شده از روش الیزا 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 استفاده 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 اولیه 10^5 cell/ml در روز سوم به غلظت مطلوب برای تحریک یعنی 10^7 می‌رسند. مطابق نمودار پیک منحنی رشد سلول‌ها در روز پنجم می‌باشد. میزان IL-2 تولید شده تحت تأثیر ConA با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ و PMA با غلظت 10 ng/ml و مدت زمان تحریک ۲۲-۲۰ ساعت بیش از سایر موارد می‌باشد و در صورت لزوم می‌توان بجای ConA از PHA با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ نیز استفاده کرد.

نتیجه‌گیری و توصیه‌ها: این مطالعه بدلیل استفاده از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جداسازی و عدم دسترسی به مقادیر زیادی از آنتی‌بادی 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.

مقدمه

اینترلوکین ۲ (IL-2) که سابقاً بعنوان فاکتور رشد سلول‌های T (TCGF) شناخته می‌شد، در سال ۱۹۷۶ توسط مورگان و همکارانش در محیط کشت لئوسیت‌های 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 لئوسیت‌های T کمکی (T helper) تحریک شده با آنتی ژن یا میتوزن ترشح شده و با اثر اتوکراین و پاراکراین موجب تحریک رشد و تمایز سلولهای دارای گیرنده IL-2 و بروز پاسخ در آنها میگردد (۱). تعیین ویژگی‌های ملکولی و عملکردی IL-2 همانند سایر سایتوکاین‌ها بعلاوه مقادیر بسیار کم و مشکلات فراوان در تخلیص آنها به آسانی امکان پذیر نبوده است. با کشف لاین‌های سلولی تولید کننده IL-2 از جمله سلول‌های Jurkat که از رده 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 CTL-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 تعیین ویژگی‌های ساختاری، آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی علیه آن را نیز تهیه کنند (۲). آنالیز بیوشیمیایی ملکول تخلیص شده نشان داد که ملکول IL-2 گلیکوپروتئینی هیدروفوب با وزن ملکولی ۱۵/۵ کیلوالتون و pH ایزوالکتریک حدود ۶/۵

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 (۴). تهیه مقادیر زیاد IL-2 راه را برای استفاده درمانی از آن هموار نمود بطوری که در سالهای اخیر این سایتوکاین بعنوان یکی از عوامل مؤثر در درمان سرطانها از جمله ملانوما، کارسینوما سلول‌های کلیه، لمفوما غیر هوچکین و کارسینوما گسترش نیافته کلون، شناخته شده است (۴، ۵). همچنین از IL-2 بعنوان ادجوانت در تهیه برخی واکسنها استفاده می‌شود (۶). در ضمن مصرف IL-2 طبیعی نسبت به نوترکیب عوارض جانبی کمتری ایجاد می‌کند. یکی دیگر از مضارفات 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 رشد تصاعدی سلولها جهت تحریک یا فریز نمودن آنها بسیار اهمیت دارد. بدین منظور سه غلظت 10^4 ، 3×10^4 ، 10^5 cells/ml از سلول‌های Jurkat به مدت ۸ روز کشت داده شد و پس از ۲۴، ۴۸، 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:

$$\text{Viability} = \frac{\text{سلول‌های زنده}}{\text{سلول‌های زنده} + \text{سلول‌های مرده}} \times 100$$

بدین ترتیب یک تخلیص جزئی صورت گرفت. پس از آن محلول خروجی حاوی مولکول‌های با وزن مولکولی KD ۳۰ و کوچکتر از آن با فیلتر ۱۰ PM تغلیظ گردید بطوریکه مولکول‌های اضافی کوچکتر از KD ۱۰ خارج شده و محلول باقیمانده شامل مولکول‌های بین ۱۰ و ۳۰ KD خواهد بود.

ج) تغلیظ با استفاده از centrprep: اساس این وسیله جداسازی مولکول با فیلتراسیون تحت تأثیر سانتریفوژ با دور بالا می‌باشد. در این آزمایش از centrprep با فیلتر YM-3 که مولکول‌های با اندازه 10KD و کوچکتر را از خود عبور داده و مولکول‌های درشت‌تر را در محفظه داخلی نگه می‌دارد استفاده شده است. بنابراین محلول موجود در محفظه داخلی در 20°C نگهداری گردید.

د) تغلیظ با دستگاه concentrator: این دستگاه که نام دیگر آن speed vacuum می‌باشد همانند یک میکروفیوژ عمل می‌کند و با 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 ۸۵ برابر تغلیظ شد.

۳. سنجش پروتئین: در روش برادفورد سنجش پروتئین بر اساس اتصال رنگ به پروتئین‌های محلول انجام می‌شود. حساسیت این روش ۲۰۰-۲۵ میکروگرم پروتئین در میلی لیتر می‌باشد. در روش برادفورد ۱ml از محلول working برادفورد با ۱۰۰ ml از نمونه مجهول و استاندارد به مدت ۱ دقیقه مخلوط شده و میزان جذب آنها در طول موج nm ۵۹۵ توسط اسپکتروفتومتر خوانده می‌شود، سپس با رسم منحنی استاندارد و در دست داشتن میزان جذب محلول‌های استاندارد می‌توان غلظت پروتئین نمونه‌ها را بدست آورد.

۴. تایید وجود IL-2 با استفاده از SDS-PAGE: در این مرحله از ژل انبار کننده ۳٪ و ژل جدا کننده ۱۲/۵٪ استفاده شد. انتخاب حجم نمونه‌ها بر اساس غلظت بدست آمده از

ب) روش تحریک کردن سلول‌ها: به منظور تعیین بهترین غلظت میتوزن، سلول‌ها به تعداد اولیه 10^6 cells/ml در محیط کشت RPMI-1640 حاوی 100 u/ml پنی سیلین و $100 \text{ } \mu\text{g/ml}$ استرپتومایسین و 0.3 mg/ml L-گلوتامین به اضافه ۱۰٪ FCS در پلیت ۹۶ خانه کشت داده شدند و در روز سوم که طبق نمودار منحنی رشد لگاریتمی به تعداد 10^6 cells/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 ۲۲ ساعت جمع‌آوری گردید. به منظور دستیابی به زمان مناسب جمع‌آوری محیط رویی، سلول‌ها در شرایط مشابه، با 10 ng/ml conA و $20 \text{ } \mu\text{g/ml}$ PMA تحریک شده و پس از ۲۴، ۲۲، ۲۰، ۱۸، ۱۶ ساعت سوپرناتانت آنها جمع‌آوری گردید. در نهایت میزان IL-2 سوپ حاصل از هر دو پلیت با کیت الایزای IL-2 اندازه‌گیری شد.

۲. تغلیظ مایع رویی حاصل از تحریک سلول Jurkat: برای این منظور چند روش در مقیاس کم مورد ارزیابی قرار گرفت. (تمام مراحل تغلیظ در دمای 4°C انجام گرفته است.)

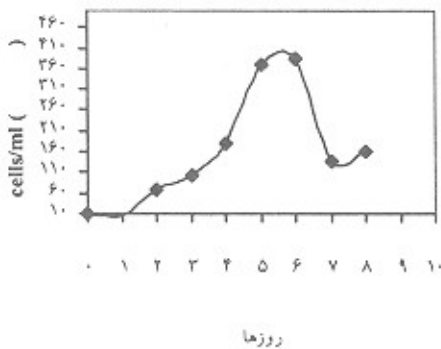
الف) تغلیظ با روش salting out: در این روش از نمک سولفات آمونیوم اشباع در دو مرحله استفاده شد. ابتدا رسوب‌گذاری با محلول نمک اشباع ۳۵٪ به منظور جداسازی مولکول‌های درشت مانند PHA و سپس رسوب‌گذاری محلول رویی حاصل از مرحله اول با محلول نمک اشباع ۸۵٪ به منظور جداسازی مولکول‌های کوچک مانند IL-2 انجام گرفت که رسوب حاصل جمع‌آوری و در بافر PBS حل شد و برای انجام SDS-PAGE در 20°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 مولکول‌هایی که کوچکتر از منافذ فیلتر می‌باشند با فشار عبور کرده و مولکول‌های درشت تر باقی می‌مانند. به منظور دستیابی به مولکول‌هایی با وزن مولکولی ۳۰KD و کمتر ابتدا از فیلتر ۳۰ PM استفاده شد و

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 ($10 \mu\text{l/well}$ MTT با غلظت 5 mg/ml) جهت ارزیابی میزان رشد و تکثیر لنفوبلاست‌ها انجام می‌گیرد و پس از ۴ ساعت OD آن در 570 nm 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 اولیه 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.



نمودار ۱- منحنی رشد لگاریتمی سلول‌های JURKAT با غلظت اولیه 10^5 cell/ml در طی ۸ روز کشت متوالی

۲- نتایج حاصل از بررسی میزان تولید IL-2 توسط

تست الیزا:

۲-۱- تأثیر غلظت‌های متفاوتی از دو میتوزن 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 $\mu\text{g/ml}$ ۲۰ و PMA با غلظت 10 ng/ml و مدت زمان تحریک ۲۲-۲۰ ساعت بیش از سایر موارد می‌باشد و در صورت لزوم می‌توان بجای ConA از PHA با غلظت $1 \mu\text{g/ml}$ نیز استفاده کرد.

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 دویار تقطیر + 0.1% TFA و بافر B: استونیتریل + 0.05% TFA سرعت عبور بافر^۱ از ستون 0.8 ml/min و گرادیان خطی عبور بافر ۸۰٪ می‌باشد. $10 \mu\text{l}$ از نمونه استاندارد با غلظت 35 U/ml به ستون تزریق شد و پیک IL-2 استاندارد در دقیقه ۲۴ و هنگام عبور ۶۰-۵۰ درصد از بافر B مشاهده و رسم گردید. سپس $50 \mu\text{l}$ از نمونه مجهول به ستون تزریق و پیک آن در دقیقه ۶۲ مشاهده شد. جهت تطابق پیک‌های استاندارد و نمونه مجهول co-chromatography 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 دهنده 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:

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

۶. 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 $2 \times 10^6 \text{ cells/ml}$ از لنفوسیت‌های خون محیطی با ۱٪ PHA به مدت ۷۲ ساعت در محیط حاوی ۵٪ FCS و $5 \times 10^{-5} \text{ 2-ME}$ تحریک شوند. سپس لنفوبلاست‌های بدست آمده به تعداد cells/ml

¹ flow rate

جدول ۱- نتایج اثر غلظت‌های مختلف PHA و ConA 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
۱	-	-	-	۰/۱۰۴	۰
۲	-	۱۰	۵	۰/۱۹۰	۲۰۰۰
۳	-	۱۰	۱۰	۰/۱۹۵	۲۱۵۰
۴	-	۱۰	۲۰	۰/۱۹۵	۲۱۵۰
۵	-	۱۰	۵۰	۰/۲۰۹	۲۲۵۰
۶	-	۲۰	۵	۰/۲۱۴	۲۶۵۰
۷	-	۲۰	۱۰	۰/۲۳۷	۲۸۰۰
۸	۱/۵	-	۱۰	۰/۱۵۶	۱۴۷۰
۹	۱	-	۱۰	۰/۲۰۰	۲۲۰۰

جدول ۲- نتایج حاصل از اثر زمان‌های مختلف تحریک سلول‌های JURKAT در تولید IL-2

مدت زمان تحریک سلول‌ها	جذب نوری	غلظت IL-2
بدون میتوزن پس از ۲۰ ساعت	۰/۰۲۵	۰
۱۶ ساعت پس از تحریک	۰/۲۷۵	۴/۵
۱۸ ساعت پس از تحریک	۰/۲۹۸	۵
۲۰ ساعت پس از تحریک	۰/۳۹۸	۷/۹
۲۲ ساعت پس از تحریک	۰/۳۹۵	۷/۸
مدت زمان تحریک سلول‌ها	جذب نوری	۶/۵

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

نمونه‌ها	غلظت IL-2 (Pg/ml)
قبل از تغلیظ	۱۵
ملکول‌های کوچکتر از ۱۰ کیلو دالتون	۰
بعد از تغلیظ (رقیق نشده)	۱۹۰
بعد از تغلیظ (۲ برابر رقیق شده)	۱۲۰
بعد از تغلیظ (۱۰ برابر رقیق شده)	۲۵
بعد از تغلیظ (۱۰۰ برابر رقیق شده)	۰

جدول ۴- میانگین جذب و غلظت نمونه‌ها با روش برادفورد

نمونه‌ها	جذب نوری	غلظت IL-2	فاکتور رقت
قبل از تغلیظ	۰/۴۱۵	۲۸۲	۳/۳
بعد از تغلیظ با فیلتر 30PM	۰/۱۷۱	۲۷۱/۶	۷
بعد از تغلیظ با فیلتر 10 PM	۰/۲۱۷	۲۶۶/۶	۵

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 و سپس غلظت نمونه‌های مجهول با کمک آن، محاسبه گردید. نتایج سنجش پروتئین در جدول (۴) نشان داده شده است.

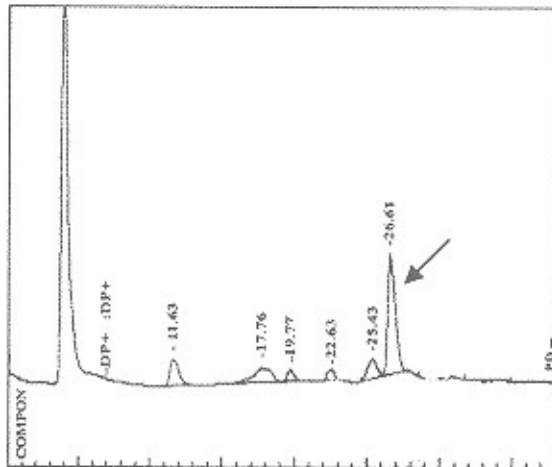
۴- نتایج الکتروفورز SDS-PAGE:

الکتروفورز SDS-PAGE نمونه تغلیظ شده با فیلترهای 10 و 30 PM توسط دستگاه آمیکون و همچنین نمونه قبل از تغلیظ و نمونه حاوی ملکول‌های کوچکتر از 30 KD در شکل (۱) نشان داده شده است.

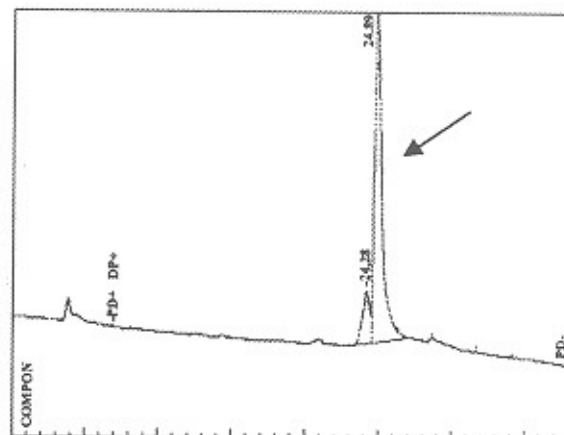
۵- نتیجه حاصل از کروماتوگرافی با روش RP-

HPLC

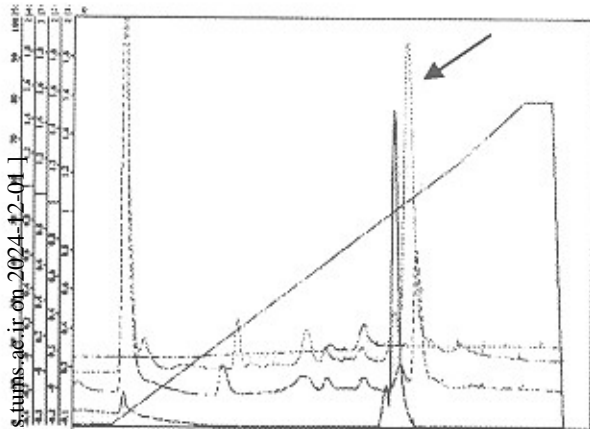
پیک‌های مربوط به IL-2 استاندارد و نمونه پس از تخلیص در نمودارهای (۲) و (۳) نشان داده شده است. نتیجه حاصل از Cochromatography هر دو نمونه نیز در نمودار (۴) مشاهده می‌شود.



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

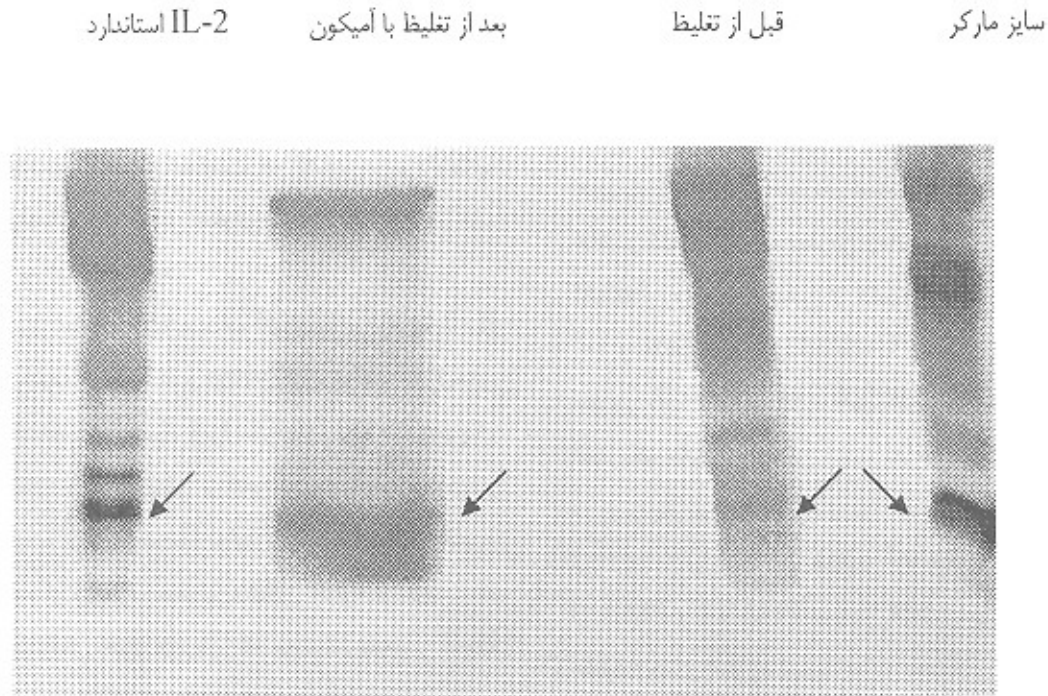


نمودار ۲- پیک استاندارد IL-2



نمودار ۴- Co-chromatography نمونه استاندارد و

مجهول (پیک ۲) نمونه استاندارد (پیک ۱) - نمونه مجهول (پیک ۳)



شکل ۱- الکتروفورز SDS-PAGE از نمونه‌های تغلیظ شده

جدول ۵- نتایج bioassay نمونه‌ها با استفاده از لنفوبلاست‌های

انسان	جذب	نمونه‌ها	نوری
کنترل منفی	۰/۰۲۷		
کنترل مثبت	۰/۳۱۵		
قبل از تغلیظ	۰/۲۰۶		
ملکولهای کوچکتر از ۱۰ کیلودالتون	۰/۰۶۰		
ملکولهای بزرگتر از ۳۰ کیلودالتون	۰/۱۱۰		
ملکولهای بین ۱۰ و ۳۰ کیلودالتون:			
بدون رقت	۰/۳۲۰		
۲ برابر رقیق شده	۰/۲۷۲		
۱۰ برابر رقیق شده	۰/۲۰۰		

با استفاده از فرمول ۲ میزان تقریبی IL-2 بدست آمد: غلظت نمونه مجهول در 50µl نمونه تزریق شده ۱۴۸ unit ۰/ بود که غلظت نهایی نمونه در 1ml، ۲/۹۶ U/ml معادل ۲۲۲ pg/ml بدست آمد.

۶- نتایج حاصل از Bioassay :

نتایج حاصل از اثر IL-2 بر روی لنفوبلاستها در جدول (۵) 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.

بحث

مطالعه بر روی لنفوسیت‌ها و عملکرد آنها سابقه طولانی دارد اما آنچه مسلم است آن است که کشف سایتوکاینها به عنوان ملکولهای رابط بین سلولی، تحول عظیمی در علم ایمنولوژی 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 میتوزن IL-2 تولید می‌نماید (۷). در ضمن اینکه استفاده از این رده سلولی مشکل تغییرات منحصر به فرد لنفوسیت‌های خون محیطی که می‌تواند در تیتراژ 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 عرضه‌کننده آنتی‌ژن ایجاد می‌شود که لکتین‌ها نیز می‌توانند این سیگنال را ایجاد کنند و سیگنال ثانویه غیراختصاصی آنتی‌ژن نیز توسط سلولهای کمکی از جمله 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 ترجمه 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،۱۴). PMA بطور سینرژیک با میتوزنها در تولید IL-2 نقش داشته و مستقیماً آنزیم پروتئین کیناز C را فعال می‌نماید)

(۷،۱۵) و با متوقف نمودن سلولها در فاز G₁ و همچنین کاهش بیان رسپتور IL-2 موجب کاهش مصرف IL-2 و تجمع آن در محیط کشت می‌گردد (۱۶،۱۷).

غلظت میتوزن، دانسیته سلول، زمان تحریک و جمع‌آوری سلولها پس از تحریک در تولید بهینه 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 اولیه Cell/ml 10^6 و غلظت نهایی Cell/ml 10^7 می‌باشد. 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 $20 \mu\text{g/ml}$ و PMA با غلظت 10 ng/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 ۲۴-۱۸ ساعت در نظر گرفته شده است (۷،۸،۱۸).

در مرحله بعد، پس از تحریک سلول Jurkat جمع‌آوری مایعات رویی با توجه به اینکه انجام پروسه‌های متعدد تخلیص مانند ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی تعویض یونی و در نهایت کروماتوگرافی تمایلی^۲ 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 محدوده ۱۷-۱۴ کیلودالتون حاکی از تخلیص جزئی محیط خام اولیه می‌باشد. در ضمن آنکه این باند در محدوده 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

عدم دسترسی به مقادیر زیادی از آنتی‌بادی 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 CTL-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 CTL-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 روی سلول‌های تحریک شده و استفاده از روشهای یک مرحله‌ای تخلیص پس از تغلیظ محلول خام توصیه می‌شود، که این روش یک مرحله‌ای می‌تواند شامل کروماتوگرافی Affinity و یا کروماتوگرافی فزاز معکوس HPLC با سیستم Preparative باشد که در بسیاری از مقالات نیز بکار رفته است

موجود در محیط خام همانند PHA در مرحله نخست فیلتراسیون خارج می‌شوند و اثر مداخله‌گر آنها نیز از بین می‌رود. نتایج حاصل از کروماتوگرافی فزاز 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 ۶۰۰ ml محیط کشت پس از ۸۵ برابر تغلیظ حدود ۲/۹۶ u/ml معادل ۲۲۲ pg/ml بدست آمد. نتایج تست الیزا نیز این مقدار را تایید میکنند. در مقایسه با مطالعات انجام شده بر روی تخلیص مولکول IL-2 با استفاده از روش‌های مختلف تخلیص نتایج متفاوتی مشاهده می‌شود مثلاً Welte و همکاران از ۳۰۰۰ ml محلول خام با استفاده از روش‌های Blue ، Procion-red، IEC، GF، APS ، agarose حدود ۱۹ µg/lit و همکاران از ۲۰۰۰ ml محیط خام با استفاده از روش‌های Amicon ، RP-HPLC،GF حدود ۹ µg/lit و Godard و همکاران از ۹۰۰ ml محیط خام با روش‌های GF،ASP، Affinity-chromatography حدود ۶۸ µg/lit IL-2 بدست آورده‌اند. اختلاف موجود در مقادیر بدست آمده از مولکول IL-2 بدلیل استفاده از روش‌های متفاوت تهیه و تخلیص مولکول می‌باشد. بطوریکه با استفاده از کروماتوگرافی Affinity که یکی از بهترین و جدیدترین روش‌های تخلیص می‌باشد میتوان مولکول مورد نظر را با درجه خلوص بسیار بالا بدست آورد. در این مطالعه بدلیل استفاده از ساده‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش جداسازی و

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 لاین لنفومایی (EL-4) موش. پایان نامه کارشناسی ارشد 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 immunobiological 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.