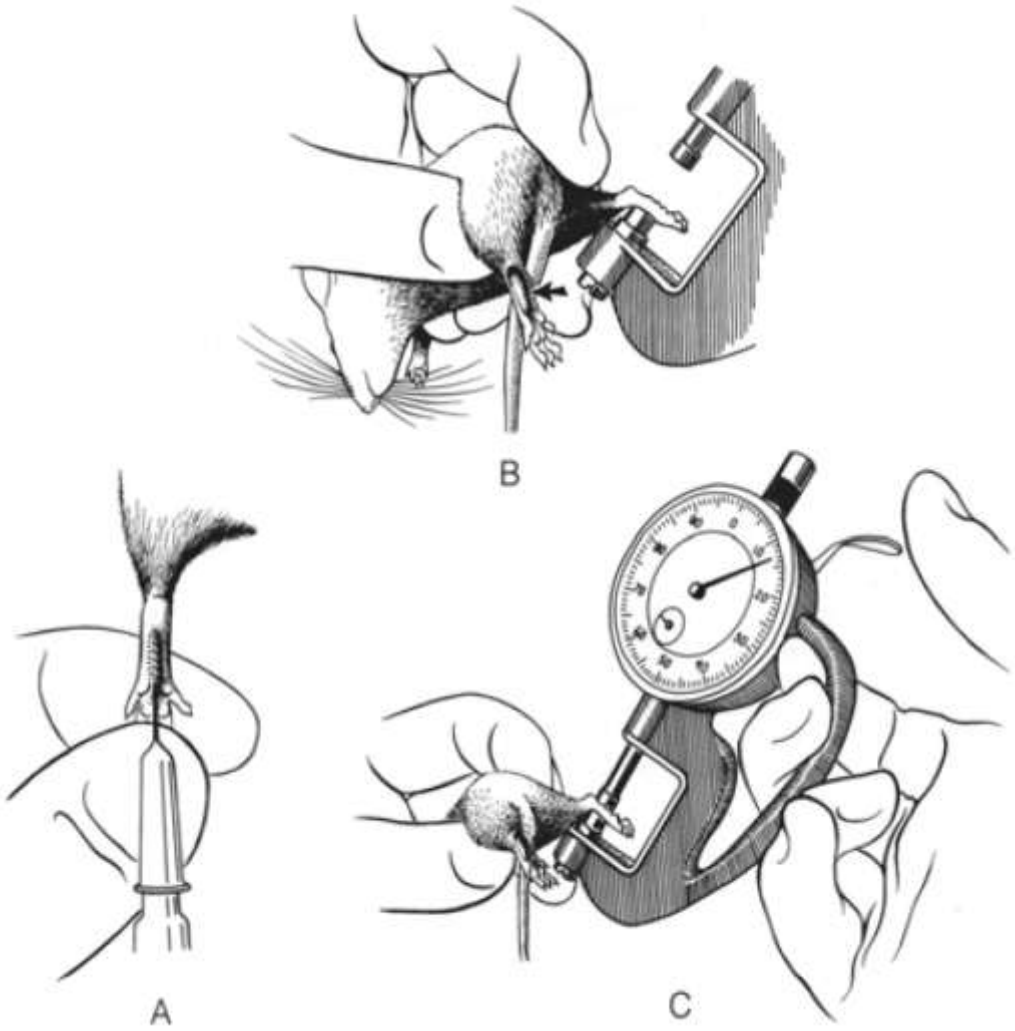
پاسخ ازدیاد حساسیت تاخیری (Delayed Type Hypersensitivity - DTH)



نکات

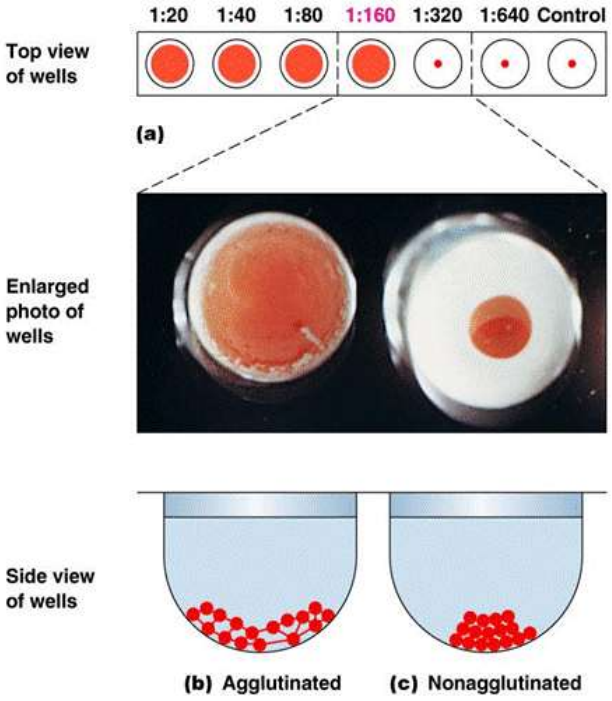
- **برای تزریق کف پا، سوزن درست بالای محل انگشتان و با زاویه حدود ۳۰ درجه تزریق می‌شود (A).**
- **اندازه‌گیری ضخامت کف پا باید بسیار دقیق و بدون فشار اضافی انجام شود و یک منطقه در هر دوپا اندازه گرفته شود(B).**
- **با استفاده از فرمول مقدار (یا درصد) افزایش ضخامت محاسبه شود.**

منابع:

1. Allen IC. Delayed-type hypersensitivity models in mice. Methods Mol Biol. 2013;1031:101-7
2. Coligan JE. Current Protocols in Immunology, Chapter 2. Online in Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com). 2010.
3. Coligan JE. Current Protocols in Immunology, Chapter 4. Online in Wiley Interscience (www.interscience.wiley.com). 2010.

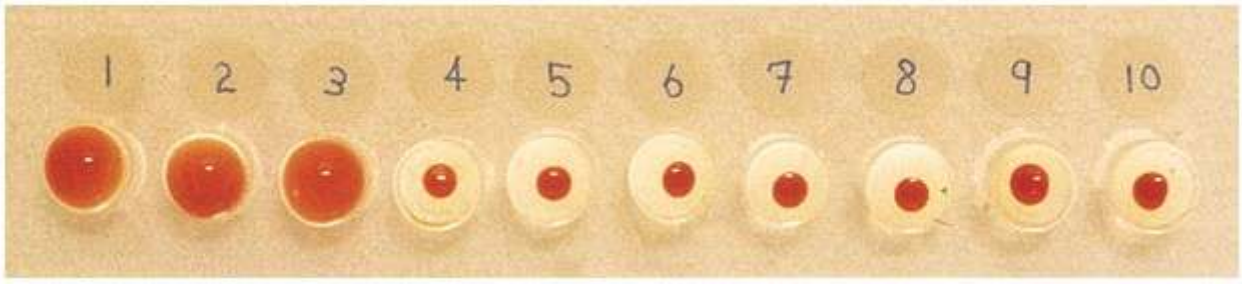
تعیین تیتر آنتی‌بادی سرم با هماگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز (آنتی‌ژن)

سرم موش ایمیونیزه شده برای بررسی میزان تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن (در اینجا گلبول قرمز گوسفند یا SRBC) بررسی می‌شود. آنتی‌بادی موجود در سرم می‌تواند موجب آگلوتینه شدن گلبول‌های قرمز شود (در اینجا هماگلوتیناسیون – Hemagglutination). این تست معمولا در پلیت‌های ۹۶ خانه که کف آنها U شکل است انجام می‌شود لذا در صورت وقوع آگلوتیناسیون، گلبول‌های قرمز در سطح آن پخش می‌شوند (تشکیل شبکه) و در صورت عدم وقوع آگلوتیناسیون در انتهای چاهک جمع می‌شوند. در شکل مقابل سمت چپ آگلوتیناسیون رخ داده و در سمت راست نه (نقطه یا دایره کوچک).



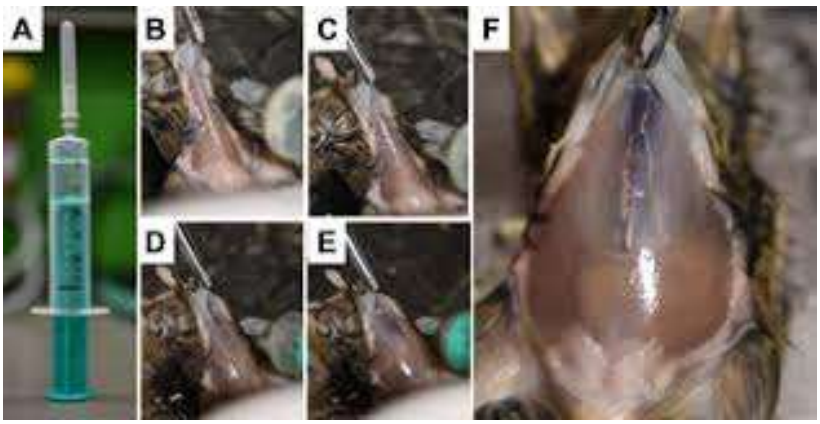
برای تخمین میزان آنتی بادی تولید شده باید تیتراسیون انجام شود، یعنی رقت‌های متوالی (سریال) از سرم تهیه شده و مشخص گردد تا کدام رقت هنوز آگلوتیناسیون دیده می‌شود.

برای تهیه رقت سریال از نسبت ۱:۲ سرم شروع کنید و یکی از چاهک‌ها را به عنوان کنترل انتخاب کنید (فقط گلبول قرمز گوسفند در آن ریخته شود- در شکل زیر چاهک شماره ۱۰) و در بقیه رقت سریال از سرم موش ایمیونیزه شده (حاوی آنتی SRBC) اضافه کنید.



جداسازی سلول‌های صفاقی و کشت ماکروفاژ

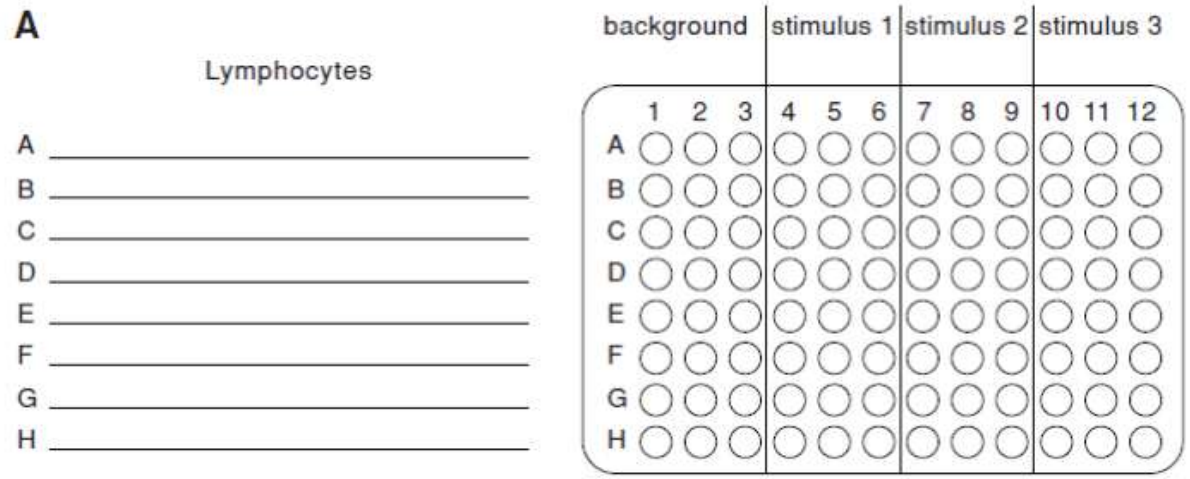
برای دسترسی به سلولهای صفاقی که بخش زیادی از آنها ماکروفاژهای صفاقی هستند بهتر است پوست ناحیه شکم به خوبی باز شود. سپس حدود ۵ میلی‌لیتر بافر یا نرمال سالین سرد (تا آخرین لحظه در یخچال یا روی یخ قرار داده شود ولی یخ نزند) به فضای صفاقی تزریق می‌شود و پس از مالش یا تکان مختصر مجدد به سرنگ مکش می‌شود. سپس شستشوی سلولها با سانتریفوژ انجام شده و بعد از دور ریختن بافر شستشو حدود یک میلی‌لیتر محیط کشت اضافه میگردد و شمارش و کشت انجام می‌شود.



نکات:

- برای دریافت تعداد بیشتر سلول این روش می‌تواند حداکثر دوبار انجام شود (یعنی ۱۰ میلی لیتر بافر طی دو مرحله).
- برای جدا شدن بهتر ماکروفاژها با کمک سرما، می‌توان از بسته‌های حاوی یخ استفاده کرد و کل مراحل را روی آن انجام داد.
- در برخی روشها از قبل تیوگلیکولات به صفاق تزریق می‌شود تا ماکروفاژهای بیشتر در فضای صفاق تجمع نمایند و تعداد سلولهای به دست آمده بالاتر باشد.
- مراقبت برای اینکه سوزن سرنگ به روده‌ها برخورد نکند و محتوای آنها به داخل صفاق نیاید ضروری است. در صورت این برخورد، نمونه برای کشت قابل استفاده نیست.
- در صورت وجود مقدار کمی گلبولهای قرمز امکان حذف آنها با بافر لیزکننده هست که در بخش جداسازی سلولهای طحال توضیح داده میشود.

کشت سلول‌ها معمولا در پلیت ۹۶ خانه مخصوص کشت انجام میشود و علامتگذاری‌ها لازم و همچنین داشتن برگه‌ای که نکات لازم در مورد هر چاهک در آن ثبت شده باشد ضروری است. این اطلاعات می‌تواند شامل کد حیوان (در صورت داشتن چند حیوان)، نوع سلول، نوع محرک (یا محرک‌های) اضافه شده، آنتی‌ژن (باکتری، اجزاء باکتری و ...) و سایر موارد ضروری باشد. مثال:



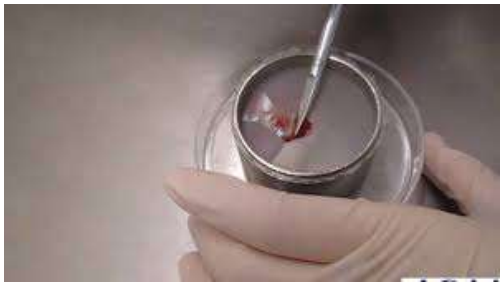
پس از شمارش و ریختن تعداد مناسب سلول به چاهک‌های پلیت می‌توان سلولهای غیرچسبنده را حذف نمود. به این ترتیب که پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه می‌شوند و سپس با کمک سمپلر یا پیپیت ، بافر شستشو یا محیط کشت ساده که قبلا گرم شده و دمای آن به ۳۷ درجه رسیده است به چاهکها اضافه میشود تا سلولهای غیرچسبنده حذف شوند. چاهکها با کمک میکرسکپ اینورت بررسی میشوند که شستشو به خوبی انجام شده باشد.

پس از اضافه کردن محرک (آنتی‌ژن) و در نظر گرفتن زمان مناسب، فعالیت‌های مختلف ماکروفاژ می‌تواند بررسی شود از جمله بررسی فعالیت حیاتی (تست MTT) و یا اینکه در محلول روئی مقدار متابولیتهای دارای خاصیت میکرب‌کشی مثل متابولیت‌های اکسیژن یا نیتریک اکساید، انزیمهای تولید شده و همچنین سایتوکاین‌ها (TNF و ...) یا مواد مختلف دیگر که ماکروفاژها قادر به تولید آن هستند سنجیده شود یا تستهای دیگری مثل بررسی تغییرات بیان پروتئین‌ها و ... مورد بررسی قرار گیرد.

تهیه سوسپانسیون سلولی از طحال و گره لنفی (موش)

بعد از جداسازی طحال (مرحله قبل) ، آن را در پتری دیش استریل قرار داده و در شرایط استریل (زیر هود مناسب و لوازم استریل)، با استفاده از سرنگ از یک سمت به داخل آن محیط مناسب تزریق می کنیم.

با کمک پنس به جدا شدن سلولها کمک میکنیم و نهایتا با قیچی سمت مقابل طحال را بریده سلولها در پتری دیش آزاد میشوند. عمل تزریق محیط به داخل بافت را تکرار میکنیم تا زمانی که یک پوسته شفاف از طحال باقی بماند. سپس با کمک سرنگ سلولها را از پتری دیش جمع آوری نموده به لوله منتقل و سانتریفوژ میکنیم.



- **روش دیگر قطعه قطعه کردن طحال و گذراندن سلولهای آن از یک توری استریل (mesh) است ولی در این روش میزان سلولهای مرده بیشتر خواهد بود (شکل).**

توزیع سلولی طحال تقریبا به این صورت است:

Table 8. Cellular composition of murine spleen

Total number of cells	0.5×10^8 to 2×10^8 per spleen
B cells	65% of lymphocytes
T cells	35% of lymphocytes
$CD4^+$ T cells	20% (65% of T cells)
$CD8^+$ T cells	15% (32% of T cells)
$CD4^-CD8^-$ T cells	0.5–2% of lymphocytes (3% of T cells)
Monocytes	10% of total cells
NK cells	5% of total cells

NK, natural killer.

حذف گلبول‌های قرمز از سوسپانسیون سلولی

استفاده از بافر لیز کننده گلبول‌های قرمز:

ACK lysing buffer
8.29 g NH_4Cl (0.15 M)
1 g $KHCO_3$ (10.0 mM)
0.037 g Na_2EDTA (0.1 mM)
Add 800 ml H_2O and adjust pH to 7.2-7.4 with 1 N HCl
Add H_2O to 1 liter
Filter sterilize through a 0.2-μm filter and store at room temperature.

اضافه کردن بافر به فشرده سلولی انتهای لوله و تکان دادن آرام به مدت ۲ دقیقه (بسته به شرایط کار ممکن است زمان تا ۵ دقیقه افزایش یابد) موجب لیز شدن گلبول‌های قرمز می‌شود. سپس اضافه کردن سرم و سانتریفوژ مجدد سلولها لازم است.

منابع:

1. Reeves JP, Reeves PA. Removal of lymphoid organs. Curr Protoc Immunol. 2001;Chapter 1:Unit 1.9.
2. Kruisbeek AM. Isolation of mouse mononuclear cells. Curr Protoc Immunol. 2001;Chapter 3:Unit 3.1.