The Journal of Qazvin Univ. of Med. Sc.
مجله دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی قزوین
No. 17 , Spring 2001
شماره ۱۷ - بهار ۱۳۸۰

روش جدید جستجوی C_3d متصل به گلبول‌های قرمز در جریان فعالیت مکمل

دکتر افشین افشاری* دکتر الیزابت هلم**

Introducing a new method to detect bound C_3d on erythrocytes during complement activation

A. Afshari E. Holme

Abstract

Background : *Measurment of complement activation products has recently been the popular means of assessing the complement activation.*

Objective : *To introduce a new method to detect bound C_3d on erythrocytes during complement activation and to compare it with free C_3d levels.*

Methods : *An indirect ELISA used in routine measurement of free C_3d levels was developed together with the modified ELISA. To capture bound C_3d on erythrocytes , ELIZA plate were coated with anti - C_3d and after incubation , blood samples were added for two hours. Bound erythrocytes were lysed with 100 µl water perwell and the OD were read at 405 nm.*

Findings : *The levels of free C_3d and bound C_3d on the erythrocytes during complement activation was significantly increased compared to the control (800% and 500% respectively).*

Conclusion : *Both free C_3d and bound C_3d as final dogradation product of C_3d reflect the ongoing complement activation.*

Keywords : *C_3d , Complement Activation , Erythrocyte*

چکیده

زمینه : *اخیراً اندازه‌گیری محصولات فعالیت مکمل برای بررسی دقیق‌تر فعالیت این سیستم مورد استقبال عمومی قرار گرفته است.*

هدف : *مطالعه به منظور معرفی روش جدید الیزا برای جستجوی گلبول‌های قرمز حاوی محصولات نهایی سیستم مکمل (C_3d) به منظور تسهیل بررسی دامنهٔ فعالیت سیستم مکمل و مقایسهٔ آن با C_3d آزاد (سرمی) انجام شد.*

مواد و روش‌ها : *الیزای غیرمستقیم که در اندازه‌گیری رایج C_3d آزاد به کار می‌رود ، به همراه روش جدید الیزا برای بررسی اتصال عناصر مکمل به گلبول‌های قرمز مورد استفاده قرار گرفت. میکروپلیت الیزا برای به دام انداختن گلبول‌های قرمز حاوی C_3d ، با آنتی C_3d پوشانده و گلبول‌های قرمز (۱۰۸ × ۱ سلول در میلی‌متر) به مدت ۲ ساعت به آن اضافه شد. پس از شستشو ، سلول‌های قرمز مکمل شده توسط ۱۰۰ میکرولیتر آب لیز و میزان رنگ آنها در طول مدت ۴۰۵ نانومتر خوانده شد.*

یافته‌ها : *میزان C_3d آزاد و متصل شده بر روی گلبول‌های قرمز در جریان فعال شدن سیستم مکمل به طور چشمگیری در مقایسه با گروه کنترل افزایش یافت (به ترتیب ۸ و ۵ برابر کنترل). تمام عوامل مکمل مورد بررسی از جمله فاکتور B و پروپردین روی گلبول‌های قرمز قابل جستجو بودند.*

نتیجه‌گیری : *میزان C_3d آزاد و نیز C_3d متصل شده به گلبول‌های قرمز می‌تواند منعکس‌کنندهٔ فعالیت جاری سیستم مکمل باشد.*

کلید واژه‌ها : *فعالیت مکمل - گلبول قرمز*

* استادیار دانشگاه علوم پزشکی قزوین
** متخصص ایمونولوژی دانشگاه گلاسکو

مقدمه :

فعالیت بیولوژیک سیستم مکمل که امروزه به خوبی شناخته شده عبارت است از : لیز باکتری‌ها ، تقویت فاگوسیتوز ، کموتاکسی (آزاد سازی آنافیلاتوکسین‌ها) ، جابه‌جایی و تأثیر روی کمپلکس‌های ایمنی و تنظیم تولید ایمونوگلوبولین‌ها. این سیستم شامل حداقل سی گلیکوپروتئین سرمی و جدار سلولی است که فعالیت آن به صورت واکنش‌های آبشاری از طریق دو راه کلاسیک و آلترناتیو بروز می‌کند. (۵)

C_3 تقریباً ۱ تا ۲ درصد پروتئین‌های سرم را تشکیل می‌دهد و دارای زنجیره‌های آلفا (118 KD) و بتا (75 KD) است. زنجیرهٔ آلفا محل شکسته شدن C_3 و همچنین محلی برای اتصال آن به جداره‌های مختلف است. با شکسته شدن C_3 ، C_{3a} به فاز محیطی آزاد می‌شود و C_{3b} که پیوند تیواستر آن شکوفا شده و در دسترس قرار گرفته است به کمپلکس‌های ایمنی یا جداره سلول‌ها متصل می‌شود. (۷)

فاکتور I از عوامل کنترل توسعه فعالیت مکمل است که C_{3b} را به نوع غیر فعال آن تبدیل می‌کند (iC_{3b}). پروتولیز iC_{3b} به C_{3c} و سپس به C_{3d} نیز از طریق فاکتور I و احتمالاً پلاسمین صورت می‌گیرد. (۵)

C_{3d} یکی از محصول‌های مشخص‌کنندهٔ فعال شدن مکمل است که هم به صورت آزاد و هم به صورت متصل به گلبول‌های قرمز در سرم دیده می‌شود. (۸)

علی‌رغم وجود روش‌های متعدد بررسی فعالیت این سیستم ، اخیراً اندازه گیری محصول‌های مکمل به علت دقت بیشتر به خصوص در بیماری‌های کمپلکس ایمنی مورد استقبال قرار گرفته است. (۲)

در این مطالعه برای روشن شدن ارتباط فعالیت مکمل با دامنه تولید C_{3d} از کمپلکس‌های تیروگلوبولین و آنتی بادی خرگوش ضد آن استفاده شد و C_{3d} آزاد و متصل به گلبول‌های قرمز با روش جدید بررسی گردید.

مواد و روش‌ها :

IgG ضد تیروگلوبولین از سرم ایمنی شده خرگوش (اهدایی خانم دکتر هلم ـ بیمارستان وسترن گلاسکو انگلستان) توسط روش اسید کاپریلیک (Sigma) جداسازی و خلوص آن با ایمنوالکتروفورز امتحان شد.

نقطهٔ اکی‌والانس تشکیل کمپلکس ایمنی تیروگلوبولین با روش پرسی پی‌تاسیون کمی با اضافه نمودن مقادیر افزایش‌یابندهٔ تیروگلوبولین (Sigma) به مقدار ثابت آنتی بادی (۵ میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر آنتی‌بادی) تعیین گردید (۱۰ میکروگرم تیروگلوبولین و ۱۰۰ میکروگرم IgG).

C_{3d} سرمی با روش الیزای غیرمستقیم اندازه گیری شد. میکروپلیت‌ها (Dynatech) با آنتی‌بادی‌های خرگوش ضد C_{3d} انسانی (DAKO ، ۵ میکروگرم به ازای هر میلی‌لیتر) به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد پوشانده شد. میکروپلیت‌ها با محلول PBS در Tween (Sigma) شسته شد و برای

جلوگیری از اتصال غیراختصاصی توسط آلبومین گاوی (Sigma) ۱ درصد در محلول نمکی فسفاته (PBS) به میزان ۲۰۰ میکرولیتر در هر حفره به مدت یک ساعت مسدود گردید. برای تنظیم منحنی استاندارد، پس از شستن سرم فعال شده توسط کمپلکس‌های ایمنی تیروگلوبولین حاوی C3d، رقت $\frac{۱}{۵۰۰۰}$ محلول ۲۰ میلی‌مول EDTA (Merck) در PBS به میکروپلیت‌ها اضافه شد. نمونه‌های مورد آزمایش نیز به بقیهٔ حفره‌ها اضافه و پس از یک ساعت نگه‌داری در درجه حرارت اتاق شسته و با محلول $\frac{۱}{۱۰۰۰۰}$ آنتی‌بادی ضد IgG خرگوش (SAPU) که با بیوتین (Sigma) نشان‌دار شده بود، پوشیده شدند. پس از نیم ساعت پلیت‌ها شسته و ۱۰۰ میکرولیتر Avidin-horseradish Peroxidase (Merck) به حفره‌ها اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه پلیت‌ها شسته و رنگ آن به وسیلهٔ O-phenylendiamine (Sigma) ظاهر گردید و واکنش توسط اسید سولفوریک ۴ نرمال متوقف و میزان رنگ (Optical Density) در طول موج ۴۹۰ نانومتر با یک اسپکتروفتومتر خودکار (Dynatech) خوانده شد. برای تهیهٔ IgG نشان‌دار، IgG در PBS به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد دیالیز شد. لولهٔ دیالیز Medical International و غلظت آن ۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید. ۳ میلی‌گرم از استرپیوتین اِن هیدروکسی سوکسینامید (Biotin N - Hydroxi - Succinimide , Sigma) حل شده در ۱۰۰ میکرولیتر دی متیل فلورامید (Merck) به IgG اضافه و به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق نگه‌داری شد تا واکنش صورت گیرد، سپس به طور مکرر و گسترده در PBS دیالیز شد.

برای تعیین C_3، پروپردین و فاکتور B متصل شده به گلبول‌های قرمز، پلیت‌های الیزا به ترتیب با آنتی‌بادی‌های ضد C_3، ضد پروپردین و فاکتور B (۵ میلی‌گرم در هر میلی‌لیتر، Incstar) پوشانده شد و پس از ۱۲ ساعت نگه‌داری در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد با PBS - Tween شسته و برای جلوگیری از اتصال غیراختصاصی با سرم گاوی ۱ درصد در PBS بلوکه شد.

گلبول‌های قرمز از یک نمونهٔ خونی فعال شده توسط کمپلکس‌های ایمنی تیروگلبولین یا نمونهٔ خون غیر فعال شده، شسته شد و به میزان $۱۰^۸$ سلول در هر میلی‌لیتر در محلول آلبومین گاوی ۱ درصد بازسازی و استاندارد گردید. برای استاندارد کردن گلبول‌های قرمز ۰/۱ میلی‌لیتر از آنها را که از حجم مشخصی برداشته شده بودند به ۲/۹ میلی‌لیتر آب اضافه و میزان رنگ سلول‌های لیز شده در طول موج ۴۱۴ نانومتر خوانده شد و سپس طبق فرمول زیر حجم کلی گلبول‌های قرمز تنظیم گردید:

$$\text{حجم مورد نیاز} = \frac{\text{حجم اولیه} \times ۰/۳۲۷}{\text{میزان رنگ}}$$

۱۰۰ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز استاندارد شده به حفره‌های میکروپلیت اضافه و به مدت ۲ ساعت در درجه حرارت اتاق نگه‌داری شد. پلیت به آهستگی به وسیلهٔ یک پیپت چندکاناله، در سه نوبت شسته شد تا گلبول‌های متصل نشده خارج شوند. گلبول‌های قرمز، متصل شده با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر آب به هر

حفره لیز شدند و میزان رنگ آنها در ۴۰۵ نانومتر با یک اسپکتروفتومتر خودکار (Dynatech) خوانده شد.

برای بررسی C_{3d} متصل شده به گلبول‌های قرمز میکروپلیت‌ها با آنتی‌بادی خرگوش ضد C_{3d} انسانی (Dakopatt) از ۰/۶۲۵ میکروگرم تا ۸۰ میکروگرم در بافر کربنات سدیم ($PH = 9/6$) به مدت ۱۲ ساعت در حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد پوشانده شد.

گلبول‌های قرمز در خون فعال شده یا فعال نشده به شرحی که گفته شد به پلیت‌ها اضافه گردید و میزان رنگ گلبول‌های متصل شده در طول موج ۴۰۵ نانومتر به شرح فوق خوانده شد. دقت و پایایی اندازه‌گیری C_{3d} متصل شده به گلبول‌های قرمز نیز تعیین گردید.

▣ یافته‌ها :

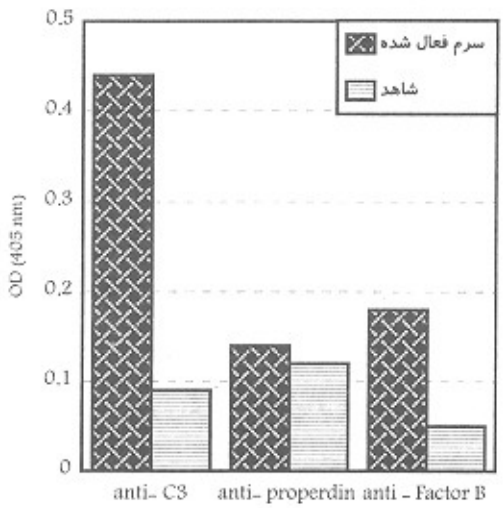
دقت آزمایش اندازه‌گیری C_{3d} سرمی ۱۱ درصد (چهار آزمون) و پایایی آن ۲۲ درصد (پنج آزمون در روزهای مختلف) تعیین گردید. کینتیک تشکیل C_{3d} در جریان فعالیت مکمل به وسیلهٔ کمپلکس‌های ایمنی تیروگلبولین در مدت ۳۰ دقیقه و در حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد مطالعه شد. C_{3d} تشکیل شده در سرم فعال در مدت ۵ دقیقه افزایش یافت و طی ۱۵ دقیقه به حداکثر خود یعنی ۹۰ درصد بیشتر از مقدار زمان شروع آزمایش رسید.

مقدار C_{3d} که در زمان شروع ۱۰ واحد در میلی‌لیتر برای نمونه تحریک شده یا نشده بود ، در سرم فعال نشده تغییر قابل ملاحظه‌ای در زمان نگه‌داری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نشان نداد با اضافه کردن کمپلکس ایمنی به نمونه سرم تحریک شده مقدار C_{3d} در مدت ۵ دقیقه به ۵۰ واحد در میلی‌لیتر ، طی ۱۵ دقیقه به ۸۰ واحد در میلی‌لیتر و طی ۳۰ دقیقه به ۶۰ واحد در میلی‌لیتر رسید.

تمام عوامل مکمل مانند C_3 ، پروپردین و فاکتور B روی گلبول‌های قرمز در مقایسه با کنترل (سرم تحریک نشده) قابل تجسس بودند (نمودار شماره ۱).

نمودار ۱ :

گلبول‌های قرمز حاوی C_3 ، پروپردین و فاکتور B در دو گروه

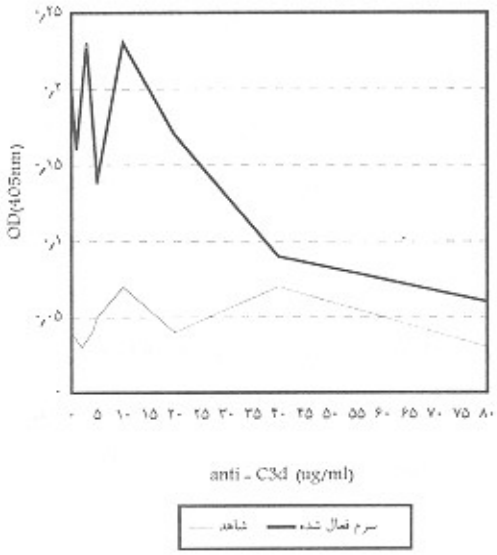


C_{3d} متصل به گلبول‌های قرمز نیز توسط روش الیزا در مقایسه با کنترل قابل تجسس بود ($P<0/05$).

دقت اندازه‌گیری C_{3d} متصل شده به گلبول‌های قرمز ۱۷ درصد (۶ آزمون) و پایایی آن ۲۳ درصد (۵ آزمون) محاسبه شد. حداکثر اتصال با غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بادی ضد C_{3d} مشاهده گردید (۷۸ درصد بیش از کنترل) (نمودار شماره ۲).

نمودار ۲ :

شناسایی گلبول‌های قرمز حاوی C_{3d} توسط مقادیر افزایش یابندهٔ آنتی C_{3d} و مقایسهٔ آن با گروه شاهد



مقادیر به دست آمده در طول موج ۴۰۵ نانومتر از سلول‌های به دام افتاده با غلظت آنتی‌بادی ضد C_{3d} هماهنگی نشان دادند ($P<0/02$ و $r=0/72$).

◙ بحث و نتیجه‌گیری :

در این مطالعه میزان C_{3d} آزاد و نیز متصل به گلبول‌های قرمز ، هر دو منعکس‌کنندهٔ فعالیت سیستم مکمل بودند که می‌توانند برای بررسی دامنهٔ فعالیت این سیستم به کار گرفته شوند.

اندازه‌گیری عناصر فعال شدهٔ مکمل C_3 و C_4 که به طور رایج برای بررسی بیماران مختلف استفاده می‌شود ، نمای دقیقی از فعالیت مستمر این سیستم را به دست نمی‌دهد ، زیرا افزایش تولید این عناصر برای جبران مصرف آنها در جریان بیماری‌های مختلف اغلب به صورت طبیعی یا حتی افزایش یافته دیده می‌شود. [۲] بنابر این اندازه‌گیری محصولات فعال شدهٔ این سیستم مثل C_{3b} - P و C_{1s} : c1 - INH امکان قضاوت بهتری را فراهم می‌آورد. [۱] مثلاً اندازه‌گیری C_{3d} سرمی که یکی از محصولات نهایی پروتئولیز C_{3b} توسط فاکتور I است می‌تواند کمک شایانی بنماید. روش‌های الیزا و راکت ایمونوآسی برای اندازه‌گیری C_{3d} آزاد استفاده شده است. [۴ و ۶]

در جریان فعال شدن مکمل، عناصر فعال شده هم روی سرم و هم بر روی گلبول‌های قرمز جایگزین می‌شوند.

در این مطالعه برای جستجوی C_{3d} متصل شده روشی جدید با استفاده از تکنیک الیزا که تا اندازه‌ای شبیه به تکنیک ELISPOT است (برای جداسازی لنفوسیت‌های B و T استفاده می‌شود) معرفی گردید.

اتصال عناصر مکمل مثل فاکتور B ، پروپردین و C_3 به گلبول‌های قرمز از طریق کمپلکس‌های ایمنی نشان‌دار شده توسط این عناصر و با واسطه گیرنده مکمل شماره ۱ (CR_1 و CD_{35}) قابل توضیح است. پایین‌تر بودن دامنه اتصال فاکتور B و پروپردین نسبت به C_3 به این دلیل است که این عناصر بیشتر در تشکیل مجموعه C_3 کانور تاز راه آلترناتیو شرکت می‌نمایند در حالی که C_3 از اجزای اصلی نشان‌دار کردن کمپلکس‌های ایمنی است.

بالا بودن تغییرهای دقت و پایایی اندازه‌گیری C_{3d} متصل به گلبول‌های قرمز می‌تواند به علت سهولت ته‌نشین شدن گلبول‌های قرمز در لوله‌های آزمایش و تغییری که در تعداد آنها در هنگام انتقال به حفره‌های

میکروپلیت ایجاد می‌شود ، بیان نمود.

اندازه گیری C_{3d} آزاد در بیماران مختلف چندی است که در بخش‌های ایمنوپاتولوژی مورد توجه قرار گرفته است. [۴] در مطالعه‌ای بر روی ۱۳ بیمار دچار حملهٔ حاد قلبی که با استرپتوکیناز تحت درمان بودند ، تولید C_{3d} به دنبال مصرف این داروی فعال‌کنندهٔ سیستم مکمل از ساعت اول تجویز تا روز هفتم پس از درمان قابل پی‌گیری بود. [۴]

با وجود آن‌که حدود ۱۰ سال از آگاهی ما نسبت به اتصال C_{3d} به گلبول‌های قرمز در جریان فعال شدن سیستم مکمل می‌گذرد و اندازه گیری آن به روش فلوساتیومتری ($FACS_{can}$) صورت می‌گیرد که مستلزم هزینهٔ زیاد بوده و برای بسیاری از مراکز غیر قابل انجام است ، [۳] استفاده از روش الیزا هزینه ، زمان و تجهیزات کمتری نیاز دارد و با استاندارد شدن این روش می‌توان آن را جای‌گزین مناسبی برای روش فعلی قرار داد.

▣ مراجع :

1. Afshari A , Holme E. Effect of streptokinase immune complex on activation of the complement and Intreaction with Erythrocytes. J Qazvin Univ of Med. SC 1999. 11 : 5-12

2. Auda G , Holme ER , Davidson JE et al. Measurement of complement activation products in patients with chronic rheumatic diseases. Rheumatol Int 1990 ; 10 : 185-9

3. Davies KA , Savill J , Walport MJ. In vitro transfer of immune complexes from erythrocytes to monocytes and macrophages. coml Inflamm 1989 ; 6 : 324

4. Freys dottir J , ormarsdottir S , sigfusson A. Evaluation of invivo immune complex formation and complement activation in patients receiving intravenous streptokinase. Clin Exp Immunol 1993 ; 94 : 286-90

5. Law SKA and Reid KBM. Activation and control of complement system. compl 1993 ; 9-29

6. Mollnes TE. Quantification of the C_{3d} split product of human complement by a sensitive enzymelinked immunosorbent assay. Scand J Immunol 1985 ; 21 : 607-13

7. Whaley K , Loos M and Weiler. Complement , immune complexes and immune complex diseases , complement in health and disease. 2nd ed , London Dordrecht Boston , 1993 , 199-221

8. Yokoyama I , Wazman F. Differential susceptibility of immune complexes to release from erythocytes by factor I. Mol Immunol 1994 ; 31 : 227-400