فیزیولوژی و فارماکولوژی
جلد ۸، شماره ۲، پاییز و زمستان ۸۳

اثر اریتروپویتین نوترکیب انسانی بر کاهش تیتر آنتی بادی ضد HLA در رات‌های حساس شده

اکبر وحدتی[۱]، مینو ادیب[۲]، تاجی افروز[۱]، شیرین کشفی[۱]

۱- دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی
۲- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، گروه ایمنولوژی

چکیده

اریتروپویتین هورمونی است که در ابتدا به عنوان فاکتور محرک تولید وتمایز سلولهای پیش‌ساز گلبول قرمز شناسایی شد. در سالهای اخیر، گسترش استفاده از اریتروپویتین نوترکیب انسانی(rHuEPO) در بیماران کم خون توجه پژوهشگران را به تاثیر این هورمون بر سیستم ایمنی جلب نمود. در پژوهش حاضر، تغییرات تیتر آنتی بادی ضد HLA درسه گروه رات حساس شده پس از کاربرد دو دوز ۲۰U/Kg و ۱۰۰ ازrHuEPO مورد توجه قرار گرفت. به منظور ایجاد پیش حساسیتی در راتها از آنتی‌ژنهای HLA سطح لنفوسیتهای انسانی استفاده شد. تیمار با اریتروپویتین، پس از سه بار تزریق لنفوسیت انسانی به راتها آغاز گردید. گروه شاهد تنها با لنفوسیت تحریک شد. تزریق rHuEPO به صورت زیرپوستی، دو بار در هفته و به مدت شش هفته انجام گرفت. از روش میکرولنفوسیتوتوکسیسیتی برای تعیین تیترآنتی بادیهای ضد HLA استفاده شد. نتایج نشان می دهد که کاربرد rHuEPO، موجب کاهش معنی دار در تیترآنتی بادیهای ضد HLA می شود. احتمال دارد کاهش تیتراین نوع آنتی بادیها در شرایط این بررسی، ناشی از تاثیر اریتروپویتین بر زیر گروه های لنفوسیتی در جهت کاهش تعداد یا میزان فعالیت لنفوسیتهای T و B و کاهش ایمنی هومورال باشد. همچنین می توان کاهش تیتر آنتی بادی را به تفاوت دوزهای rHuEpo، مدت تیمار یا میزان حساسیت قبلی راتها نسبت داد.

واژه‌های کلیدی : اریتروپویتین نوترکیب انسانی، آنتی بادی، لنفوسیت

مقدمه

اریتروپویتین هورمونی گلیکوپروتئینی است که بیشتر در پاسخ به هیپوکسی بافتی و به طور عمده در کلیه ها تولید و ترشح می شود. اریتروپویتین تنظیم کننده اصلی تولید و تمایز گلبول های قرمز خون است [۱]. امروزه ساخت اریتروپویتین نوترکیب انسانی (recombinant human erythropoietin=rHuEPO) با فن‌آوری نوترکیبی DNA امکانپذیر است [۲]. rHuEPO فاکتوری بسیار موثر در تحریک خونسازی در بیماران کم خون و بیماران دارای نقص کلیوی می باشد [۳،۲]. در سال های اخیر، گسترش روزافزون استفاده از این هورمون- دارو باعث شد تا وظایف جالب توجه دیگری به آن نسبت داده شود. از جمله، Pfaeffl و همکاران (۱۹۹۸) تغییراتی در

جمعیت زیرمجموعه های لنفوسیت ها، تحت تاثیر rHuEPO مشاهده نمودند [۴]. اطلاعات کنونی نشان می‌دهد که rHuEPO می‌تواند بر هر دو بازوی سیستم ایمنی هومورال و سلولی تاثیر گذارد و خاصیت تعدیل کننده ایمنی (immunomodulatory) داشته باشد [۵،۳]. کاربرد روزافزون rHuEpo در بیماران کلیوی ودیالیزی در دهه نود، بر ایجاد تغییراتی در غلظت آنتی بادی دلالت دارد. برخی از مطالعات به اثر کاهش تیتر آنتی بادی های ضد HLA توسط rHuEpo اشاره دارند [۷،۶]. برای توضیح این پدیده برخی از پژوهشگران به اثرات مستقیم این هورمون بر سلول های ایمنی اشاره کرده اند[۸]. علاوه بر این نشان داده شده که rHuEPO می تواند الگوی ساخت سیتوکین ها را تغییر دهد [۹]. همچنین احتمال دارد اختلاف اثرات مشاهده شده بر سیستم ایمنی مربوط به دوز یا مدت درمان با rHuEPO باشد [۱۰،۵].

در پژوهش حاضر از رات به عنوان مدل مناسبی برای بررسی پیش کلینیکی اثر این هورمون بر پاسخ سیستم ایمنی و به ویژه تیتر آنتی بادی های ضد HLA استفاده شد. به علاوه در این تحقیق به تعیین اثر دوزهای متفاوت rHuEPO (با کاربرد دو دوز متفاوت) بر میزان تاثیر این هورمون بر تغییر تیتراین نوع آنتی بادی نیز توجه شده است.

مواد و روش‌ها

برای انجام آزمایش ها از ۳۶ سر رات ماده از نژاد *Sprague Dawley* (انستیتو پاستور، تهران، ایران) با زمینه ژنتیکی یکسان استفاده شد. پس از دو هفته نگهداری از آنها به منظور سازگاری با محیط، آزمایش ها آغاز گردید. وزن آنها در شروع آزمایش ۲۹۰-۲۴۰ گرم و سن آنها هفت هفته بود. تغذیه راتها به کمک مواد غذایی دانه ای استاندارد و به صورت ad libitum انجام گرفت.

همه رات ها با آنتی ژن های HLA لنفوسیت های انسانی ایمونیزه شدند. به این منظوربه هر رات ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون لنفوسیتی به صورت داخل صفاقی تزریق شد. برای تهیه لنفوسیت در تمام مراحل آزمایش، از یک دهنده واحد استفاده گردید و جداسازی لنفوسیت مطابق استانداردهای موجود انجام گرفت[۱۱]. برای تعیین اثر اریتروپویتین نوترکیب انسانی ازدو دوز ۲۰ و ۱۰۰ واحد بر کیلوگرم اپویتین آلفا (Epoetin alfa,Cilag,Switzerland) استفاده شد. تزریق ها به صورت زیر جلدی دو بار در هفته و به مدت شش هفته انجام گرفت.

رات ها به طور تصادفی به ۳ گروه ۱۲تایی تقسیم گردیدند. گروه اول به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. این گروه با تزریق لنفوسیت در روزهای صفر، ۲۲و۶۷ ایمونیزه شدند. در مورد گروه های آزمایشی، ابتدا در روزهای صفر، ۲۲و ۶۷ تزریق لنفوسیت صورت گرفت. سه روز پس از سومین تزریق لنفوسیت، ابتدا از رات ها خون‌گیری به عمل آمد، سپس به ترتیب دوزهای ۲۰ و۱۰۰ واحد بر کیلوگرم به مدت شش هفته روی آنها اجرا گردید. خون‌گیری از سینوس اوربیتال راتها انجام گرفت [۱۲]. سپس سرمها جدا شده و در شرایط ۲۲- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

از روش میکرولنفوسیتوتوکسیسیتی انستیتو بهداشت آمریکا برای اثبات حضور یا عدم حضور آنتی بادی های ضد HLA استفاده شد [۱۳]. نخست نمونه های سرم راتها را در حرارت اتاق ذوب نموده و رقت های مختلف آنها به روش رقیق سازی پی در پی تهیه گردید. از هر رقت (به مقداریک میکرولیتر) در هر چاهک پلیت HLA قرار داده شد. همچنین برای هر سری سرم، یک سرم کنترل مثبت و یک سرم کنترل منفی استفاده گردید. به هر چاهک یک میکرولیتر لنفوسیت اضافه شد. پس از نیم ساعت انکوباسیون در حرارت اتاق به هر چاهک ۵ میکرولیتر کمپلمان خرگوش (موسسه رازی، کرج، ایران) افزوده گردید. پس از

یک ساعت انکوباسیون مجدد در حرارت اتاق، دو میکرولیتر رنگ ائوزین (مرک، آلمان) و پس از آن ۵ میکرولیتر فرمالین (مرک، آلمان) به هر خانه اضافه گردید.

ترکیب هر یک از آنتی ژن های لنفوسیتی با آنتی بادی های مربوطه در سرم هر رات موجب فعال شدن کمپلمان و ایجاد سوراخی در غشا لنفوسیت می شود. چنین واکنشی موجب ورود رنگ ائوزین به داخل لنفوسیت و تمایز سلول های مرده (واکنش مثبت) از سلول های زنده (واکنش منفی) می شود. نتیجه این آزمایش با میکروسکوپ فازکنتراست و اینورت مشاهده و بر حسب درصد سلول‌های مرده از منفی تا چهار مثبت در آزمایشگاه ثبت گردید. سپس تغییرات جزئی غلظت آنتی بادی به صورت اسکور آنتی بادی تعریف می شود. اسکور در اینجا برای نشان دادن ارزش معادل شدت واکنش به کار می رود که طبق استانداردهای موجود به هرجواب اسکور مناسب داده شد [۱۳].

محاسبات آماری . کلیه داده ها توسط نرم افزار آماری SPSS مورد تجزیه وتحلیل قرار گرفت.برای مقایسه اختلاف میانگین اسکور آنتی بادی در هر گروه از t-test استفاده شد. برای مقایسه اختلاف میانگین اسکور آنتی‌بادی در گروه های مختلف از آنالیز واریانس یک طرفه و برای تعیین گروه های دارای اختلاف معنی دار از آزمون توکی استفاده شد. $p<0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد. نتایج ارائه شده به شکل میانگین ± انحراف معیار بیان گردیده است.

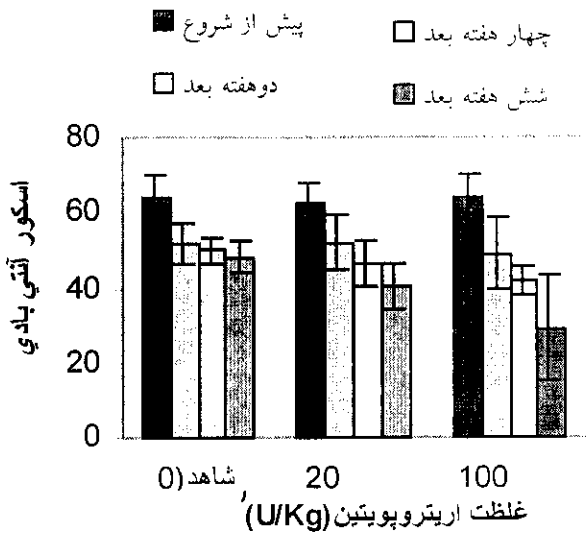
نتایج

میانگین اسکور آنتی بادی در گروه های شاهد و آزمایشی در جدول و نمودار۱ آورده شده است. این مقادیر شامل تعیین اسکور آنتی بادی پیش از شروع آزمایش و در طی آزمایش (به فواصل دوهفته‌ای) می باشد. همان گونه که ملاحظه می شود میانگین اسکور آنتی بادی در هر گروه کاهش یافته است. کاهش اسکور آنتی بادی در گروه شاهد تنها پس از گذشت شش هفته نسبت به مقادیر پیش از آن معنی دار است ($p<0.05$). همچنین کاهش میانگین اسکور آنتی بادی درگروه دریافت کننده دوز۲۰u/kg نیز پس از طی شش هفته نسبت به مقادیر پیش از آن معنی دار است ($P<0.05$) ولی این کاهش نسبت به گروه شاهد در هیچ زمانی از دوره آزمایش معنی دار نیست ($P>0.05$). اما اختلاف میانگین اسکور آنتی بادی در گروه دریافت کننده دوز ۱۰۰U/kg پس از طی چهار هفته تیمار با rHuEPO نسبت به مقادیر پیش از شروع آزمایش در همین گروه و نسبت به گروه شاهد کاهش معنی داری را نشان می دهد ($P<0.05$).

جدول۱- میانگین اسکور آنتی بادی در گروه های شاهد و آزمایشی پیش از شروع و در طی شش هفته دوره آزمایش در رات ها.

گروه ها	پیش از شروع آزمایش	پس از دو هفته	پس از چهار هفته	پس ازشش هفته
شاهد	۶۳/۹۰±۴/۵۶	۵۱/۷۳±۵/۰۸	۵۰/۱۰±۳/۳۹	۴۸/۳۰±۴/۴۷
دوز۲۰u/kg	۶۲/۵۸±۴/۹۹	۵۲/۰۸±۷/۱۱	۴۶/۷±۶/۰۷	۴۰/۳۵±۶/۳۰
دوز۱۰۰u/kg	۶۴/۱۶±۶/۰۵	۴۸/۸۳±۹/۵۹	۴۱/۷۰±۳/۸۶*	۲۹/۳۰±۱۳/۸۹ *

* اختلاف میانگین اسکور آنتی بادی بین گروه شاهد و گروه دریافت کننده دوز U/kg ۱۰۰ پس از چهار هفته معنی دار است ($P<0.05$).



نمودار ۱- مقایسه میانگین اسکور آنتی بادی در گروه های شاهد و تیمار. اسکور آنتی بادی طی شش هفته سه بار و هر بار به فاصله دو هفته اندازه گیری شده است.

بحث

تجویز اریتروپویتین به بیماران دارای نارسایی کلیوی و کم خون، نیاز آنها به تزریق مکرر خون را کم می کند. به این ترتیب، این هورمون موجب بهبود کم خونی می شود. اخیرا شواهدی به دست آمده که این هورمون می تواند به طور غیر مستقیم خطر تولید آنتی بادی های ضد HLA ناشی از تزریق خون را هم کاهش دهد[۶]. چون ممکن است کاهش آنتی بادی های ضد HLA در این بیماران به واسطه قطع یا کاهش انتقال خون نیز باشد، بنابراین انجام تحقیقات پیش کلینیکی بر روی جانوران آزمایشگاهی سالم می تواند به روشن شدن موضوع کمک کند.

نتایج بررسی کنونی، نشان می دهد که کاربرد rHuEPO در طی شش هفته موجب کاهش معنی دار تیتر آنتی بادی های ضد HLA در گروه تیمار با دوز ۱۰۰ U/kg از rHuEPO شده است. این نتیجه با یافته های Grimm و همکاران(۱۹۹۱) که از بیماران دیالیزی به دست آمده تطبیق می کند [۱۴]. آنها توانسته اند در بررسی های خود کاهش آنتی بادی های ضد کلاس یک HLA را به اثبات برسانند. همچنین بررسی های غروی و همکاران(۱۳۷۹) به کاهش تیتر آنتی بادی های ضد HLA اشاره دارد [۳].

برای توجیه این اثر می توان مکانسیم های احتمالی مختلفی را بیان نمود. اریتروپویتین می تواند به طور مستقیم بر زیرگروه های لنفوسیت های B و T اثر بگذارد و تعداد یا میزان فعالیت های آنها را کم نماید [۱۵]. Barany وهمکاران (۱۹۹۲) نیز بر اثر مستقیم این هورمون بر سیستم ایمنی تاکید دارند [۱۶]. Imiela (۱۹۹۳) نیز کاهش تمایز و تا حد کمتر تکثیر لنفوسیت های B و کاهش میزان فعالیت و پاسخگویی لنفوسیت های T و B نسبت به آنتی ژن را مسئول این امر می داند [۵].

از طرف دیگر احتمال می رود نتایج مشاهده شده ناشی ازمدت تیمار با rHuEPO باشد. گزارش شده است که کاربرد اریتروپویتین در طول ۶-۳ هفته میزان پاسخگویی لنفوسیت های B و T را کم می کند اما پس از آن پاسخگویی افزایش می یابد [۵]. همچنین Trzonkowski و همکاران (۲۰۰۲) برپایه تحقیقات خود به این نتیجه رسیدند که برای مشاهده اثر نهایی اریتروپویتین بر زیر مجموعه لنفوسیت های B و T شش ماه تا یک سال تیمار با این دارو لازم است [۱۰].

در بررسی حاضر تنها دوز ۱۰۰ U/kg موجب کاهش معنی دار تیتر آنتی بادی نسبت به گروه شاهد شده است. اصولا کلیرنس جذب بافتی اریتروپویتین در رات و انسان به صورت تابعی از دوز تغییر می کند. به این ترتیب که کاربرد دوز بیشتر (یا دفعات تزریق بیشتر) موجب تنظیم افزایشی گیرنده اریتروپویتین و افزایش جذب بافتی آن می شود [۱۷]. بنابراین با توجه به فارماکوکینتیک اریتروپویتین می توان احتمال داد که دوز ۱۰۰ U/kg تاثیر بیشتری بر بافت‌های هدف نسبت به دوز ۲۰ U/kg داشته و در نتیجه موجب کاهش بیشتر تیتر آنتی بادی شده است. برخی از

پژوهشگران معتقدند اثرات سرکوب کنندگی rHuEPO روی سیستم ایمنی در دوزهایی که طی درمان در سرم ایجاد می شود، می تواند دیده شود در حالی که اثرات تحریکی آن بر تولید آنتی بادی در دوزهای فارماکولوژیک این هورمون رخ می دهد [۵]. بنابراین به نظر می رسد برای اطمینان از اثر تعدیل کننده ایمنی توسط rHuEPO باید انتخاب دقیقی از دوز به عمل آید.

باید خاطر نشان ساخت تکرار تحریکات آنتی ژنی می تواند موجب افزایش حالت پیش حساسیتی شود. در این مورد چند امکان وجود دارد، یکی از آنها حضور معنی دار جمعیتی از لنفوسیت ها است که نه تنها شامل لنفوسیت های B بلکه زیر جمعیت های سلول های یاور نیز می شود. این سلول ها حتی پاسخ آنتی بادی به مقادیر کم آنتی ژن های HLA خارجی را تقویت می کنند [۱۴]. در این ارتباط، Vella (۱۹۹۸) نیز گزارش کرده است که کاربرد rHuEPO نمی- تواند باعث کاهش شاخصی در تیتر آنتی بادی های ضد HLA در بیمارانی شود که از پیش به طرق مختلف به میزان زیادی حساس شده اند[۱۸]. در مقایسه با این مشاهده ها احتمال دارد علت کاهش کمتر تیتر آنتی بادی در رات ها در هنگام استفاده از دوز ۲۰U/Kg، قرار گرفتن سیستم ایمنی در یک حالت فعال شده باشد. در چنین حالتی اریتروپویتین در کاهش تیتر آنتی بادی های لنفوسیتوتوکسیک در رات ها چندان موثر نبوده است.

وجود اثرات تعدیل کننده اریتروپویتین بر سیستم ایمنی ایده جدیدی است که تاکنون بیش از یک دهه از پیدایش آن می گذرد. به هر حال، اثر کاهش دهندگی اریتروپویتین بر تیتر آنتی بادی های ضد HLA در رات ها را می توان به اثر دوزهای به کار رفته، مدت تیمار یا میزان حساسیت قبلی رات ها مربوط دانست. البته اثر دقیق هریک از این عوامل ومکانیسم های مربوطه نیاز به بررسی های بیشتری دارد.

منابع

[1] Buemi, M., Aloisi, C., Cavallaro, E. and Floccari, F. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO): More than just the correction of uremic anemia. ***J. Nephrol.,*** 15 (2002) 97-103.

[2] Bieber, E. Erythropoietin, the biology of erythropoiesis and Epoetin alfa .***J. Reprod. Med.,*** 46 (2001) 521-530.

[۳] غروی، م.، ادیب، م. و آجودانی، ت. تاثیر اریتروپویتین نوترکیب انسانی (rHuEPO) در کاهش سطح آنتی بادی های HLA در سرم بیماران نیازمند به پیوند کلیه، ***مجله دانشکده پزشکی اصفهان***، سال هیجدهم، شماره ۶۰، (۱۳۷۹)، ۶۴-۵۹.

[4] Pfaeffl, W., Gross, H. and Neumier, D. Lymphocytes subsets and delayed cutaneous hypersensitivity in hemodialysis patients receiving recombinant human erythropoietin. ***Contrib. Nephrol.,*** 66 (1988) 195-204.

[5] Imiela, J., Kowalska, G., Malecki, R. and Gorski, A. Immunomodulatory action of human recombinant erythropoietin in man. ***Immun. Lett.,*** 35 (1993) 271-276.

[6] Aunsholt, N., Steffensen, G. and Ahlbom, G. Lymphocytotoxic panel reactive antibodies in hemodialyzed patients treated with recombinant human erythropoietin. *Nephron*, 59 (1991) 499.

[7] Friedlaender, M.N., Omaima, A., Rubinger, D. And Brautbar, C. Effect of human recombinant erythropoietin therapy on panel

reactive antibodies in chronic dialysis patients. ***Isr. J. Med. Sci.,*** 32 (1996) 730-736.

[8] Baj, Z., Pokoca, L., Majewska, E. and Luciak, M. T lymphocyte subsets and NK cell cytotoxicity in hemodialysis patients. The effect of recombinant human erythropoietin (rHuEPO) treatment. ***Arch. Immunol. Ther. Exp. Warsz.,*** 40 (1992) 201-206.

[9] Bryl, E., Mysliwska, J., Debska, A. and Trzonkowski, P. Recombinant human erythropoietin stimulates production of interlukin 2 by whole blood cell cultures of hemodialysis patients. ***Artif. Organ,*** 23 (1999) 809-816.

[10] Trzonkowski, P., Mysliwska, J., Debska, A. and Bryl, E. Long-term therapy with recombinant human erythropoietin decreases percentage of $CD152^{+}$ lymphocytes in primary glomerulonephritis hemodialysis patients. ***Nephrol. Dial. Transplant.,*** 17 (2002) 1070-1080.

[11] Boyum, A. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation and sedimentation at 1g. ***Scand. J. Clin. Lab. Invest.,*** 21 (1968) 77-89

[۱۲] تاج بخش، ح. و ستاری، م. ***پرورش حیوانات آزمایشگاهی***، انتشارات دانشگاه تهران، تهران (۱۳۴۹) ۱۲۵.

[13] Danovitch, G.M. ***Handbook of kidney transplantation,*** 3rd.ed. Williams& Wilkins, New York, (2001), 44-46.

[14] Grimm, P.C., Sinai, L., Sekiya, N.M. and Robertson, L.S. Effects of recombinant human erythropoietin on HLA sensitization and cell mediated immunity. ***Kidney Inter.,*** 38 (1990) 12-18.

[15] Steffensen, G., Aunsholt, N. and Povlsen, J. Evidence that treatment of ESRD patients with recombinant human erythropoietin induces immunosuppression in without affecting the distribution of peripheral blood mononuclear cell subpopulation. ***Clin. Nephrol.,*** 45 (1996) 98-103.

[16] Barany, P., Fehrman, I. And Godoy, C. Long-term effects on lymphocytotoxic antibodies and immune reactivity in hemodialysis patients treated with recombinant human erythropoietin. ***Clin. Nephrol.,*** 37 (1992) 90-96.

[17] Kato, M., Kamiyama, H., Okazaki, A. and Kumaki, K. Mechanism for the nonlinear pharmacokinetics of erythropoietin in rats. ***Pharmacol. Exp. Ther.,*** 283 (1997) 520-527.

[18] Vella, P., O Neill, D., Atkins, N. and Walshe, J. Sensitization to human leukocyte antigen before and after the introduction of erythropoietin. ***Nephrol. Dial. Transplant.,*** 13 (1998) 2027-2032.