# ابداع روش فلوریمتری برای گیرنده‌های فاکتور رشد عصب انسان جهت شناسائی بیماریهای دژنراتیو مغز و اعصاب

دکتر ابوالفضل نظریان *

خلاصه :

عامل رشد عصب NGF (Nerve Growth Factor) نقش اساسی در رشد، تکامل و حفظ حیات سلولهای عصبی بویژه نرونهای حسی (گیرنده درد) و نرونهای سمپاتیک در سیستم محیطی و نرونهای کولینرژیک در ناحیهٔ فوربرین در سیستم مرکزی دارد. فعالیت بیولوژیکی NGF طی برهم کنش اختصاصی با نواحی خارج سلولی دو گروه از گیرنده‌های ویژه NGF (NGFR) آغاز می‌گردد. تولید گیرنده‌های رشد عصب در دژنراسیون‌های عصبی از قبیل آلزایمر، پارکینسون و اسکلروز افزایش می‌یابد و بخش خارج سلولی گیرنده‌های رشد عصب بصورت محلول [1] (T-NGFR)در آمده و در مایعات بیولوژیک مانند ادرار انتشار می‌یابد که در مقایسه با افراد سالم مقدار قابل توجهی دارد، لذا سنجش T-NGFR مایعات بیولوژیک می‌تواند بعنوان شاخص در تعیین روند دژنراسیون عصبی بکار گرفته شود .

در این بررسی شیوهٔ جدیدی با ابداع فلوریمتری هموژن [2]، مقادیر فوق العاده پایین را در ادرار (100 mg/ml )از T-NGFR با سهولت، سرعت و دقت زیادی اندازه‌گیری می‌نماید .

NGF خالص شده از غدد تحت فکی موش با فلورسئین نشان دار گردیده سپس بر علیه NGF نشان شده خالص (F-NGF) یک آنتی بادی در خرگوش تهیه شده است که اصطلاحاً آنتی فلورسئین نام دارد .

به محض برهم کنش F-NGF با آنتی فلورسئین در سرم خرگوش فلورسانس F-NGF عمدتاً فرونشانده می‌شود .اما چنانچه مقداری از نمونه ادرار بیمار در مخلوط مورد آزمایش افزوده شود، از خاموش شدن فلورسانس ممانعت بعمل می‌آورد. این پدیده اتصال F-NGF را با T-NGFR در ادرار بیمار اثبات می‌کند که آنتی فلورسئین قابلیت پیوند به این کمپلکس را ندارد بطوریکه با سنجش نتایج فلورسانس در مخلوط مورد آزمایش مقدار T-NGFRادرار قابل محاسبه می‌باشد و برخلاف روش‌های متداول نیازی به جدا سازی وجود ندارد .

در نتیجه با بکارگیری F-NGF و آنتی فلورسئین مقدار T-NGFRدر ادرار بیماران بدست آمده و در مقایسه با نمونه ادرار فرد سالم روند دژنراسیون عصبی در مراحل اولیه بیماری بدست می‌آید. این روش به لحاظ کیفی و حساسیت نیز ارزیابی شده است .

واژه‌های کلیدی: ایران، زنجان، دانشگاه علوم پزشکی، فاکتور رشد عصب، گیرنده‌های محلول ،فلوریمتری

* متخصص بیوشیمی بالینی، عضو هیأت علمی بیوشیمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشت درمانی استان زنجـــان

1 - Truncated Nerve Growth Factor receptor .

2 - Sequential Homogeneous Fluororeceptor assay

**مقدمه :**

فاکتور رشد عصب NGF برای رشد، تکامل و حیات نرونهای حسی، سمپاتیک و کولینرژیک ضرورت دارد (۱). NGF در سلولهای هدف دارای دو نوع گیرنده (TrkA,P75) می‌باشد (۲و۳)، که علیرغم تفاوتهای ساختمانی و میل ترکیبی (Kd) هر دو به NGF متصل می‌شوند و طبق فرضیات و مدل‌های ارائه شده برای انتقال بهینه پیام NGF، همراهی و هماهنگی آنها اهمیت بسیار دارد (۴).

تولید NGF و گیرنده‌های آن در دوران جنینی و تکامل در سطح بالائی قرار داشته که علت آن هم وابستگی نرونها در سیستم عصبی مرکزی و محیطی به این فاکتور رشد می‌باشد (۵)، ولی در سنین بلوغ تولید NGF و گیرنده هایش در سطح پائین نگهداری می‌گردد. صدمات وارده به نرونها در بیماریهای نرودژنراتیو سنتز مجدد آنها را تحریک کرده روند انتشار گیرنده‌ها بصورت محلول T-NGFR بطور قابل توجهی افزایش می‌یابد (۷و۶). طبق تحقیقات محلول سازی گیرنده‌ها در اثر پروتئازهای معینی صورت می‌گیرد و توسط مهار کننده‌های آنزیمی می‌توان از آن ممانعت کرده و از سیر تخریب نرونها جلوگیری کرد (۸).لذا به نظر می‌رسد گیرنده‌های محلول، شاخص بسیار خوبی در تشخیص بیماریهای نرودژنراتیو محسوب می‌شوند که با توجه به ترشح مقدار زیادی از آنها در مایعات بیولوژیک (ادرار) بخوبی قابل تشخیص می‌باشند .

در این تحقیق با ابداع روش فلوریمتری فاکتور رشد عصب پس از خالص سازی بوسیله فلورسین نشاندار شده (F-NGF) در غلظت نانو گرم قابل اندازه‌گیری می‌باشد، یک آنتی بادی بر علیه F-NGF تولید گردیده فلورسانس آن را کوئینچ می‌نماید. گیرنده‌های محلول موجود در ادرار می‌توانند بطور اختصاصی به F-NGF متصل گردیده و از واکنش آنتی بادی به آن ممانعت نمایند و فلورسانس را افزایش دهند، چون افزایش فلورسانس با میزان T-NGFR در نمونه ادرار مورد آزمایش متناسب است، لذاگیرنده‌های محلول بطور غیر مستقیم اندازه‌گیری می‌شوند. روش فلوریمتری که بر اساس ممانعت از کوئینچ فلورسانس در مورد پروتئینهای دیگر خون مانند سرم آلبومین توسط Nargessi et al (۹) انجام شده بود؛ برای اولین بار برای گیرنده‌های NGF طراحی شد. پایداری آنتی فلورسین (Ant-F) و F-NGFدر طول آزمایش ثابت بوده، قابلیت تکرار پذیری و درصد اطمینان این روش بسیار خوب بود. ویژگی اتصال F-NGF با Ant-F و T-NGFR بوسیله روش ژل دیفیوژن نیز مورد تأیید قرار گرفت (۱۰) .

**مواد و روشها :**

مواد مهم :

7SNGF,FITC (Flourescein Isothiocyanate Acrylamid, bis - acrylamide , Freunds adjuvant (complete and incomplete) Tween-80 , Tris (Hydroxy methyaminomethan) , DEAE Cell , Sephadexes (G25-100, 200)

(از شرکت‌های سیگما و واتمن )

**روش‌ها :**

۱ ـ خالص سازی فاکتور رشد عصب 7S-NGF مطابق روش Varon (۱۱) از غدد بزاقی موش نر در طی سه مرحله کروماتوگرافی توسط بافر ۰/۵٪ مولار

تریس ۷/۴ =PH انجام گردید، نحوه استخراج خالص سازی 7S-NGF بطور خلاصه در شکل (۱) نشان داده است .

۲ ـ نشاندار کردن 7S-NGF مطابق روش Nargessi et al (۹) بااتصال فلورسین به نسبت (۱:۱) به NGF بمدت یک شب انکوباسیون در سرد خانه انجام شد و خالص سازی F-NGF از FITC مازاد با دو بار ژل فیلتراسیون با سفادکس G-25 انجام گردید، نمودار (۱) .

۳ ـ تهیه آنتی بادی پلی کلونال (Ant-F): F-NGF ۱/۷(mg/ml) با حجم برابر با Freund's Adjuvant کامل بصورت امولسیون زیر پوستی در خرگوش نر مطابق روش Landon et al (۱۲) تزریق شد. تزریق‌های یادآوری شده (Boosts)، به ترتیب با غلظت mg/ml ۰/۸۵ و ۰/۴ به حجم برابر آجوانت ناکامل در فواصل یکماهه صورت گرفت، ۱۰ روز پس از آخرین تزریق، تیتر آنتی بادی در سرم خرگوش ایمن در مقایسه با خرگوش غیر ایمن (کنترل) با فلوریمتری معین شد. (نمودار ۲).

۴ ـ فلوریمتری : خصوصیات فلوریمتری برای واکنش مناسب Ant-F با F-NGF از نظر نوع بافر، PH، زمان انکوباسیون و غلظت‌های F-NGF و Ant-F در بافرهای تریس، بیکربنات، استات حاوی ۰/۱٪ Tween-80 و M ۰/۱۵۳، کلرور سدیم انجام شد و بوسیله اسپکترو فلوریمتر Perkin Elmer LS3, USA در طول موجهای EX=495nm ، EM= 515 ، بصورت درصدهای فلورسانس در بخش نتایج مشاهده می‌شود .

۵ ـ ممانعت از کوئینچ فلورسانس بوسیله T-NGFR : نمونه ادرار حاوی T-NGFR از واکنش Ant-F با F-NGF ممانعت می‌کند. چندین غلظت از نمونه ادرار که با روش کروماتوگرافی تعویض یونی، بطور نسبی خالص و تغلیظ گردیده بود مدتی قبل از افزودن Ant-F به مخلوط آزمایش وارد گردید. درصدهای فلورسانس بر اساس میزان T-NGFR موجود در ادرار محاسبه گردید .

۶ ـ ایمونودیفیوژن: ویژگی اتصال F-NGF با Ant-F و T-NGFR در محیط نیمه جامد آگاروز ۱٪ بدو صورت یک بعدی و دو بعدی انجام گردید (۱۰،۱۳) .

۷ ـ الکتروفورز SDS-PAGE: فراکشن‌های NGF پس از خالص سازی، با نمونه استاندارد (sigma) در الکتروفورز SDS-PAGE مطابق روش Lammeli (۱۴) در مقایسه با سرم آلبومین انجام شد.

۸ ـ تشخیص بیماری نرودژنراتیو: تعداد ۴۰ نفر از بیماران نرودژنراتیو، افراد ظاهراً سالم (نرودژنراتیو مشکوک) و افراد سالم در دو گروه سنی پائین و بالاتر از ۶۰ سال از زنان و مردان با روش ممانعت از کوئینچ فلورسانس آزمایش و میانگین غلظت گیرنده‌های محلول آنها تعیین شدند .

۹ ـ آزمونهای کنترل کیفی: دقت آزمایشات فلوریمتری در یک روز و روزهای متوالی، میزان ویژگی، حساسیت، کارائی، تکرار پذیری و محدوده اندازه‌گیری مورد بررسی قرار گرفتند .

## نتایج :

F-NGF پس از ژل فیلتراسیون با سفادکس G-25 از نظر فلورسانس در EM=515 nm و جذب طول موج ۲۸۰nm در فراکشن‌های Elute شده توسط تریس .050M در PH=7.4 طبق نمودار (۱) دال بر نشاندار

شدن NGF بوسیله فلورسین می‌باشد .

قابلیت کوئینچ فلورسانس سرم خرگوش ایمن شده حاوی Ant-F در رقت ۱/۲۰۰ می‌تواند ۵۰ درصد از فلورسانس F-NGF راکوئینچ نماید نمودار (۲).

شرایط مطلوب برای فلوریمتری در بافرهای M .06 Acetate , Bicarbonate Tris بترتیب در PHهای ۷/۴، ۸/۵ و ۵/۲۵ در مدت انکوباسیون ۱۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه در نمودار (۳) مشاهده می‌شود .غلظت مطلوب برای F-NGF در فلوریمتری در نمودار (۴) ارائه شده است .

ممانعت از کوئینچ F-NGF بوسیله T-NGFR که مهمترین آزمایش در این تحقیق بود در نمودار (۵) مشاهده می‌شود که با افزایش حجم ادرار یا بعبارت دیگر افزایش میزان T-NGFR، فلورسانس متناسباً زیاد شده است .

الگوی الکتروفورز 7S-NGF، فراکشن‌های مراحل مختلف کروماتوگرافی، آلبومین خالص و 7S-NGF استاندارد (سیگما)، تفاوت تحرک الکتروفورزی و زیر واحدهای پروتئینی را در نمونه‌های مربوطه در شکل (۲) نشان داده شده است .

بیماران نرودژنراتیو در مقایسه با افراد کنترل در دو گروه پائین و بالاتر از ۶۰ سال مورد مقایسه قرار گرفتند.

میانگین غلظت T-NGFR در بیماران نرودژنراتیو پیشرفته بیش از (ng/ml) ۴۰۰ و در بیماران ابتدائی حدود (ng/ml) ۳۰۰ و در افراد سالم کمتر از ۲۰۰ است و از لحاظ جنسی در زنان و مردان اختلاف معنی داری مشاهده نمی‌شود $P<0/05$ که در نمودار شماره ۶ ارائه گردیده است.

7S - NGFpreparation Procedures

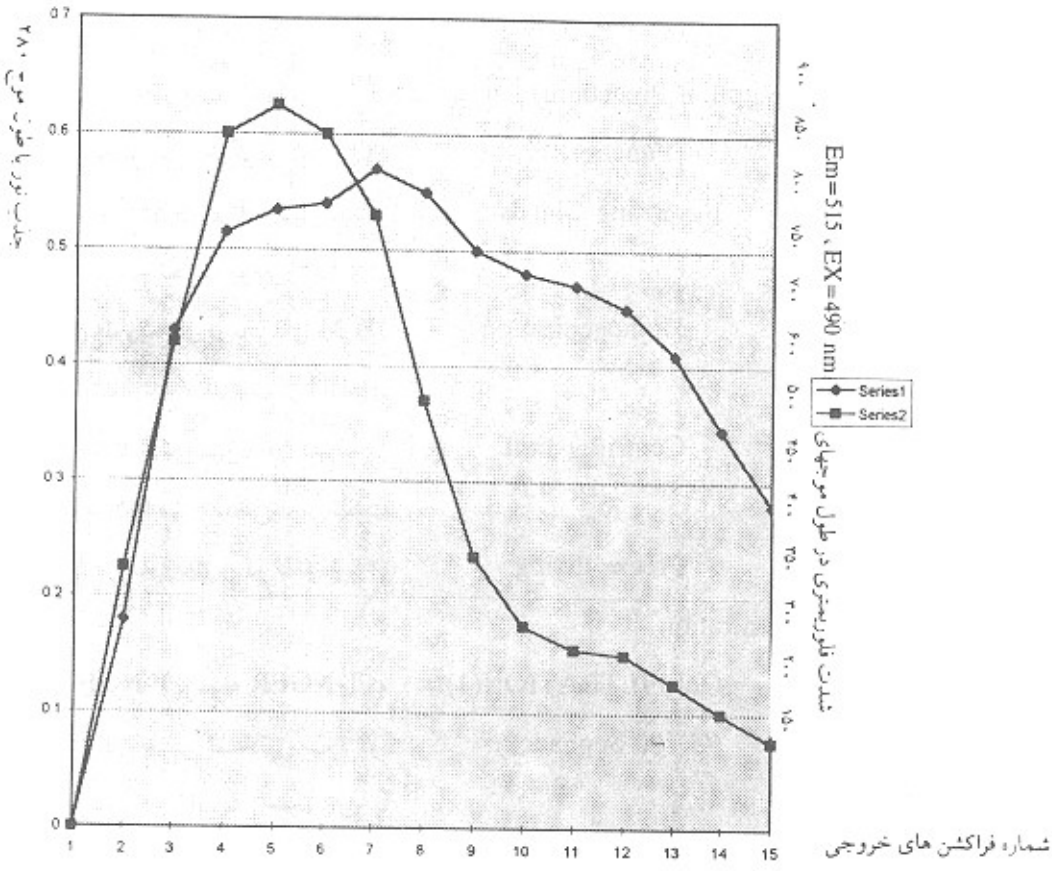
| (Materials) | (Functions) |
|---|---|
| Sub-Maxillary Glands | Removing Glands |
| ↓ | ↓ |
| | Homogenization |
| Homogenate | ↓ |
| | Centrifugation |
| Supernatant | ↓ |
| | Freeze drying |
| Powdered cocentration | ↓ |
| | Gel-FILTRATION(1) |
| | (G 100 Sephadex) |
| G-POOL | ↓ |
| | ION-EXCHANGE |
| | (DEAE-CELL) |
| D-POOL | ↓ |
| | GEL FILTRATION |
| | (G-200 SEPHADEX) |
| 7S - NGF | |

شکل شماره ۱:

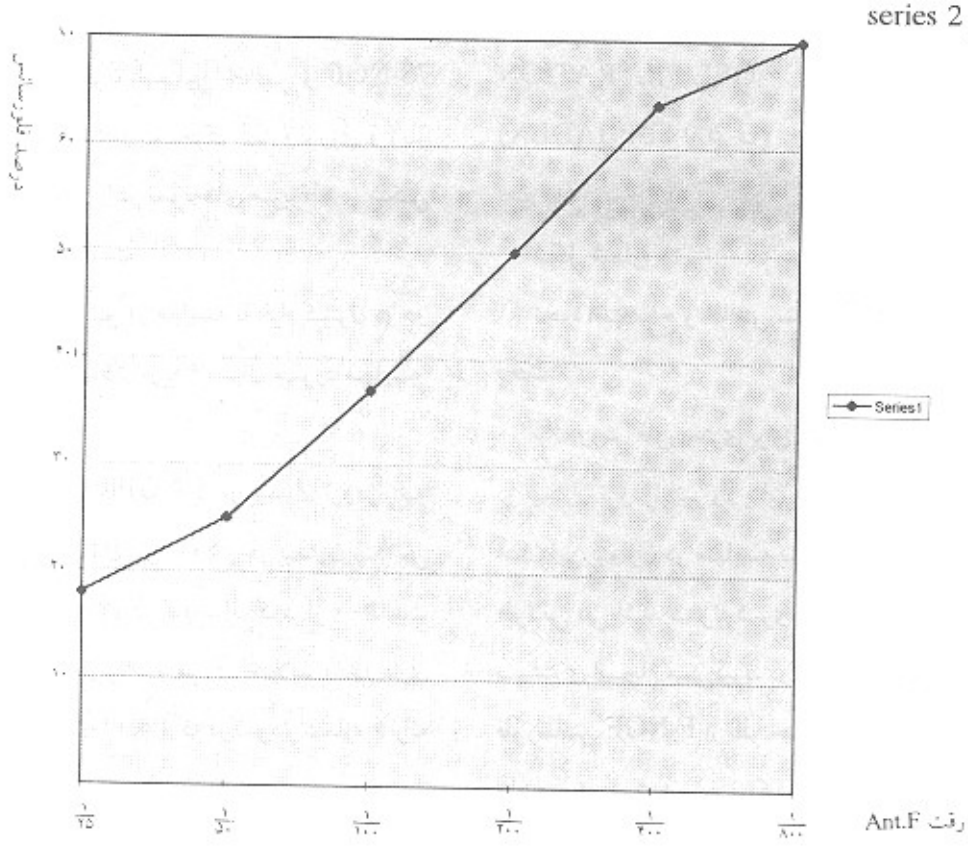
نحوه استخراج و خالص سازی 75-NGF

**بحث:**

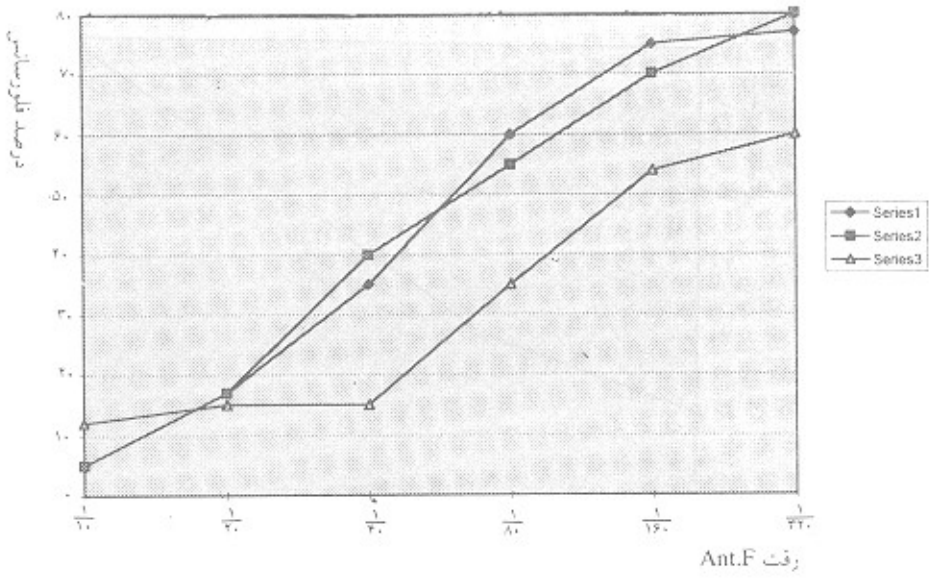
ارائه روش فلوریمتری برای اندازه‌گیری T-NGFR در بیماران نرودژنراتیو راه یابی به تشخیص سریع و آسان این بیماران در مقایسه با روش‌های پرخرج و طولانی می‌باشد. نمونه‌گیری از بیماران با سهولت بیشتری انجام می‌گیرد. در این تحقیق پایداری فلورسانس F-NGF از نظر حساسیت فلورسین بعنوان هاپتن متصل شده به فاکتور رشد طی شش ماه آزمایش‌های مداوم دارای میانگین فلورسانس




نمودار شماره ۱: کروماتوگرافی با G-25، برای خالص سازی F-NGF از FITC ، جذب نور series 1 U.V،
فلورسانس series 2

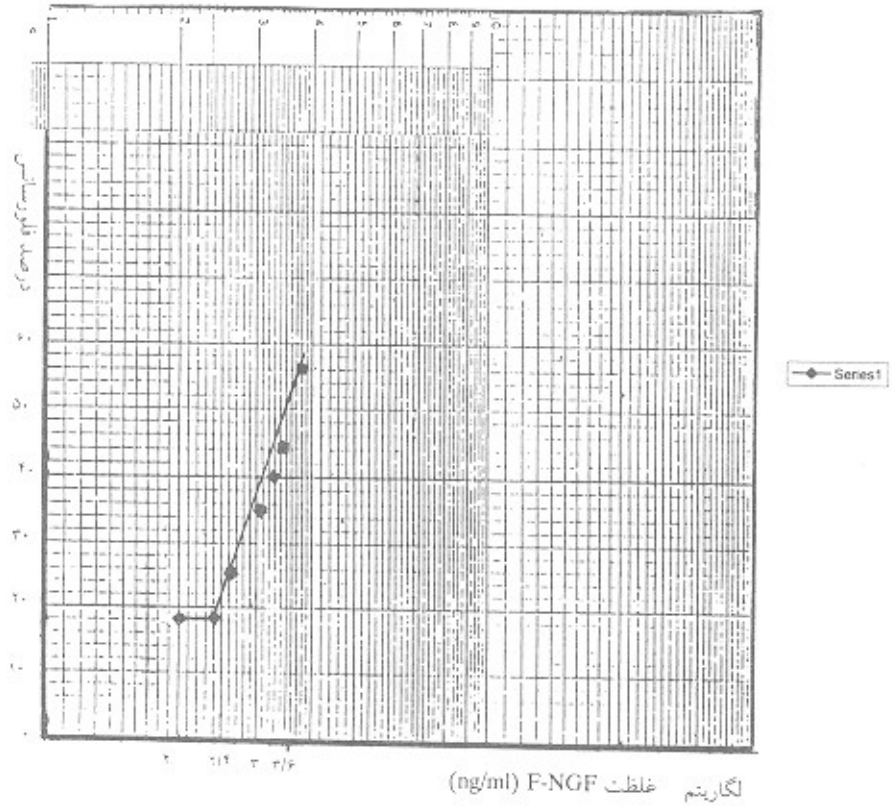



نمودار شماره ۲: انتخاب رقت مناسب از Ant - F (آنتی فلورسئین) جهت بکارگیری در آزمایش فلوریمتری

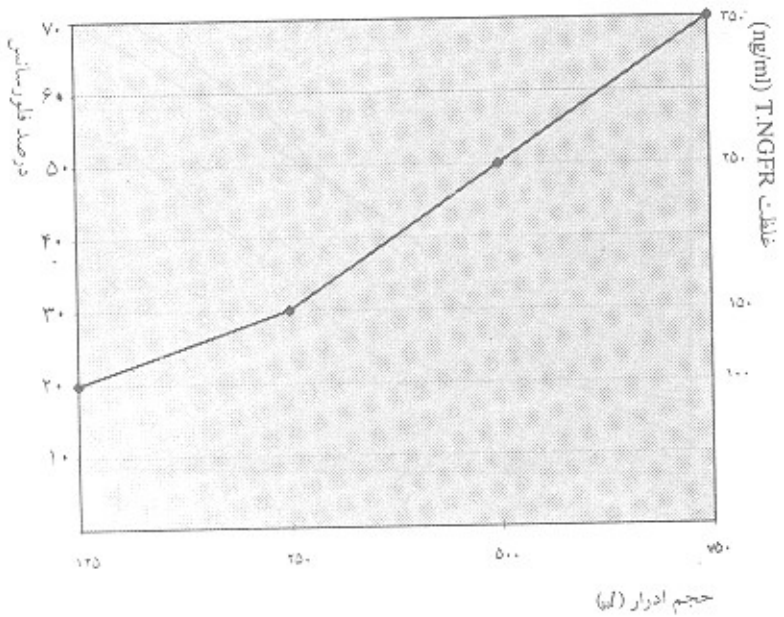



نمودار شماره ۳: تیتراسیون آنتی فلورسین در بافرهای مختلف

series 1 بافر با PH=7.4 series 2 بافر بیکربنات PH= 8.5 series 3 بافر استات با PH = 5.28

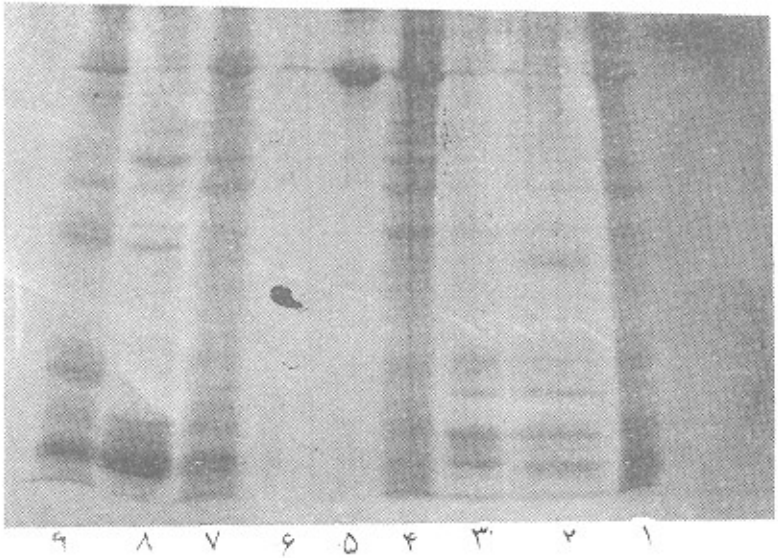



نمودار شماره ۴: تعیین غلظت مناسب F-NGF تغییرات فلورسانس پس از ۱۰ دقیقه انکوباسیون در حرارت آزمایشگاه در ۳ میلی لیتر بافر تریس در رقت ثابت Ant-F ۱/۶۰ و لگاریتم غلظت‌های F-NGF




نمودار شماره ۵: انتخاب حجم نمونه ادرار حجم‌های ۱۲۵ و ۲۵۰ و ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرو لیتر از بیماران و شاهد با سه تکرار ؛ با افزایش گیرنده‌های محلول، ممانعت بیشتری از کوئینچ فلورسانس صورت گرفته که غلظت آنها را نشان می‌دهد.

شکل شماره ۲: الکتروفورز (SDS-PAGE)، NGF در روند خالص سازی در ۱۵٪ ژل پلی آکریلامید ناپیوسته مطابق روش Laemmli (146)




۱ ـ G ـ ۱۰۰ pool

۲ ـ 7S-NGF خالص شده

۳ ـ 7S-NGF خریداری شده از سیگما

۴ ـ فراکشن G ـ ۱۰۰

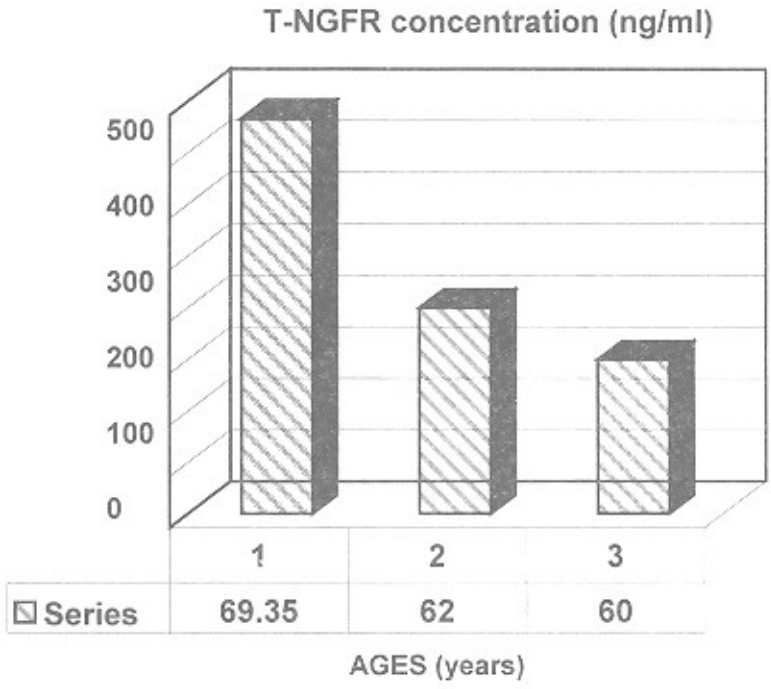
۵ ـ سرم آلبومین گاوی (BSA) خالص

۶ ـ F-NGF

۷ ـ DEAE-pool (۰/۰۸ مولار Nacl)

۸ ـ فراکشن D در اثر ۰/۳ مولار Nacl

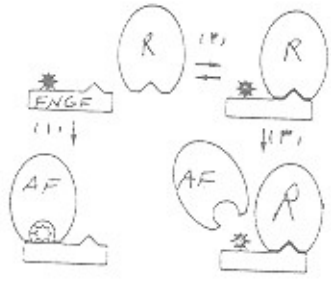
۹ ـ سوپ حاصله پس از سانتریفوژ هموژن غدد بزاقی




نمودار شماره ۶ : مقایسه غلظت گیرنده‌های محلول در نمونه‌های مختلف

Series 1 : بیماران نرودژنراتیو Series 2 : بیمـــاران ظاهراً سالم (مشکوک)

Series 3 : افراد سـالم (کنتـــرل)




R : T-NGFR

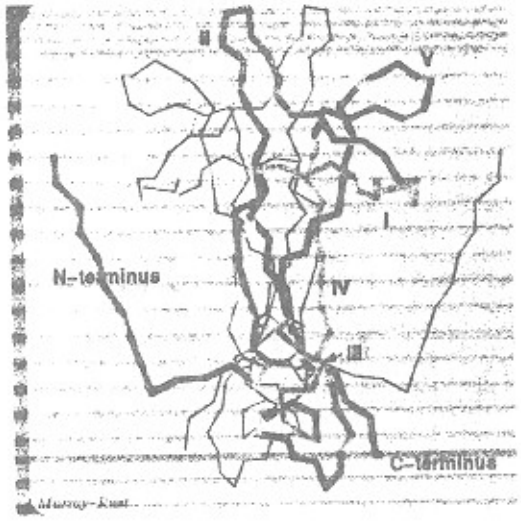
AF: Ant . F

شکل شماره ۳: شمای ساده از کنش متقابل آنتی فلورسین و گیرنده محلول با آنتی ژن نشاندار F-NGF

۱) واکنش آنتی فلورسین با آنتی نشاندار منجر به کوئینچ می‌گردد.

۲) کنش گیرنده محلول با آنتی ژن نشاندار تأثیری در فلورسانس ندارد.

۳) پس از اتصال گیرندهٔ محلول با آنتی نشاندار از کنش آنتی فلورسین ممانعت بعمل می‌آید.




شکل شماره ۴: تصویر فضائی پروتومرهای آنتی پارالل NGF

۵۹/۱۲±۶ در غلظت (ng/ml) ۲۵۰ بود و از طرف دیگر Ant-F قابلیت کوئینچ نسبتاً ثابتی در طول آزمایشات با میانگین ۴۶/۳۷±۵ در رقت ۱/۲۰۰ بود. نمونه ادرار صبحگاهی در حجم ۰/۵ میلی لیتری برای آزمایش ممانعت از کوئینچ مناسب بود.

روش ما یک فن فلوریمتری هموژن متوالی Scquential Homogenous Fluoroimmuno Assay (SHFA) است که پس از واکنش T-NGFR با F-NGF یک کمپلکس متصل تشکیل می‌گردد که Ant-F را نمی‌پذیرد و Ant-F تنها می‌تواند به باقیمانده F-NGF (آزاد) متصل شود و با این عمل فلورسانس F-NGF های آزاد را حذف می‌کند، لذا در این روش به مرحله جدا سازی نیاز نمی‌باشد و با اندازه‌گیری مخلوط هموژن، مقدار گیرنده‌های محلول در نمونه‌های ادرار قابل سنجش می‌باشد در حالیکه در روش‌های متداول مرحله وقت گیر جدا سازی، اجتناب‌ناپذیر است. از نکات منفی این روش، دخالت فلورسانس ادرار است که با استفاده از محلول شاهد از نمونه ادرار بر طرف می‌گردد. نمایش ساده‌ای از روش SHFA در شکل (۳) ارائه گردیده است.

مداخله آنتی فلورسین با گیرنده محلول از نظر اتصال با F-NGF با مطالعات ساختمان مولکولی NGF (۱۵)، آشکار گردیده است. پروتومرهای آنتی پارالل NGF که به صورت دیمر از زنجیره‌های متعدد B-sheet تشکیل شده‌اند، دارای لوپ‌های قابل دسترس می‌باشند، این لوپ‌ها دارای توالی‌های متغییرو خاص از اسیدهای آمینه در نوروتروفین‌ها می‌باشند و بعنوان مکانهای ویژه اتصالی با گیرندهای محلول گزارش شده‌اند، شکل (۴). یکی از لوپهای مهم در NGF سه توالی LYS. 95 , LYS 34 , LYS 32 . اسیدهای آمینه بارداری که برای اتصال با T-NGFR اختصاص دارند و در عین حال در معرض اتصال با فلورسئین قرار گرفته‌اند، T-NGFR بعلت کوچکی مولکول نمی‌تواند فلورسانس آنها را بپوشاند و به لحاظ ممانعت فضائی از ورود Ant-F جلوگیری می‌کند، اما در F-NGF های آزاد، این آنتی بادی قابلیت اتصال و پوشاندن فلورسانس را دارد.

دقت (Precision): اندازه‌گیری نمونه‌های مختلف در

یک روز ( inter assay) با CV%= 3-6/5 و در روزهای مختلف (inter assay) با CV%= 2-7 بود و تفاوت واریانس‌ها دارای P>0.05 و معنی دار نمی‌باشد. حساسیت آزمایش ۹۳/۷۵٪ با ویژگی ۸۵٪ و کارائی ۹۰٪ است. با توجه به حساسیت فوق العاده روش فلوریمتری در مقایسه با اسپکتروفتومتری و استفاده از واکنش ایمنی تا غلظت (ng/ml) ۱۰۰ از T-NGFR در نمونه قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

**سپاسگزاری :**

بودجه این پروژه تحقیقی توسط معاونت پژوهشی دانشکده علوم داروئی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین گردیده و با همکاری صمیمانه دست اندرکاران این دانشکده بویژه گروه بیوشیمی بالینی و استاد ارجمند جناب آقای دکتر منوچهر مصری‌پور به ثمر رسیده است، که بدینوسیله از کلیه عزیزان و سروران سپاسگزاری می‌گردد.

**کتابنامه :**

1 - Greene , L.A. & Shooter E.M. (1980), Ann . Biochem , 3 ; 353-362.

2 - Mahadeo , D. & Kaplan, T. (1994) , J. Biol. Chem. 269: 6884-6890.

3 - Schatteman, G. C & Langer , T . (1993) , Somatosens , Mol . Res , 10: 415-425.

4 - Hantzopaulos , P.A (1994) , J.Biol . Chem . 270:1230-1235.

5 - Katoh - Semba, R (1989), J. Neurochem. 52: 1557-1565.

6 - Muffson, E. J & Kordower, J.H. (1992) , P . N.A.S (USA), 89: 569-573.

7 - Distefano , P.S. & Glagettam , D.M .(1991) , Ann . Neurol .29:23-20.

8 - Distefano , P.S.& Chelsa , D.M. (1993) , J.Neuroscii . 13:2405-2414.

9 - Nargessi , RD. & Landon , J.(1979) , J. Immunol. Methods , 26: 307-313.

10 - Watts , G.F. & Bennett , J,E. (1986) , Ciln. Chem. 32 : 1544-1548.

11 - Varon , S., Nomura, J.& Shooter , E. M. (1967), Biochem . 6: 2202-2209.

12 - Landon , J . & Moffat , A.C. (1976) , Analyst , 101 : 225-243.

13 - Ochterlony , Q (1949) , Acta, Path. Microbiol. 26: 507 - 516 .

14 - Lammeli , U.K.(1970), Nature, 227: 680-685.

15 - Kruttgen, A. & Heymach, J.V.(1997) , J.Biol. Chem . 272: 29222-29228.