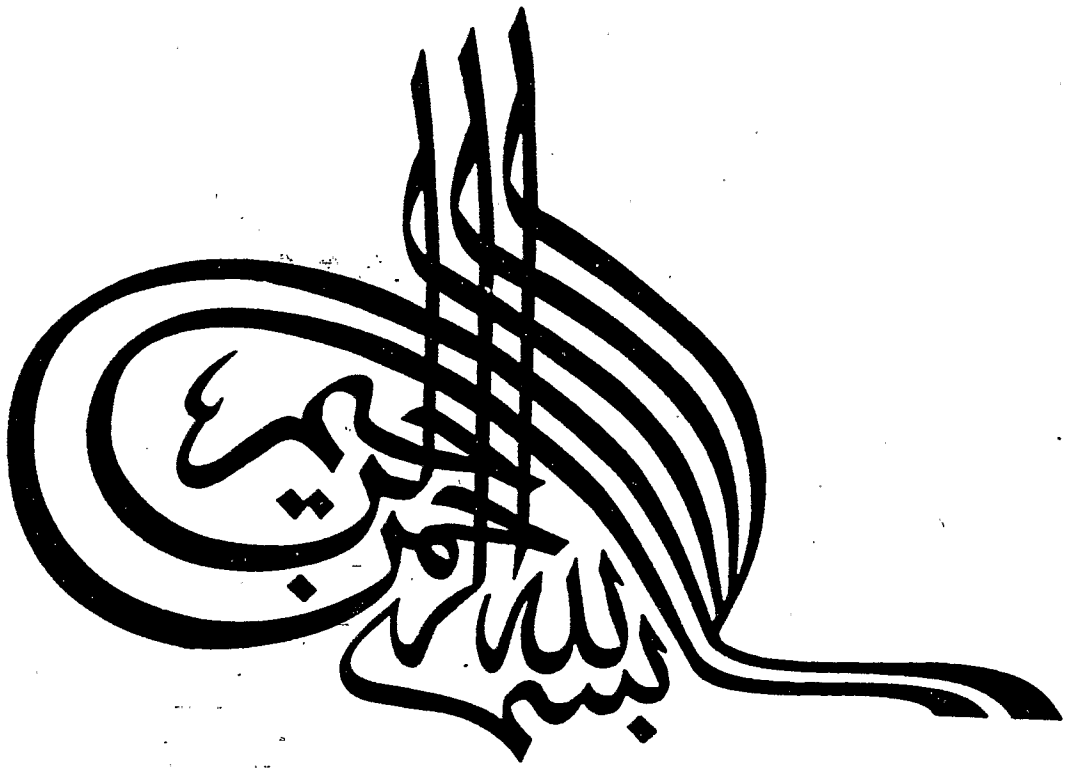
بسم الله الرحمن الرحيم

"نمونه فرم تایید یه اعضای هیات داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد"

بدینوسیله پایان‌نامه کارشناسی ارشد خانم/آقا ..... فریدون یاوری ..... تحت عنوان

تولید دودمانهای سلولی لنفو بلاستوئید با استفاده از ویروس E.B.V و تاثیر
آنتی‌ایمونوگلوبولین برتولید آنتی‌بادی توسط دودمانهای حاصله

تقدیم می‌شود. اینجانبان نسخهٔ نهائی این پایان‌نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأئید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجهٔ کارشناسی ارشد پیشنهاد می‌کنیم.

نام و نام‌خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران :

آقای دکترمحمد موذنی(استاد راهنما)

آقای دکترعلی‌اکبرپورفتح‌اله(استاد مشاور)

آقای دکتر محمودیان‌شوشتری(استاد مشاور)

آقای دکترزواران‌حسینی(استاد ناظر)

آقای سعید کاویانی(استاد ناظرونماینده تحصیلات تکمیلی)

سرکارخانم دکترا وسطی آشتیانی(استاد ناظر)

شماره:.....
تاریخ:.....
پیوست:.....

آیین‌نامهٔ چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرّس مبیّن بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

مادّهٔ ۱ در صورت اقدام به چاپ پایان‌نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

مادّهٔ ۲ در صفحهٔ سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد/رسالهٔ دکتری نگارنده در رشتهٔ خون‌شناسی است که در سال ۱۳۷۷ در دانشکدهٔ علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرّس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر سید محمد مهدی و مشاورهٔ سرکار خانم/جناب آقای دکتر علی اکبر نوری فتح‌آبادی از آن دفاع شده است.»

مادّهٔ ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه‌های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر دانشگاه اهدا کند دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

مادّهٔ ۴ در صورت عدم رعایت مادّهٔ ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ‌شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرّس، تأدیه کند.

مادّهٔ ۵ دانشجو تعهد و قبول می‌کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در مادّهٔ ۴ را از محلّ توقیف کتابهای عرضه‌شدهٔ نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

مادّهٔ ۶ اینجانب فریدون ناوری دانشجوی رشته خون‌شناسی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می‌شوم.

۱۳۷۸ /۶/ ۸

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه تربیت مدرس

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته خون شناسی و بانک خون

عنوان:

تولید دودمانهای سلولی لنفوبلاستوئید با استفاده از ویروس اپشتاین‌بار و بررسی تأثیر آنتی ایمونوگلوبولینها بر تولید آنتی بادی توسط دودمانهای حاصله

نگارش:

فریدون یاوری

3742/1

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر سید محمد موذنی

اساتید مشاور:

جناب آقای دکتر علی اکبر پور فتح ا...

جناب آقای دکتر محمود محمودیان شوشتری

تقدیم به :

روح پاک پدرم که ادامه تحصیلم همواره آرزویش بود،

دغدغه‌های همیشگی مادرم ،

همسر و دو فرزند عزیزم که همیشه یار و یاورم بوده و هستند و به خاطر

ادامه تحصیلم تمامی کاستی‌ها را صبورانه متحمل شدند و لب به شکوه نگشودند.

با تشکر وسپاس از :

استاد گرانقدر جناب آقای دکتر سید محمد موذنی که با راهنمائیهای استادانه و دلسوزانه خود در به ثمر رسیدن این تحقیق مرا یاری نمودند .

استاد گرانمایه جناب آقای دکتر علی اکبر پور فتح ا... مدیر محترم گروه هماتولوژی که زحمت مشاوره این پایان نامه را تقبل فرمودند و از هیچ کوششی برای به ثمر رسیدن آن فروگذار نبودند .

استاد گرامی جناب آقای دکتر محمود محمودیان شوشتری که زحمت مشاوره را تقبل فرمودند .

استاد گرامی جناب آقای سعید کاویانی که در کلیه مراحل از هیچ کوشش و مساعدتی دریغ نکردند.

دوست و برادر بسیار عزیزم آقای مسعود سلیمانی که در تمامی مراحل یار ویاورم بودند .

سرکار خانم دکتر صمدی از بانک سلولی انستیتو پاستور که از راهنمائیهای دلسوزانه‌اش بهرمند بودند.

برادر و دوستان بسیار عزیزم آقایان علی مصطفایی، جعفر مجیدی و سعید آبرون که همیشه مرهون راهنمائیها و کمکهای دلسوزانه آنان هستم .

کلیه همکاران و عزیزانی که در مراحل مختلف انجام این پایان نامه مرا مورد لطف و بزرگواری خود قرار دادند .

چکیده

یکی از مشکلات اساسی در تولید آنتی بادیهای منوکلونال انسانی توسط دودمان سلولی لنفوبلاستوئید، کم بودن میزان آنتی بادیهای تولیدی است. در این تحقیق ضمن استانداردکردن روش ایمورتالیزه کردن لنفوسیتهای B با EBV، تأثیر آنتی هیومن ایمونوگلوبولینها بر میزان نامیرایی و میزان وکلاس آنتی بادیهای تولیدی مورد بررسی قرارگرفت. برای این منظور ۱۶ نمونه خون محیطی انسان جمع آوری گردید و هر نمونه در سه حفره از پلیت ۲۴ خانه‌ای به شکلی وارد شد که حفره اول محتوی لنفوسیتهای B ومحیط کشت کامل، حفره دوم محتوی لنفوسیتهای B آلوده به ویروس اپشتاین بار و محیط کشت کامل و حفره سوم محتوی لنفوسیتهای B آلوده به ویروس اپشتاین بارکه قبل از آلودگی به مدت ۲۴ ساعت تحت تأثیر آنتی هیومن ایمونوگلوبولیتها قرارگرفته بودند و محیط کشت کامل بود. این سلولها با استفاده از میکروسکوپ معکوس هر روز مورد بررسی مورفولوژیک قرارگرفتند. بعد ازگذشت حدود ۳ هفته از ۱۶ نمونه فوق ۱۳ نمونه ایمورتالیزه شدند. در تمامی ۱۳ نمونه ایمورتال شده نمونه‌هایی که تحت تأثیر آنتی هیومن ایمونوگلوبولین قرارگرفته بودند به طور متوسط چهار روز قبل از دیگر نمونه‌هانامیرا شدند و تعداد کلنی‌های حاصل نیز بیشتر و بزرگتر بود. نتایج آزمون الیزاکه بر روی مایع رویی این نمونه‌ها در روز بیست و یکم صورت گرفت، یافته فوق را تأیید کرد و نشان داد که میزان IgM و IgG تولیدی در نمونه‌هایی که تحت تأثیر آنتی هیومن ایمونوگلوبولین قرار داشتند بیشتر و از تفاوت معنی‌داری با نمونه‌هایی که تحت تأثیر این ماده نبوده‌اند، برخوردار هستند. لذا می‌توان نتیجه گرفت که تحت تأثیر آنتی هیومن ایمونوگلوبولین میزان نامیرایی و میزان تولید آنتی بادی افزایش می‌یابد. اما مکانیسم دقیق این پدیده بر ما روشن نیست.

اهداف :

امروزه آنتی بادیهای منوکلونال در پزشکی و بیولوژی نقش بسیار مهم و با ارزشی دارند. در این میان آنتی بادیهای منوکلونال انسانی از ارزش والایی برخوردار هستند. چرا که استفاده از آنتی بادیهای منوکلونال موشی بازده کافی و مطلوب در درمان ندارد و می‌تواند منجر به بروز واکنش‌های نامطلوب در انسان گردد. از آنجائیکه در حال حاضر تنها دو دودمان سلولی میلومای انسانی وجود دارند که در تولید آنتی بادیهای منوکلونال انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند و میزان فیوژن آنها متوسط بوده و هیبریدو مای حاصل از آنها مقادیر اندکی آنتی بادی منوکلونال تولید می‌کند بنابر این استفاده از آنها تنها در موارد محدودی صورت می‌گیرد، لذا برای این منظور از دودمانهای بهتری مانند؛ دودمان لنفوبلاستوئید استفاده می‌شود و در حال حاضر تنها راه تولید آنتی بادیهای منوکلونال انسانی به شمار می‌رود. اما این روش مشکلاتی را به دنبال دارد، یکی از این مشکلات کم بودن میزان آنتی بادی تولیدی است. در این مطالعه برآنیم که ضمن استاندارد کردن روش نامیرا کردن با استفاده از EBV، با اضافه کردن ایمونوگلوبولین بر علیه آنتی بادی سطحی لنفوسیتهای B قبل از نامیرا کردن آنها بر مشکل فوق فائق آییم و ضمن به دست آوردن تعدادی دودمان سلولی لنفوبلاستوئید که خود کاربردهای متعددی در زمینه سیتوژنتیک، سرطان، بیان شاخص‌های EBV و غیره دارد، به عنوان مقدمه گامی در جهت تولید آنتی بادی منوکلونال با منشأ انسانی برداریم.

فهرست مطالب

عنوان — صفحه

فصل ۱ – مقدمه ۱
۱-۱ : لنفوسیت B ۲
۱-۱-۱ : تکامل لنفوسیت B ۲
۱-۱-۲ : شاخص‌های سطحی لنفوسیت B ۳
۱-۱-۳ : فعال کننده‌های پلی کلونال سلول B ۸
۱-۲ : دودمانهای سلولی لنفوبلاستوئید ۱۰
۱-۳ : تولید آنتی بادی منوکلونال انسانی در In-Vitro ۱۳
۱-۳-۱ : آنتی بادیهای منوکلونال ۱۳
۱-۳-۲ : آنتی بادیهای منوکلونال انسانی ۱۴
۱-۳-۳ : استفاده از سلولهای میلومای موشی ۱۴
۱-۳-۴ : دودمانهای سلولی لنفوبلاستوئید انسانی ۱۵
۱-۳-۵ : دودمانهای هترومیلوما ۱۵
۱-۳-۶ : ترانسفورمیشن با EBV و روش تولید هیبریدومای EBV ۱۵
۱-۳-۷ : کاربرد آنتی بادیهای منوکلونال ۱۷
فصل ۲ – مروری بر مطالعات گذشته ۱۸
فصل ۳ – مواد و روشها ۲۳
۳-۱ : کشت سلول ۲۴
۳-۱-۱ : ابزار مورد نیاز ۲۴
۳-۱-۲ : مواد مورد نیاز ۲۵
۳-۱-۳ : آماده کردن محلولهاو با فرها ۲۵
۳-۱-۳-۱ : طرز تهیه PBS ۰/۱۵ مولار با pH=۷/۲ ..... ۲۵
۳-۱-۳-۲ : طرز تهیه اسید سولفوکرومیک ۲۶
۳-۱-۴ : شستشو و استریل کردن وسایل ۲۶
۳-۱-۵ : تهیه محیط کشت سلول ۲۶
۳-۱-۵-۱ : تهیه محیط کشت کامل RPMI- 1640 ..... ۲۶
۳-۱-۵-۱-۱ : مواد مورد نیاز برای تهیه محیط کشت کامل حاوی
۱۰ درصد FCS ۲۶
۳-۱-۵-۱-۲ : طرز تهیه محیط کشت کامل ۲۶
۳-۱-۶ : روش کشت دودمان سلولی B958 ..... ۲۷
۳-۱-۷ : روش کشت دودمان سلولی MRC5 ..... ۲۷
۳-۱-۸ : روش پاساژ دادن ۲۸

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

۳-۱-۹: روش بازکردن کرایو و کشت سلولها ۲۹
۳-۱-۱۰: نحوه جداسازی سلولهای تک هسته‌ای از خون محیطی ۲۹
۳-۱-۱۱: روش نامیرا کردن لنفوسیتهای B با استفاده از EBV ۲۹
۳-۱-۱۱-۱: مواد و ابزار مورد نیاز ۳۰
۳-۱-۱۱-۲: تهیه ویروس اپشتاین بار ۳۰
۳-۱-۱۱-۳: تحریک لنفوسیتها با ویروس اپشتاین بار ۳۰
۳-۱-۱۲: روش خالص سازی آنتی هیومن ایمونوگلوبولین ۳۱
۳-۱-۱۲-۱: مواد و ابزار مورد نیاز ۳۱
۳-۱-۱۲-۲: روش کار ۳۱
۳-۱-۱۳: روش بررسی تأثیر آنتی ایمونوگلوبولین بر میزان نامیرایی لنفوسیتهای B و میزان و کلاس آنتی بادیهای تولیدی ۳۲
۳-۱-۱۴: روش انجام الیزا ۳۳
۳-۱-۱۴-۱: مواد لازم ۳۳
۳-۱-۱۴-۲: روش انجام کار ۳۴
فصل ۴- نتایج ۳۶
فصل ۵- بحث ۵۵
فصل ۶- منابع ۵۹

فصل اول :

مقدمه

فصل اول مقدمه

۱-۱ : لنفوسیت B

۱-۱-۱ : تکامل لنفوسیت B

یک سلول جوانه‌ای چند قوه‌زا[۱] در مغز استخوان وجود دارد که به دو پیش‌ساز بزرگ تقسیم می‌شود : سلول جوانه‌ای لنفوئیدی و سلول جوانه‌ای خون ساز یا میلوئید. سلول جوانه‌ای خون ساز تحت تأثیر عوامل خون ساز خرد محیطی [۲]، به سلولهای پیش ساز متعهدی به نامهای CFU-M[۳],CFU-G[۴],CFU-E0[۵],BFU-E[۶] و CFU - Meg[۷] تبدیل می‌شود که هر کدام از آنها به ترتیب به منوسیت، گرانولوسیت (نوتروفیل)، ائوزینوفیل، اریتروسیت و پلاکت تبدیل می‌شوند. برای بازو فیل‌ها نیز سلولهای تشکیل دهنده کلنی بازوفیل شرح داده شده‌اند.[۲و۱]

از طرف دیگر سلول جوانه‌ای لنفوئید دراعضای لنفاوی اولیه مغز استخوان و تیموس مراحل تکامل خودراطی‌کرده و در نهایت به لنفوسیت B و T بالغ تبدیل می‌شوند. در این میان به مراحل تکامل لنفوسیت B به این شرح پرداخته می‌شوند : سلول جوانه‌ای لنفوئید ابتدا به Pre - B cell تبدیل می‌شود. این سلول اولین سلولی است که زنجیره‌های سنگین سیتوپلاسمی μ را تولید می‌کند، که دارای نواحی ثابت و متغیر هستند.

لنفوسیتهای Pre - B تنها در بافتهای خون ساز مانند مغز استخوان وکبد جنینی یافت می‌شوند. این سلولها قادر نیستند IgM غشایی را به صورت کامل عرضه کنند زیرا عرضه IgM غشایی مستلزم تولید هر دو زنجیره سبک و سنگین است، بنابر این این سلولها قادر به شناسایی و پاسخ به آنتی ژن نیستند.[۲و۱]

در مرحله‌بعدی تکامل لنفوسیت B،زنجیره‌های سبک‌کاپاولامبدا نیزتولیدمی‌شوند،این‌زنجیره‌ها به

1- Multipotential or pluripotential 2- Hematopoietic microenvironmental Factors

3- Colony-Forming unit - macrophage 4- Colony-forming unit - granulocyte

5- Colony forming unit - eosinophil 6- Burst - forming unit - erythroid

7- Colony - forming unit - megakryocyte

زنجیره سنگین μ متصل و مولکولهای IgM را تولید می‌کنند که به عنوان گیرنده آنتی ژن در سطح سلول عرضه می‌شوند. لنفوسیتهای B حاوی IgM که از پیش سازهای مغز استخوان مشتق می‌شوند، لنفوسیتهای B نابالغ نامید می‌شوند، زیرا این سلولها در پاسخ به آنتی ژن تکثیر و تمایز پیدا نمی‌کنند.[۲و۱]

در مرحله بعدی لنفوسیتها که ایمونوگلوبولین کامل را کسب نموده‌اند، از مغز استخوان خارج و وارد گردش خون محیطی و بافتهای لنفاوی می‌شوند و حتی در غیاب آنتی ژن به بلوغ خود ادامه می‌دهند. لنفوسیتهای B بالغ به همراه زنجیره سبک اولیه کاپاپالامبدا زنجیره‌های سنگین μ و δ را همزمان عرضه کرده. و بنابراین IgM و Ig غشایی را تولید می‌کنند. از آن جائیکه هر دو کلاس ایمونوگلوبولین غشایی از ناحیه V یکسانی برخوردار هستند، لذا از ویژگی آنتی‌ژنی واحدی برخوردار هستند. این سلولها در مقابل آنتی‌ژن از قدرت پاسخگویی برخوردار هستند. گر چه در طول مراحل قبلی تکامل، برخورد با آنتی‌ژن برای بلوغ لنفوسیت B ضرورت ندارد، اما اعتقاد بر این است که در صورت عدم مواجهه با آنتی‌ژن، لنفوسیتهای B بالغ در عرض چند روز تا چند هفته می‌میرند. در صورتی که سلولهای B بالغ بوسیله آنتی‌ژن تحریک شوند، به لنفوسیتهای B تحریک شده تبدیل می‌شوند. این سلولها قادرند تکثیر و تمایز یابند و بخش اعظمی از ایمونوگلوبولین‌هایشان را به صورت ترشحی و بخش اندکی را نیز به صورت غشایی تولید کنند. تعدادی از لنفوسیتهای B به جای تبدیل به سلولهای تولید کننده آنتی‌بادی (پلاسماسل) به سلولهای خاطره‌ای تبدیل می‌شوند، که در پاسخ ایمنی ثانویه دخیل هستند. اکثر سلولهای B در جریان خون و اعضای لنفاوی افراد طبیعی به صورت IgM^+ یا $IgM^+ IgD^+$ هستند.[۲و۱]

۱-۱-۲: شاخص‌های سطحی لنفوسیت B

لنفوسیتهای B تنها سلولهایی هستند که قادر به تولید مولکولهای ایمونوگلوبولین هستند، این مولکولها در لنفوسیتهای B در حال استراحت، در سطح غشاء سلولی نیز ظاهر می‌شوند (mIg). تخمین زده می‌شود که ۵۰۰/۰۰۰ مولکول ایمونوگلوبولین در سطح لنفوسیت B وجود داشته باشد. ساختارهای آنتی ژنیک موجود در سطح لنفوسیتهای B را می‌توان به دو گروه تقسیم نمود: آنتی‌ژنهایی که همراه سلولهای B نیز وجود دارند و آنتی ژنهایی که مختص این دودمان سلولی

هستند. از آنتی ژنهای خاص می‌توان به CD19 (قبلاً B4 نامیده می‌شد) و CD20 (قبلاً B1 نامیده می‌شد) اشاره نمود، این آنتی‌ژنها را آنتی‌ژنهای Pan-B می‌نامند، زیرا در اکثر مراحل تمایز لنفوسیتهای B بر سطح آن وجود دارند. سایر آنتی‌ژنها مانند CD24, CD22, CD21 تنهادر مراحل خاصی از تکامل این سلول بر سطح آن یافت می‌شوند.[۱]

از طرفی بر سطح لنفوسیتهای B انسان و موش، مولکولهایی وجود دارند که به بخش Fc مولکول IgG متصل می‌شوند، این مولکولها راگیرنده Fc یا FcR می‌نامند. لنفوسیتهای B انسان نیز دارای FcR برای IgM، IgA و یا IgE(CD_{23}) هستند.

حدود ۱۹ درصد از سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی در انسان دارای گیرنده کمپلمان هستند. CR1 بر سطح لنفوسیهای T و B،گرانولوسیتها، منوسیتها و گلوبولهای قرمز یافت می‌شود، اما CR2(CD21) غالباً بر سطح لنفوسیتهای B قرارگرفته است. بر سطح لنفوسیتهای B آنتی‌ژنهای کلاس IIکمپلکس سازگاری نسجی نیز وجود دارد.[۲و۱]

شاخصهایی که در مراحل مختلف تمایز لنفوسیت B بر سطح آن ظاهر می‌گردند، غالباً متفاوت هستند، تمایز این سلولها را می‌توان به دو بخش تقسیم نمود: تمایز اولیه و تمایز نهایی. در مرحله تمایز اولیه اولین سلول B قابل شناسایی، آنتی‌ژن CD19 را به همراه HLA - DR و CD34 عرضه می‌کند. به دنبال CD19 ، CD10 نیز یافت می‌شود. سلولی که آنتی‌ژنهای فوق را دارا است - Pro Bcell نامیده می‌شود. در مرحله بعدی (Pre - Bcell) CD34 حذف و CD20 ظاهر می‌گردد که خاص دودمان سلولی B است، سایر مراحل تمایز و عرضه شاخص‌ها در شکل(۱-۱) آمده است. تمایز نهایی لنفوسیتهای B در اعضای لنفاوی ثانویه صورت می‌گیرد. این مرحله وابسته به آنتی ژن بوده و از طریق فاکتورهای محلول حاصل از لنفوسیتهای T و سلولهای کمکی (۱) انجام می‌گیرد. حذف mIgD تنها علامت و شاید مهمترین آن در شروع تمایز نهایی است. دیگر تغییرات شاخص‌های سطحی در شکل (۱-۱) آمده است :

1- accessory cells

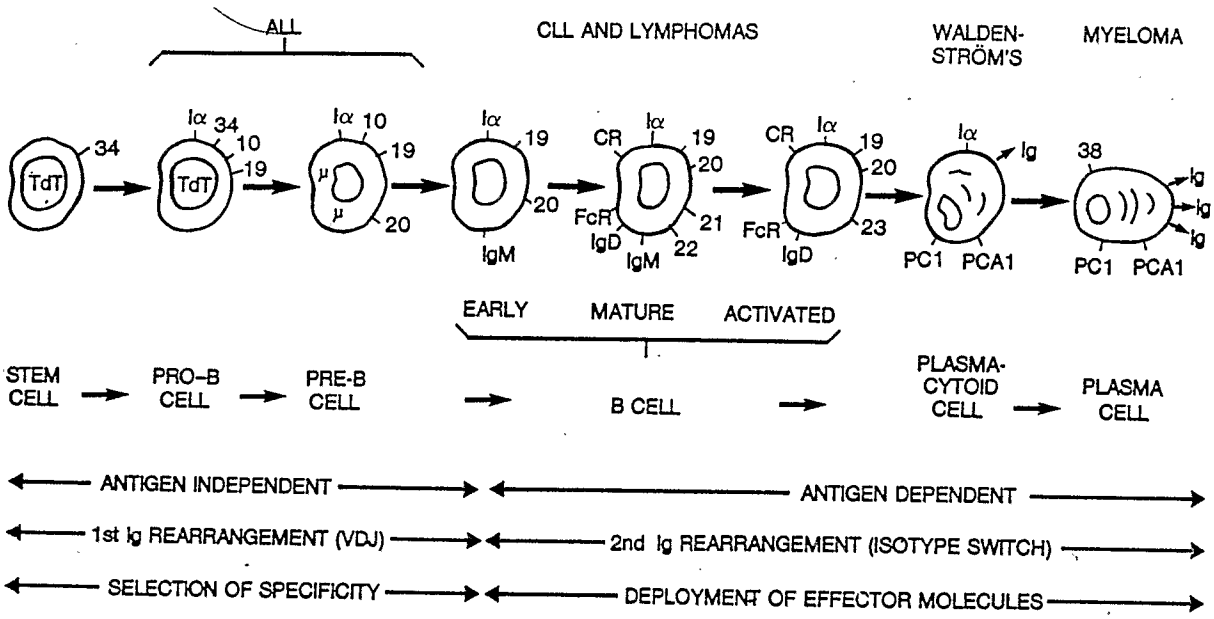

FIG. 14–2. B cell differentiation. Mature B cells arise from stem cells in the bone marrow. Differentiation is characterized by the expression of distinct cell surface markers at different stages. Early stages of differentiation are antigen independent. During this period, the cell rearranges its immunoglobulin (Ig) genes and acquires its repertoire of antigen specificities (1st rearrangement, VDJ recombination). On maturation, the cell homes to the secondary lymphoid organs where differentiation continues under the influence of antigenic stimulation (antigen dependent). During this period, the cell once more rearranges its Ig genes to secrete antibodies of different classes (2nd rearrangement, isotype switch). Acute leukemias (ALL) usually involve the most immature cells; the chronic leukemias (CLL) and lymphomas in general involve the mature stages. Numbers around the cells represent the clusters of differentiation (CD). FcR, Fc receptor; CR, complement receptor.

شکل (۱-۱) : شاخص های موجود در سطح لنفوسیتهای B در حالت طبیعی و پاتولوژیک[۱]