۱۹۱۴

دانشگاه ملی ایران

دانشکده علوم ـ مرکز تحقیقات زیست شناسی

پایان نامه برای دریافت درجه فوق لیسانس

زیست شناسی

موضوع

مطالعه سی و چهار مورد پروتئین مونوکلونال

براهنمائی استادان محترم

دکتر ابوالقاسم امین ـ دکتر خسرو شاملو

نگارش

نزهت الملوک مصفا

سال تحصیلی

۱۳۵۴ـ۵۵

۱۹۱٤

فهرست مطالـــــب

	شماره صفحه
مقـــــدمه	۱
روش کـــار	۵
۱ــ تعیین مقدار پروتئین های سرم	۵
۲ــ الکتروفورز استات سلولز	۵
۳ــ ایمونوالکتروفورز	۵
٤ــ اندازه گیری مقدار ایمونوگلوبولینها	٦
۵ــ آزمایش Outcherlony	۷
٦ــ ایمونوسلکشن	۷
نکات و ملاحظاتی که در ایمونوالکتروفورز سرم بیمارای مونوکلونال باید درنظر داشت	۹
اطلاعات بالینی ومشخصات بیماران مونوکلونال	۱۲
تقسیم بندی موارد مونوکلونال	۱۷

۱۹۱٤

سپاسگـــــــزاری :

این مطالعه از مـهرماه ۱۳۵۱ تا آبانماه ۱۳۵٤ در مـــــرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه ملی ایران انجام گرفته است و در تمام مدت مطالعه بیمارستان های دانشگاه (جرجانی ــ سعادت‌آباد ــ فرحـــــناز لقمان الدوله ادهم) از طریق فرستادن سرم ما را یاری کرده اند . ریاســت مرکز تحقیقات زیست‌شناسی آقای دکتر ابوالقاسم امین در تمام مدت مطالعـــه بهترین مشوق و راهنمای اینجانب بوده اند ، صمیمانه از ایشان سپاسگـــزارم و مراتب امتنان و تشکر خود رابحضور آقای دکتر خسرو شاملو که همـــــــواره از راهنمائی ها و کمکهای ذیقیمتشان برخوردار بوده ام تقدیم مینمایـــــم. از همکار گرامی ، خانم عفت الملوك نمکی که در تهیه این رساله اینجانـــــب رایاری کرده اند سپاسگزارم . از آقای غلامعلی نعیمی تکنیسین مرکز تحقیقات که سهم بسزائی در انجام این مطالعه داشته اند تشکر مینمایم. از مسئـولان بیمارستان های دانشگاه بویژه آقای دکتر ابوالحسن زوار که در تهیه ســـــرم و شرح حال بیماران با اینجانب همکاری کرده اند بسیار سپاسگزارم.

بقیـــــه

گروه اول *Primary malignant* ۱۸

الف ــ میلوم مولتیپل ۱۹

ب ــ ماکروگلوبولینمیای والدن اشتروم ۳۰

ج ــ بیماری زنجیره سنگین ۳۱

د ــ موارد بد خیمی که همراه با نئوپلازی سلولهای دیگر سازنده خون است. ۳۳

گروه سوم *Secondary malignanat or benign* ۳۵

ج ــ آلودگیهای مزمن و بیماریهای عفونی ۳۵

د ــ سیروز کبدی ۳۵

بحث و نتیجه ۳۷

جـــدول ۴۱

خلاصه بزبان انگلیسی *Abstract* ۴۵

مـــراجـــع *Refrences* ۴۸

از گروه دوم و موارد الف و ب از گروه سوم بعلت عدم برخورد ذکری نشده است .

مقدمه :

پروتئین های مونوکلونال یا پاراپروتئین ها *Paraproteins* ایمونوگلوبولین هائی هستند که بتوسط یك کلن *Clone* خاص از سلول های سازنده ایمونوگلوبولین ها ساخته میشوند و بنابراین اصطلاح پاراپروتئین برای تمام مواقعی که در سرم خون ایمونوگلوبولین مونوکلونال بوجود میاید بکاربرده میشود . وجود پروتئین مونوکلونال بمقدار زیاد وقابل توجه نشان دهنده افزایش تعداد پلاسما سلهای کلن مربوطه میباشد درنتیجه پروتئین های مونوکلونال ملکولهائی هموژن هستند که در دیاگرام الکتروفورز بصورت یك نوار مشخص و متراکم درمنطقه گاما و بندرت درمنطقه بتا دیده میشوند . پروتئین مونوکلونال ممکن است یك ایمونوگلوبولین کامل ویا قسمتی از ملکول ایمونوگلوبولین باشد . پروتئین های مونوکلونال اولین بار در بیماری میلوم و ماکروگلوبولینمیای والدن اشتروم *Walden Ström-Macro globulinemia* مورد مطالعه قرارگرفته اند زیراکه درموارد فوق پروتئین مونوکلونال بمقدار قابل توجهی درسرم خون دیده میشود . درسالهای اخیر بعلت توسعه و پیشرفت بسیار زیاد درامر تجزیه پروتئینهای سرم درتعداد زیادی ازبیماریها پروتئین مونوکلونال دیده شده است که با مطالعات بیشتر هرروز به موارد بیشتری برخورد میشود . بطور مثال در لنفوم بد خیم *(1) Malignant Lymphoma* اپی تلیوما *(2) Epithelioma*

بیماری کلاژن (2) Collagen disease ، بیماریهای کبدی (3) Liver Diseases

سارکوما (4) Sarcoma و آلودگیهای مزمن (5) پروتئین مونوکلونال در سرم

خون دیده میشود . بنظر میرسد که درموارد فوق تولید پروتئین مونوکلونال از

عوارض ثانویه بیماری میباشد .

درسال ۱۹۶۱ والدن اشتروم (6) بامطالعه برروی تعداد سرم طبیعی

نشان داد که پروتئین مونوکلونال درسرم افراد سالم نیز دیده میشود و پس

از مطالعات کلینیکی وپاراکلینیکی اصطلاحات زیررا درمورد وجود پروتئینهای

مونوکلونال درموارد غیر میلومی بکاربرد :

1. *Benign hyperglobulinemia*
2. *Essential* " " "
3. *Monoclonal* " " "
4. *Non macromolecolar* " "

همچنین اصطلاحات :

1. *Idiopatic*
2. *Symptompoor*
3. *Cryptogenetic*
4. *Lanthanic*
5. *Non myelomatous*
6. *Rudimentary*

درمورد پروتئینهای مونوکلونال که درموارد غیر میلومی وجود دارد بکاربرده میشود .

همانطورکه ذکر شد دربعضی موارد پروتئین مونوکلونال بصورت یك پدیده

ثانوی (خوش‌خیم ثانویه) ودرمواردی دیگر بطور طبیعی (خوش‌خیم اولیه) درخون دیده میشود . دردوگروه فوق کلنهای سازنده ایمونوگلوبولین خودکاری کمتری ازخود نشان میدهند . علت ترشح ایمونوگلوبولین را نامعلوم و یابر اثر عوامل ژنتیکی (بخصوص درمورد خوش خیم اولیه) فرض میکنند ولی درمورد خوش خیم ثانویه تحریك شدید ومداوم سلولهای سازنده ایمونوگلوبولین را علت اصلی میدانند . درموارد فوق حالت خوش خیمی ممکن است موقتی بوده و مبدل به حالت بدخیم شود ویابعبارت دیگر به موازات این تغییر حالت سلولهای سازنده ایمونوگلوبولین خودکاری بیشتری کسب میکنند . بنابراین درموارد بدخیم سلولهای مربوطه دارای خودکاری کامل هستند .

درطی سه سال گذشته ۵۶۰ سرم از طریق بیمارستانهای دانشگاه ملی ایران برای الکتروفورز وتعیین مقدار پروتئینهای سرم مورد آزمایش قرارگرفته اند ودرمواردی که به پروتئین مونوکلونال برخورد شده است مقدار بیشتری سرم تهیه ومورد مطالعه بیشتری قرارگرفته است . آزمایشات مختلف بمنظور تعیین نوع زنجیره سنگین و سبك انجام شده است و نیز در بعضی موارد مقدار ایمونوگلوبولین ها تعیین شده است . درتمام مدت مطالعه با مراکز تحقیقاتی دنیا* همکاری وجود داشته است.

Dr. Henry G. Kunkel
The Rockefeller University
New York, N.Y. 10021

Dr. F. Skvaril
Universitat Bern
Institut Fur Klinisch-Experimentelle Tumorforschung
Tiefenauspital

گروههای فرعی و فاکتور Gm در مورد تعدادی از بیماران معلوم به توسط مراکز فوق تعیین شده است و در مواردی که به سرمهای جالب برخورد شده برای اطمینان از نظرات وتجربیات سرمها به مراکز فوق فرستاده شده است.

ودرپایان تلاش براین بوده که با در نظرگرفتن اطلاعات بالینی که از بیماران در دست است موارد مونوکلونال در یک طبقه بندی صحیح قرار گیرند .

لازم بتذکر است که در تقسیم بندی فقط مواردی که در طی مطالعه با آنها بر خورد شده مورد بررسی قرار گرفته است و از موارد خوش خیم اولیه و خوش خیم ثانویه (بغیر از دو مورد) ذکری نشده است .

****

روش کـــــار :

سرمها بااستفاده ازروشهای زیر ازچند نقطه نظرمورد مطالعه قرارگرفته اند :

۱ــ تعیین مقدار پروتئین تام : مقدار پروتئین سرم بروش میکروکجلدال (7) و اسپکترومتری (بیوره) (8) تعیین شده است .

۲ــ الکتروفورز استات سلولز بمنظور تعیین مقادیر البومین و گلوبولین هـــا (9) بافر الکتروفورز ،بافر باربیتال (اسید باربیتوریك ،باربیتال سدیم) با pH=8.6 وقدرت یونی ۰٫۵ بوده ، زمان الکتروفورز ۲۰ تا ۲۵ دقیقه ورنگ آمیزی بتوسط رنگ Ponceau-S بمدت ۱۵ دقیقه انجام گرفته است. کاغذ استات سلولز بتوسط اسید استیك و استات اتیل به نسبت ۷۰ و ۳۰ شفاف شده است . الکتروفروگرام بتوسط دستگاه رکورد ر رسم و درصد آلبومین وگلوبولین هاتعیین شده وبا ردست داشتن مقدار کل پروتئین مقادیر مطلق آلبومین α_1، α_2، β وگاماگلوبولین تعیین شـــده است .

۳ــ ایمونوالکتروفورز Immunoelectrophoresis : این تکنیك اولین بار توســـــط Grabar و Williams درسال ۱۹۵۳ درانستیتو پاستور (10) پیشنهاد شـد وبعد هاتوسط Schaidagar (11) بصورت میکرومتد تغییرا تی پیدا کـــرده است وامروزه یك روش مطمئن و دقیق برای مطالعه کیفی پروتئین های سرم اســـت .

ایمونوالکتروفورز در دو مرحله صورت میگیرد :

۱ــ الکتروفورز ساده برروی ژل آگار و یا آگارز

۲ــ اضافه کردن آنتی سرم به شیار بین دو محل نمونه گذاری و در طول حرکت الکتروفورتیک .

برای تهیه لام آگار ۲/۵ میلی لیتر آگار حل شده را در سطح لام بطور یکنواخت ریخته تا لایه نازك بقطر یك میلی متر ایجاد شود . الکتروفورز بمدت یکساعت انجام گرفته وبعد ازاین مدت لام ها در اطاقك مرطوب برای ظهور هلال های رسوبی بمدت ۱۶ تا ۲۴ ساعت قرارگرفته اند . شستشوی لامها بمدت ۴۸ ساعت در فسفات بافر سالین (PBS pH 8.2) صورت گرفته وسپس لامها بکمك کاغذ واتو ، ۸ درجه خشك ورنگ Ponceau-S بمدت ۱۵ دقیقه رنگ آمیزی شده اند . از آنتی سرم طبیعی انسان Anti-NHS و ۵ آنتی سرم اختصاصی Anti-L,K , IgG, IgA,IgM استفاده شده است (بدین معنی اختصاصی که آنتی کور بر ضد شاخصهای آنتی ــ ژنیك مشترك آنها ازراه ایمونوادسربشن Immunoabsorbtion گرفته شده است) .

۴ــ Single Radial Immunodiffusion:

این تکنیك برای تعیین مقادیر پروتئین های سرم بخصوص ایمونوگلوبولین ها بکار میرود واولین بارتوسط Rowe و Fahey پیشنهاد (12) وبعد ها توسط

Mancini، Carbonara ، Hermans تغییراتی پیدا کرده است (13)

برای تعیین مقادیر IgG, IgA, IgM سرم بیماران مونوکلونال ازاین روش استفاده شده است . بدین ترتیب که آنتی سرم اختصاصی به ژل آگار در درجه حرارت ۵۰ درجه اضافه و ژل رابروی پلیت ریخته وبعد ازانعقاد ژل نمونه گذاری در سوراخهائی بقطر ۲ میلی متر انجام گرفته است . بعد از ۱۶ ساعت دوایری تشکیل شده و با استفاده از سه استاندارد مختلف با غلظتهای متفاوت و قطر دوایر مربوط به استانداردها ، منحنی استانداردها برروی کاغذ لگاریتمی رسم وبا در دست داشتن قطر سرم مجهول بکمك منحنی مقادیر تعیین شده است .

۵— Double Immunodiffusion : این تکنیك برای اولین بار توسط Ouchterlony (14) برای نشان دادن ارتباط آنتی ژنیکی بین آنتی ژن و آنتی کور در ژل آگار مورد استفاده قرارگرفته است. ازاین تکنیکبرای نشان دادن پروتئین بنس جونس (Bence-Jones) در ادرار بیماران میلومی وارتباط آنتی ژنیکی بین پروتئینهای مختلف استفاده شده است . برای تهیه ژل آگار از حل آگار ۱/۵ درصد در تامپون فسفات (pH 7.2) استفاده شده است .

۶— Immunoselection : برای ایمونوسلکشن از متد J. Radl (15-16) استفاده شده است . این متد برای تعیین نوع زنجیره سبك ایمونوگلوبولین ها ونیز برای نشان دادن زنجیره سنگین آزاد در سرم افراد مبتلا به لنفوم روده باریك

بکاررفته است . این متد در دو مرحله صورت گرفته است :

مرحله الکتروفورز روی ژل آگاری که بآن آنتی سرم اضافه شده است .

مرحله دوم بازکردن شیار واضافه کردن آنتی سرم نوع دیگر.

الف ــ برای نشان دادن نوع زنجیره سیستیک ایمونوگلوبولین ها :

۱ــ استفاده از (K-Sp) K-Selection-Plate

به ۲/۵ میلی لیتر آگار حل شده در تامپون باربیتال (PH 8.6 ، µ0/025 ،

درجه حرارت ۵۰ درجه سانتیگراد) ۰/۰۲۵ میلی لیتر آنتی سرم تیپ (K)

افزوده شده است . بعد ازپایان الکتروفورز (۳ــ۲ ساعت) به شیار وسط آنتی سرم

(L) اضافه شده است وبعد از ۱۶ ساعت نتیجه بررسی شده است .

در طول مدت الکتروفورز تمام ایمونوگلوبولین ها بازنجیره (K) راسب خواهند

شد واگرایمونوگلوبولینی بازنجیره (L) موجود باشد بعد از اضافه کردن آنتی سرم

تیپ (L) یک باند رسوبی تشکیل خواهد شد .

۲ــ (L-Sp) L-Selection Plate

عکس حالت فوق انجام میگیرد یعنی آنتی سرم تیپ (L) به آگار افزوده وبعد از

الکتروفورز آنتی سرم تیپ (K) به شیار وسط اضافه شده است . اگر باند رسوبی

تشکیل شود زنجیره سبک ازتیپ (K) خواهد بود .

ب ــ برای نشان دادن زنجیره سنگین آزاد (K+L-Sp) K+L-Selection plate

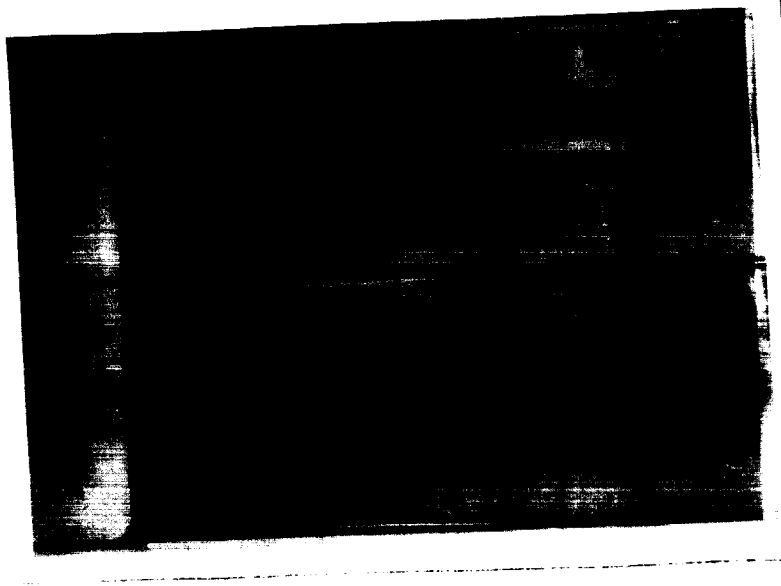
به ۲/۵ میلی لیتر آگار با مشخصات ذکرشده در بالا ۲۵ هزارم میلی لیتر Anti-k + L افزوده شده پس از پایان الکتروفورز (۳ــ۲ ساعت) به شیار وسط آنتی آلفا (Anti Alfa) اختصاصی اضافه شده و بعد از ۱۶ ساعت نتیجه بررسی شده است . در طول مدت الکتروفورز تمام ایمونوگلوبولین های کامل با هر دو تیپ زنجیره سبک (K) و (L) راسب خواهند شد و بعد از اضافه کردن آنتی آلفا (Anti Alfa) به شیار وسط زنجیره آلفای آزاد یک باند رسوبی ایجاد خواهد کرد .

<u>نکات و ملاحظاتی که در ایمونوالکتروفورز سرم بیماران مونوکلونال باید در نظر داشت:</u>

در آزمایشات ایمونوالکتروفورز نسبت بین آنتی ژن و آنتی سرم ، محل نمونه گذاری ، محل شیار و فاصله آن تا نقاط نمونه گذاری بسیار مهم است . در بعضی از موارد با اینکه تمام شرایط فوق مهیا است باز هم نتایج مطلوب بدست نمیاید زیرا در فاصله زمانی معین یک هلال ظاهر و بعد از بین رفته و هلال دیگری ظاهر خواهد شد . در این مورد محققین توصیه میکنند که در ساعات مختلف از ایمونوالکتروفروگرام عکس برداری شده تا نتایج بطور کامل ثبت گردد . نسبت بین آنتی ژن

وآنتی سرم درآزمایشات ایمونوالکتروفورز بسیار حائز اهمیت است . دربسیاری موارد بعلت ضعیف بودن آنتی سرم وزیاد بودن آنتی ژن بند رسوبی تشکیل شده براثر کیفیت Parazone درزیادی آنتی ژن حل ودرنتیجه نزدیك به شیار دخول آنتی سرم قرارخواهدگرفت واگرمقدارآنتی سرم زیاد وآنتی ژن ضعیف باشد بند رسوبی ازشیار وسط دورخواهد شد وبعلت کیفیت Postzone بند درزیادی آنتی سرم حل خواهد شد وتشخیص پروتئین مونوکلونال بسیارمشکل خواهد شد .

شکل ۱ــ ایمونوالکتروفورز یك بیمار میلومی متعلق به کلاس IgG رانشان میدهد . شماره یك وقتی است که یك آنتی سرم ضعیف بکاررفته وبعلت زیادی IgG، میلومی بند رسوبی تشکیل‌شده درزیادی IgG حل ونامشخص‌بنظر میرسد. شماره دو همان سرم وآنتی سرم است وفقط مقدارکمی Anti- IgG قوی به آنتی سرم اضافه شده است وهمانطور که مشخص است بند میلومی بسیار واضح دیده میشود .



شکل ۱

برای آزمایشات ایمونوالکتروفورز از آگارو آگاروز میتوان استفاده کرد . ولی در مطالعات برروی ایمونوگلوبولینها آگاروز بر آگار ارجحیت دارد زیرا کیفیت الکترواند اسمز هنگامیکه آگاروز بکارمیبریم کمتراست و در نتیجه بند های ایمونوگلوبولین هابسیار واضح ترخواهد بود . تصویر زیر ایمونوالکتروفورز برروی آگار وآگاروز رانشان میدهد وهمانطورکه مشخص است در ایمونوالکتروفورز رو ی آگاروز بند های رسوبی IgG, IgA, IgM کاملا" مشخص هستند . ما در موارد یکه آگاروز در اختیار داشته ایم ازآگاروز ودر موارد عدم دسترسی ازآگاراستفاده کرده ایم.