



Effective Factors in Creating Immunization Against a Desired Antigen in the Culture Medium

Faezeh Kheiri Ardahaei¹, Fatemeh Yari¹

¹Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran



Received: 2024/11/03
Accepted: 2024/12/23

<http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.21.4.333>

Citation:

Kheiri Ardahaei F, Yari F. Effective Factors in Creating Immunization Against a Desired Antigen in the Culture Medium. J Iran Blood Transfus. 2024; 21 (4) : 330-341.

Correspondence: Yari F., Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine. P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052237
E-mail: f.yari@tmi.ac.ir

ABSTRACT

Background and Objectives

Antibodies are glycoprotein molecules that are widely used in diagnosis and treatment. One of their key applications being blood grouping tests. There are various methods for producing antibodies, with immunization being the Preliminary stage for all of them. One such approach is *in vitro* immunization, where immune cells are isolated from peripheral blood and stimulated in the culture medium using the desired antigen. Effective immunization *in vitro* is fundamented to modern research and vaccine development. This study focuses on the factors influencing the optimization of immunization to achieve immunized lymphocytes that produce antibodies in a culture medium.

Materials and Methods

For this review article, a comprehensive search was performed in the PubMed and Google Scholar databases using the keywords immunization, *in vitro* technique, and antibodies covering studies published from 1985 to 2023. A total of 50 articles were found based on these keywords, out of which 34 relevant studies were selected for inclusion in this review.

Results

Studies have showed that *in vitro* immunization offer severall advantages over *in vivo* immunization, the eliminating need for laboratory animals and avoiding the ethical challenges associated with their use. Additionally, it provides shorter immunization times, high reproducibility, and the ability to obtain antibody-producing clones from the IgM class. However, this approach is not applicable for producing antibodies against all antigens. Several factors influence the success of *in vitro* immunization, including the type and concentration of the antigen, the type and number of lymphocytes, the removal of immune-suppressing cells, adjuvants and cytokines, the physiological conditions of the culture environment, the duration of incubation, and the variability in immune responses among immune cell donors.

Conclusions

Antibody production can be achieved through *in vitro* immunization methods in the culture medium, offering distinct advantages over *in vivo* methods. Achieving effective antibody-producing cells in laboratory conditions requires careful attention of influencing factors.

Key words: Immunization, *In vitro* techniques, Antibodies



Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.



عوامل موثر در ایجاد ایمنی بر علیه یک آنتی ژن دلخواه در محیط کشت

فائزه خبری ارداهایی^۱، فاطمه یاری^۲

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران
۲- PhD ایمونولوژی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

چکیده

سابقه و هدف

آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌های گلیکوپروتئینی هستند که در تشخیص و درمان به طور گسترده‌ای استفاده می‌شوند. یکی از کاربردهای مهم این آنتی‌بادی‌ها، آزمایش‌های گروه‌بندی خونی است. روش‌های مختلفی برای تولید آنتی‌بادی‌ها وجود دارد که ایمنی‌زایی، مقدمه تمامی آن‌ها می‌باشد. یکی از روش‌های ایمنی‌زایی، ایمنی‌زایی در شرایط آزمایشگاهی و در محیط کشت است که در این روش سلول‌های ایمنی از سلول‌های خون محیطی جداسازی شده و در محیط کشت به وسیله آنتی‌ژن مورد نظر تحریک می‌شوند. ایمنی‌زایی مؤثر در شرایط آزمایشگاهی یک جزء اساسی از تحقیقات مدرن و طراحی واکسن است. در این مطالعه به بررسی روش ایمنی‌زایی در محیط آزمایشگاهی و عوامل مؤثر در بهینه‌سازی ایمنی‌زایی به منظور دستیابی به لنفوسیت‌های ایمن شده که توانایی تولید آنتی‌بادی در محیط کشت را دارند، پرداخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

برای انجام این مقاله مروری در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed و Google scholar با استفاده از کلمات کلیدی immunization, *in vitro* technique و antibodies از سال ۱۹۸۵ تا ۲۰۲۳ جستجو انجام شد. در مجموع، ۵۰ مقاله با این کلمات کلیدی یافت شد که ۳۴ مقاله مرتبط در این مطالعه استفاده شدند.

یافته‌ها

مطالعه‌ها نشان داد که ایمنی‌زایی *in vitro* مزیت‌هایی را نسبت به ایمنی‌زایی *in vivo* دارد که از جمله آن‌ها، عدم نیاز به حیوانات آزمایشگاهی و کاهش دشواری‌های اخلاقی کار با آن‌ها است. علاوه بر این، مدت زمان کوتاه‌تر ایمنی‌زایی، تکرارپذیری بالا و امکان دستیابی به کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی از کلاس IgM از دیگر مزایای روش ایمنی‌زایی در آزمایشگاه می‌باشد. از طرفی این روش برای تولید آنتی‌بادی علیه همه آنتی‌ژن‌ها کاربرد ندارد. عوامل زیادی در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی مؤثر می‌باشند که شامل نوع و غلظت آنتی‌ژن، تعداد لنفوسیت‌ها، حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی، ادجوانت‌ها و سیتوکاین‌ها، شرایط فیزیولوژیک محیط کشت، مدت زمان انکوباسیون و تفاوت پاسخ ایمنی اهداکنندگان مختلف می‌باشد.

نتیجه‌گیری

برای تولید آنتی‌بادی می‌توان از روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی در محیط کشت بهره برد که مزایایی نسبت به روش‌های *in vivo* دارد. برای دستیابی به سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی در شرایط آزمایشگاهی، باید به عوامل مؤثری که در ایجاد ایمنی‌زایی نقش دارند، توجه کرد.

کلمات کلیدی: ایمنی‌زایی، روش‌های درون آزمایشگاهی، آنتی‌بادی‌ها



تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۳

doi <http://dx.doi.org/10.61186/bloodj.21.4.333>

Citation:

Kheiri Ardahaei F, Yari F. Effective Factors in Creating Immunization Against a Desired Antigen in the Culture Medium. J Iran Blood Transfus. 2024; 21 (4) : 330-341.

نویسنده مسئول:

دکتر فاطمه یاری. مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

E-mail: f.yari@tmi.ac.ir

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌های گلیکوپروتئینی هستند که در بدن توسط پلاسماسل‌ها در پاسخ به آنتی‌ژن تولید می‌شوند. آنتی‌بادی‌های پلی‌کلونال و مونوکلونال در زمینه‌های مختلف هم‌چون تحقیقات، تشخیص و درمان کاربرد دارند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال گروهی از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی یکسان هستند که توسط کلون یکسان از سلول B بر علیه یک آنتی‌ژن خاص تولید می‌شوند و به اپی‌توپ‌های مشابه اتصال می‌یابند (۱). یکی از کاربردهای مهم آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، در بخش تشخیص می‌باشد و از جمله آن‌ها، تعیین نوع گروه خونی است. یکی از روش‌های استاندارد تعیین فوتیتپ گروه‌های خونی، روش‌های ایمونوهما‌تولوژیک مبتنی بر هماگلوتیناسیون می‌باشد (۲). امروزه به منظور تعیین گروه‌های خونی مختلف از آنتی‌بادی‌های اختصاصی در بانک خون استفاده می‌شود. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به لحاظ داشتن اختصاصیت بیشتر و وقوع واکنش‌های متقاطع کمتر، از مزیت بیشتری جهت استفاده در شناسایی و تعیین آنتی‌ژن‌های گلوبول قرمز برخوردار می‌باشند (۳). بنابراین برای رسیدن به این اهداف، دستیابی به کلون‌های سلولی تولید کننده آنتی‌بادی اختصاصی برای آنتی‌ژن مورد نظر با افینیتی بالا ضروری است. روش‌های مختلفی برای تولید آنتی‌بادی‌ها استفاده می‌شوند که در مرحله اول آن‌ها ایمنی‌زایی قرار می‌گیرد (۴، ۵، ۶).

ایمنی‌زایی مقدمه تولید آنتی‌بادی می‌باشد که به روش‌های مختلفی انجام می‌شود. یکی از این روش‌ها ایمنی‌زایی آزمایشگاهی (*in vitro immunization*) است که در این روش سلول‌های ایمنی در آزمایشگاه توسط آنتی‌ژن مورد نظر تحریک شده و از سلول‌های خون محیطی جداسازی می‌شوند و در نتیجه لنفوسیت‌های B تولیدکننده آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن القا می‌گردند. سپس می‌توان سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی را با سلول‌های میلوپوئیتیک فیوژ کرد تا سلول‌های هیبریدوما شکل بگیرد. طی این روند سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی نامیرا شده و به صورت مداوم آنتی‌بادی تولید می‌کنند. روش دیگر ایمونیزاسیون در حیوانات آزمایشگاهی (*in vivo immunization*) می‌باشد که نیاز به تزریق آنتی‌ژن به حیوان آزمایشگاهی دارد. لذا نیازمند طراحی یک حیوان خانه مجهز است. علاوه بر تهیه یک حیوان خانه، یکی از

مشکلات و دشواری‌های این روش رعایت اصول کار و ضوابط اخلاقی کار با حیوانات می‌باشد. روش تولید آنتی‌بادی مبتنی بر ایمنی‌زایی آزمایشگاهی برای تولید انواع زیادی از آنتی‌بادی‌ها از جمله آنتی‌بادی‌هایی که برای ایمنی‌زایی در *in vivo* دچار مشکل هستند، پتانسیل زیادی را نشان می‌دهد. عدم نیاز به تزریق آنتی‌ژن به حیوان و بی‌نیاز شدن به ایجاد حیوان خانه هم‌چنین حذف فرآیندهای پیچیده شامل انسانی کردن آنتی‌بادی‌ها (*humanize*) یا کایمریزاسیون از مزایای این روش می‌باشند (۶).

مواد و روش‌ها

در این مقاله مروری با استفاده از پژوهش‌های منتشر شده و پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed و Google scholar و با استفاده از کلمات کلیدی *in vitro technique*، *antibodies immunization*، مقالات از سال ۱۹۸۵ تا ۲۰۲۳ مورد ارزیابی قرار گرفته و یافته‌های مهم و اساسی آن به صورت جامع و کامل و به صورت یک مقاله مروری ارائه گردیده است.

یافته‌ها

ایمنی‌زایی آزمایشگاهی (*In vitro immunization*):

به فرآیند تحریک سلول‌های ایمنی خارج از بدن و در یک شرایط آزمایشگاهی کنترل شده، ایمنی‌زایی آزمایشگاهی گویند. چندین روش برای ایمونیزاسیون در محیط آزمایشگاهی برای تولید آنتی‌بادی وجود دارد، شامل:

- سل لاین‌های B نامیرا شده (immortalized B cell lines)
- تحریک سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (stimulation of peripheral blood mononuclear cell)
- تحریک سلول‌های B اولیه (stimulation of primary B cells)

در همه این روش‌ها از سلول‌های ایمنی تولیدکننده آنتی‌بادی جهت تحریک و فعال‌سازی در محیط کشت استفاده می‌شود. برای ایمنی‌زایی آزمایشگاهی می‌توان از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی استفاده کرد و یا می‌توان سلول‌های B را جداسازی نموده و برای تحریک در محیط کشت استفاده نمود و یا حتی می‌توان از سل لاین‌های سلول B نامیرا جهت ایمنی‌زایی استفاده کرد.

با افزایش تعداد سلول‌های تولیدکننده این آنتی‌بادی‌ها افزایش می‌دهد. این روش باعث فعال‌شدن فعال‌کننده‌های سلول B و سلول‌های کمکی $CD4^+$ تولیدکننده سیتوکین می‌شود و با تقلید از فرآیندهای ایمنی حیاتی که به طور طبیعی رخ می‌دهند، تغییر کلاس آنتی‌بادی را تحریک می‌کند. این رویکرد احتمال دستیابی به آنتی‌بادی‌های مورد نظر در برابر آنتی‌ژن‌های چالش برانگیز را بهبود می‌بخشد و به طور بالقوه می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انسانی با کارایی افزایش یافته سازگار شود. محرک‌های ایمنی نقش مهمی در افزایش ایمن‌سازی آزمایشگاهی با ترویج فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های ایمنی دارند. در روش توصیف شده، از CpG-ODN (Oligodeoxynucleotides) CPG) به عنوان یک محرک ایمنی در طول تحریک اولیه آنتی‌ژن برای فعال کردن مؤثر سلول‌های B به ویژه آن‌هایی که آنتی‌بادی تولید می‌کنند استفاده می‌شود. این تحریک مجموعه‌ای از رویدادها را به وجود می‌آورد که منجر به افزایش تولید سلول‌های تولیدکننده IgG اختصاصی آنتی‌ژن می‌شود. علاوه بر این، سیتوکاین‌های موجود در مرحله گسترش سلولی به طور مستقیم سلول‌های T و B را تحریک می‌کنند که منجر به تکثیر سلولی و افزایش تراکم سلولی شده و تعامل بین سلول‌های ایمنی را تقویت می‌کنند. این فعل و انفعالات برای تولید تعداد بیشتری از سلول‌های پلاسمایی تولیدکننده IgG اختصاصی آنتی‌ژن در پایان کشت ضروری هستند (۱۰).

عوامل مؤثر در ایجاد ایمنی‌زایی آزمایشگاهی:

حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی:

محققان دریافته‌اند که وقتی لنفوسیت‌های خون محیطی در حضور سایر زیر جمعیت‌های سلول‌های T تحریک شوند، به طور خاص به آنتی‌ژن پاسخ نمی‌دهند. با حذف زیر جمعیت‌های خاص سلولی حاوی لیزوزوم از لنفوسیت‌های خون محیطی، سلول‌های باقی‌مانده پاسخ‌های خاص آنتی‌ژن را در طول ایمنی‌زایی آزمایشگاهی نشان می‌دهند. عوامل لیزوزوموتروپیک به ترکیباتی اطلاق می‌شود که می‌توانند وارد لیزوزوم‌ها شوند. استرهای اسید آمینه L، نوعی عوامل لیزوزوموتروپیک هستند که می‌توانند

استفاده از سل‌لاین‌های نامیرای سلول B، تنوع مرتبط با سلول‌های اولیه را حذف می‌کند و تأمین پایدار و ثابت آنتی‌بادی‌ها را تضمین می‌نماید (۷).

روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی به طور معمول مدت کوتاهی (حدود ۵ روز) در مقایسه با چندین هفته فرآیند ایمنی‌زایی در موش زمان می‌برد. این روش به مقادیر کمتری آنتی‌ژن برای ایمنی‌زایی نیاز دارد. روش ایمنی‌زایی *in vitro* در مقایسه با ایمنی‌زایی *in vivo* تکرارپذیری بالاتری دارد و هم‌چنین دستیابی به آنتی‌بادی از کلاس IgM به واسطه ایمنی‌زایی آزمایشگاهی آسان‌تر می‌باشد. اما از طرفی روش ایمنی‌زایی *in vitro* برای تولید آنتی‌بادی علیه تمامی آنتی‌ژن‌ها قابل استفاده نمی‌باشد و غالباً برای آنتی‌ژن‌هایی کاربرد دارد که قبلاً در فرد ایجاد ایمنی‌زایی کرده و لنفوسیت‌های B او در پاسخ به آن آنتی‌ژن تحریک شده باشد (۸، ۹).

ایمنی‌زایی آزمایشگاهی با توجه به همه مزیت‌هایی که نسبت به ایمنی‌زایی‌های سنتی دارد دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که منجر به چالش‌هایی در به دست آوردن تعداد کافی سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی با میل ترکیبی (affinity) بالا می‌شود. روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی تولید آنتی‌بادی با میل ترکیبی پایین و تولید آنتی‌بادی بیشتر از کلاس IgM را به دنبال دارد. لذا یک دستورالعمل ایمنی‌زایی پیشرفته با استفاده از سلول‌های ایمنی طحال موش صورت گرفت که شامل یک دستورالعمل تحریک سه مرحله‌ای می‌باشد. روش تحریک سه مرحله‌ای ذکر شده در این قسمت شامل چرخه‌های متعدد تحریک مکرر آنتی‌ژن و به دنبال آن گسترش سلولی است. این فرآیند فرکانس سلول‌های پلاسماسل را افزایش می‌دهد که آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی آنتی‌ژن تولید کنند. این مراحل احتمالاً شامل قرار گرفتن در معرض آنتی‌ژن اولیه، دوره‌های بعدی تحریک مجدد برای افزایش تولید آنتی‌بادی و عوامل اضافی برای حمایت از فعال‌سازی سلول B و تعویض کلاس برای تولید بهینه IgG است. روش تحریک ۳ مرحله‌ای توصیف شده، تولید آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی آنتی‌ژن را

تک هسته‌ای از خون کامل می‌باشد و جهت حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی به مدت حدوداً ۴۰ دقیقه سلول‌ها با این ماده انکوبه می‌شوند (شکل ۱) (۱۲).

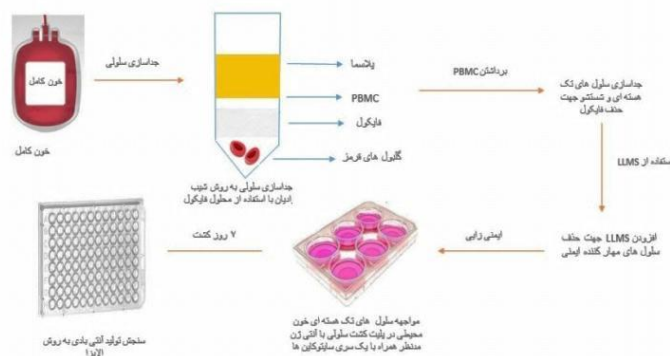
مجاور کردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با ماده LLME منجر به حذف کامل سلول‌های مهار کننده ایمنی می‌گردد. بعد استفاده از LLME، درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای Lue7 و Lue11 (مارکر اختصاصی بیان‌کننده سلول‌های کشنده طبیعی) و مارکر سطحی Mo2 (مارکر اختصاصی مونوسیت) به ترتیب به ۰/۱٪، ۰/۲٪ و ۰/۵٪ کاهش می‌یابد (۹).

داده‌های حاصل از بررسی تأثیر LLME بر ایمنی‌زایی آزمایشگاهی و تعیین غلظت مناسب این ماده در تولید آنتی‌بادی با روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی نشان داد که استفاده نکردن از این ماده به دلیل عدم حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی باعث کاهش ایمنی‌زایی و جذب نوری شده است. نتایج هم‌چنین نشان داد که استفاده از غلظت‌های بسیار بالای LLME، باعث ایجاد سمیت و از بین بردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌شود (۱۳).

سلول‌های T مهاری $OKT8^+$ می‌توانند پاسخ ایمنی را مهار کنند، لذا با حذف این سلول‌ها در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی، تولید آنتی‌بادی قوی‌تر می‌شود. برای حذف این سلول‌ها، آن‌ها را به سوسپانسیون سلولی آنتی $OKT8^+$ افزوده و بعد کمپلمان خرگوش اضافه گردید، که در نهایت لیز سلول‌های $OKT8^+$ را به همراه داشت (۱۴).

آزادانه به لیزوزوم‌ها در انواع متفاوت از سلول‌ها هم‌چون مونوسیت‌ها، ماکروفاژهای بافتی و سلول‌های در گردش وارد شوند. در داخل لیزوزوم‌ها، L آمینو اسید سریعاً به اسید آمینه آزاد متابولیزه می‌شود. این اسید آمینه آزاد قطبی است لذا انتشار آن به خارج از لیزوزوم دشوار است. تجمع اسید آمینه آزاد در لیزوزوم در نهایت سبب تورم و پارگی این اندامک می‌شود. ال‌لوسین متیل‌استر (LLME) یک عامل لیزوزوموتروپیک است که با حذف سلول‌های حاوی لیزوزوم، سبب افزایش پاسخ ایمنی در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی می‌شود. LLME سلول‌های جانبی تنظیمی برای تکثیر سلول‌های B و T را حذف می‌کند و فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK Cell) را به طور غیر قابل برگشت در سلول‌های خون محیطی مختل می‌کند. LLME باعث ایجاد سمیت سلولی برگشت‌پذیر در سلول‌های غنی از لیزوزوم با تولید اسید آمینه آزاد می‌شود و سلول‌های سیتوتوتیک مانند سلول کشنده طبیعی (NK) و T سیتوتوکسیک (TC) را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل ۱).

لذا تیمار لنفوسیت‌های خون محیطی با LLME می‌تواند آنان را برای تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه یک آنتی‌ژن خاص تحریک کند (۱۱). سلول‌های T سیتوتوکسیک (TC) و زیرگروه‌های سلول‌های $TCD8^+$ بر روی سلول‌های B ترشح‌کننده آنتی‌بادی تحریک شده با میتوز اختصاصی، اثر مهاری دارند. استفاده از ماده ال‌لوسین متیل‌استر سبب حذف این سلول‌های مهار کننده ایمنی بدون هیچ اثر منفی بر روی سلول‌های B و سلول‌های T کمکی (Th) می‌شود. زمان استفاده از ماده LLME بعد از جداسازی سلول‌های



شکل ۱: جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و تیمار با ماده LLME جهت حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی

۲) استفاده از ادجوانت:

ادجوانت‌ها مولکول‌ها و ترکیباتی هستند که قدرت و طول عمر پاسخ ایمنی خاص به آنتی‌ژن‌ها را افزایش می‌دهند. ادجوانت‌ها عمدتاً از پاتوژن‌ها مشتق می‌شوند و اغلب بیان‌کننده الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن‌ها می‌باشند. انواع آن‌ها شامل موادی مانند پلی‌ساکارید باکتریایی CPG ODN و مورامیل دی‌پپتید (MDP) هستند. استفاده از ادجوانت‌ها در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی سبب افزایش تحریک ایمنی لنفوسیت‌های B به آنتی‌ژن می‌شود (۱۵).

در شرایط فیزیولوژیک، سلول‌های B بکر یا B پاسخ ایمونولوژیک ضعیفی دارند. در حالی که وجود ادجوانت CPG ODN، مارکرهای CD40، CD8 و HLA-DR بر سطح سلول‌های B Native را افزایش می‌دهد که متعاقباً باعث فعال‌سازی هر چه بیشتر سلول‌های T می‌شود. این اثر در نهایت منجر به پاسخ ایمنی به مراتب قوی‌تری خواهد شد (۱۶).

در مطالعه ماتسودا و همکاران ابتدا از MDP به عنوان ادجوانت استفاده شد و نتایج نشان داد که MDP منجر به تکثیر غیر اختصاصی سلول‌های B برای تولید آنتی‌بادی می‌شود. در ادامه از CPG ODN استفاده شد که منجر به تکثیر اختصاصی سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی اختصاصی گردید (۱۷).

در ایجاد ایمنی‌زایی علیه آنتی‌ژن Kell به منظور فعال‌سازی قوی‌تر و مؤثرتر سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی، استفاده از ادجوانت CPG ODN مثرتر واقع شد. نتایج مطالعه نشان داد که با ایجاد شرایط کشت یکسان در چاهک‌هایی که از CPG ODN به عنوان ادجوانت استفاده شده است نسبت به چاهک‌هایی که فاقد CPG ODN بودند، جذب نوری بالاتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر دیده شد که به معنی تولید بیشتر آنتی‌بادی اختصاصی در این چاهک‌ها می‌باشد (۱۳).

۳) استفاده از سیتوکاین‌ها:

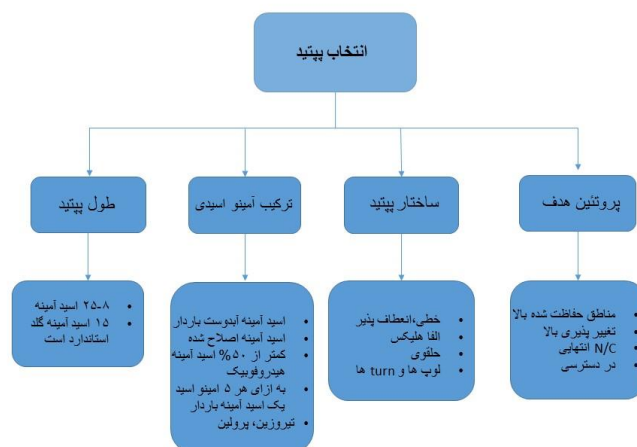
در ایمنی‌زایی *in vitro* جهت ایجاد ایمنی‌زایی، در ابتدا لنفوسیت‌ها به روش ساترفیوژ با شیب گرایان از کیسه‌های خون کامل جدا می‌گردند. این لنفوسیت‌ها، لنفوسیت‌های بکری (native) هستند که تاکنون با آنتی‌ژن

برخورد نداشته‌اند. جهت تحریک و فعال‌سازی لنفوسیت‌های بکر نیاز به دو سیگنال می‌باشد. سیگنال اول توسط آنتی‌ژن و رسپتور سلول B (BCR) القا می‌شود و سیگنال دوم نیز توسط مواد کمک تحریکی (co-factor) القا می‌گردد. پیشرفت سلول‌های B در حال استراحت به سمت تبدیل شدن به پلاسما سل تولیدکننده آنتی‌بادی توسط سیتوکاین‌ها تنظیم می‌شود. حضور این سیتوکاین‌ها نقش مهمی در هدایت سلول B در چرخه سلولی به سمت تولید آنتی‌بادی ایفا می‌کند (۱۸). اینترلوکین ۲ (IL-2) و اینترفرون گاما (INF- γ) نقش مؤثری در تحریک تکثیر لنفوسیت‌های B و القای تولید آنتی‌بادی به عنوان سیگنال دوم فعال‌سازی لنفوسیت‌های B دارند. بدین ترتیب می‌توان از این سیتوکاین‌ها جهت بهبود ایمنی‌زایی آزمایشگاهی بهره برد (۲۰، ۱۹). جهت بهبود ایمنی‌زایی لنفوسیت‌های بکر، آنتی‌ژن و مواد کمک تحریکی نقش به سزایی ایفا می‌کنند. از جمله مهم‌ترین مواد کمک تحریکی می‌توان به سیتوکاین‌هایی هم‌چون، اینترلوکین ۴ (IL-4) و اینترفرون گاما (INF- γ) اشاره کرد. این دو سیتوکاین می‌توانند در بهبود ایمونیزاسیون آزمایشگاهی مؤثر باشند (۲۱). افزودن اینترلوکین ۴ (IL4) به محیط کشت موجب افزایش ایمنی‌زایی بر علیه آنتی‌ژن Kell در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی بر علیه آنتی‌ژن Kell می‌شود (۱۳).

کشت لنفوسیتی مخلوط (MLC)، روشی است که جهت مطالعه میانکنش‌های سلول - سلول بین زیر گروه‌های لنفوسیتی و تولید ترکیبات ناشی از این میانکنش‌ها به کار می‌رود (۲۲). تکثیر لنفوسیت‌ها در محیط MLC به علت ترشح سیتوکاین‌ها در این محیط افزایش می‌یابد. سیتوکاین‌ها با افزایش تکثیر لنفوسیت B به نامیراسازی سلول‌های B کمک می‌کنند. سیکلوسپورین A به عنوان مهارکننده سیستم ایمنی به کار می‌رود. ولی در مطالعه‌ای حضور سیکلوسپورین موجب افزایش تکثیر و زنده ماندن لنفوسیت‌های خون محیطی گردید. از دلایل آن می‌توان به تداخل سیکلوسپورین با لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک (TC) اشاره کرد که طی فرآیند آلوایمونیزاسیون و تحریک لنفوسیت‌های ضد آنتی‌ژن بیگانه ایجاد می‌گردند. در نهایت این امر منجر به فعال‌سازی و تکثیر سلول‌های T کمکی (T helper) که در نهایت تکثیر لنفوسیت‌های B و تمایز آنان به پلاسما سل را به همراه دارد، می‌شود. یک دلیل دیگر

هم می تواند اثر مهارکنندگی سیکلوسپورین بر روی فرآیند آپوپتوز باشد که منجر به افزایش تکثیر لنفوسیتی می شود (۲۳). اینترلوکین ۴ که به عنوان فاکتور رشد سلول B (BCGF) شناخته می شود، نقش مهمی در فعال سازی سلول های B در مراحل اولیه پاسخ ایمنی ایفا می کند. IL-4 کمک می کند تا سلول های B آماده پاسخ به IL-2 و سایر اینترلوکین ها شوند. این سیتوکاین برای فعال سازی اولیه سلول B ضروری است و آنان را برای پاسخ های ایمنی بیشتر آماده می کند. اینترلوکین ۲ یک فاکتور رشد سلول T می باشد که برای گسترش مجموعه سلول های T کمکی که به آنتی ژن ها پاسخ می دهند حیاتی است. بر اساس نتایج به دست آمده، ترکیب IL-4 و IL-2 نقش به سزایی برای ایمنی زایی آزمایشگاهی علیه آنتی ژن های محلول دارد. این ترکیب در تقویت رشد و تمایز سلول های B مؤثر است. هیچ مشاهده ای یافت نشده است که افزودن IL-6 برای پاسخ ایمنی اولیه به آنتی ژن های محلول ضروری باشد (۲۴). اینترلوکین ۱۰ (IL-10) یا عامل مهار تولید سیتوکاین انسانی (Cy tokine synthesis in hibitory factor : CSIF) توسط انواع مختلفی از سلول ها تولید می شود و به عنوان یک سرکوب کننده کلی تکثیر سلول های ایمنی و پاسخ های سیتوکینی عمل می کند. در ایمنی زایی آزمایشگاهی حضور IL-10 قبل از ایمن سازی با آنتی ژن باعث مهار تولید آنتی بادی توسط سلول های خون محیطی می شود. با تجزیه و تحلیل الگوهای بیان ژن های مختلف سیتوکاینی، نشان داده شد که بیان IL-10 قبل از قرار گرفتن سلول ها در معرض آنتی ژن می تواند با سرکوب تولید آنتی بادی بر

پاسخ ایمنی تاثیر بگذارد. در صورتی که این اینترلوکین در صورت اضافه شدن به سلول های تک هسته ای ایمن شده با آنتی ژن می تواند موجب افزایش تکثیر و بقای لنفوسیت های B و تولید آنتی بادی نیز شود. زمانی که IL-10 به عنوان سیتوکاین در طول ایمن سازی آزمایشگاهی به سلول های تک هسته ای خون محیطی تیمار شده با LLME اضافه می شود، تولید آنتی بادی را به طور چشمگیری تقویت می کند. نتایج نشان داد که بیان ژن IL-10 همراه با تولید آنتی بادی افزایش یافته است. هنگامی که IL-10 در محیط آزمایشگاه، به سلول های ایمنی مواجه شده با آنتی ژن اضافه می شود، پاسخ ایمنی را به سمت Th2، هدایت می کند. در واقع IL-10 بر الگوهای بیان سیتوکاینی در سلول های B و T تاثیر می گذارد و با کاهش سیتوکاین های نوع Th1 و تنظیم مثبت سیتوکاین های Th2 پاسخ ایمنی را به سمت تولید آنتی بادی تقویت می کند. با تجزیه و تحلیل بیان آنتی ژن سطحی خاص بر سطح سلول های B با استفاده از روش های فلوسیتومتری، مشاهده شد که IL-10 با افزایش بیان مارکر CD38 در تمایز و بلوغ سلول های B به پلاسما سل های تولیدکننده آنتی بادی نیز نقش دارد. در مقابل در صورتی که IL-10 به سلول های ایمنی قبل از ایمنی زایی با آنتی ژن اضافه شود، تولید آنتی بادی را با مکانیسم های مستقیم و غیر مستقیم سرکوب می کند. IL-10 مستقیماً از تکثیر سلول های T و تولید سیتوکاین جلوگیری می کند در حالی که به طور غیر مستقیم بر بلوغ سلول های دندریتیک تاثیر می گذارد و آنان را به سلول های ارائه دهنده آنتی ژنی تلوروژنیک (Tolerogenic) تبدیل می کند.



شکل ۲: فاکتورهای مؤثر برای انتخاب پپتید سنتتیک به عنوان ایمونوژن. طول پپتید و ساختار آن در انتخاب آن برای ایمنی زایی

مهم می باشد (۳).

برای ایمنی‌زایی هم می‌توان از آنتی‌ژن پروتئینی کامل و هم از توالی پپتیدی خاصی از پروتئین (native) استفاده کرد. ساختار بزرگتر و پیچیده‌تر پروتئین کامل سبب ایجاد پاسخ قوی‌تری نسبت به پپتیدها می‌شود. اما پپتیدها از آن جایی که توانایی هدف قرار دادن نواحی خاصی از پروتئین هدف را دارند و از طرفی نیاز به آنتی‌ژن‌های مشتق شده از حیوان و انسان را از بین می‌برند، نسبت به آنتی‌ژن پروتئینی کامل، مزیت دارند. اما با همه این مزایا پپتیدها برای ایمونیزاسیون نیاز به کونژوگه شدن با پروتئین بزرگتری به نام حامل (carrier) را دارند.

هم‌چنین در ایمنی‌زایی با آنتی‌ژن پروتئینی کامل تولید آنتی‌بادی از کلون‌های مختلفی را به همراه دارد ولی در استفاده از پپتیدهای سنتتیک، اپی‌توپ‌ها محدود می‌باشند لذا کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی نیز محدود بوده و نیازمند انتخاب بهترین کلون تولیدکننده آنتی‌بادی نمی‌باشد. به همین جهات استفاده از پپتیدهای سنتتیک جهت ایمنی‌زایی در مطالعه‌های اخیر گسترش یافته است (۳۰). در استفاده از پپتید سنتتیک به منظور ایمنی‌زایی جهت تولید آنتی‌بادی، باید یک سری ویژگی‌ها و فاکتورهایی را مد نظر گرفت که در شکل به آنان اشاره شده است (شکل ۲).

در مطالعه مبارک و همکاران از پروتئین Tat (transcriptual transactivator) از ویروس نقص ایمنی انسانی (HIV) در القای پاسخ ایمنی به روش آزمایشگاهی استفاده شد. هنگامی که Tat به شکل آزاد استفاده شد، هیچ اثر قابل توجهی در تحریک ترشح آنتی‌بادی در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان نشان داده نشد. این مطالعه نشان داد که پروتئین Tat به تنهایی برای تحریک پاسخ ایمنی کافی نیست. هنگامی که Tat با یک domain به نام ZZ مشتق شده از پروتئین A استافیلوکوکوس اورئوس فیوژ شد، افزایش قابل توجهی در تولید آنتی‌بادی‌های IgM مشاهده شد. این مطالعه نشان‌دهنده این است که بعضی پروتئین‌ها به تنهایی قادر به ایجاد پاسخ ایمنی نیستند و زمانی که با یک پروتئین دیگری به نام حامل کونژوگه می‌شوند، پاسخ ایمنی را ایجاد می‌کنند (۳۱).

از طرفی، غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن بر تولید آنتی‌بادی‌های خاص در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد. معمولاً غلظت‌های پائین آنتی‌ژن (۱-۱۰ ng/mL)

به علاوه ترشح IL-10 و TGF-B از سلول‌های دندریتیک موجب فعال‌سازی سلول‌های T تنظیمی و در نهایت سرکوب پاسخ ایمنی می‌گردد. با درک نقش IL-10 در پاسخ ایمنی و تأثیر آن بر سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژن (APC) مانند سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژها، دستورالعمل ایمن‌سازی آزمایشگاهی می‌تواند برای تولید آنتی‌بادی‌های خاص انسانی بهینه شود (۲۶، ۲۵). اهمیت فاکتورهایی مانند سلول‌های T کمکی محدود شده با MHC، فاکتورهای تمایز سلول B و سیتوکاین‌هایی مانند IL-2 در افزایش پاسخ ایمنی به آنتی‌ژن در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی نشان داده شده است (۲۷).

مقایسه‌ای بین مونوکلونال آنتی‌بادی‌های تولید شده از طریق ایمنی‌زایی *in vitro* و *in vivo* انجام گرفته است که نتایج نشان داده ایمنی‌زایی *in vitro* به طیف وسیع‌تری از ایزوتیپ‌های آنتی‌بادی در مقایسه با ایمنی‌زایی *in vivo* منجر می‌شود که احتمالاً به دلیل وجود لنفوکاین‌های مشتق شده از سلول T در طول فرآیند ایمنی‌زایی آزمایشگاهی است (۹).

۴) نوع و غلظت آنتی‌ژن:

علاوه بر مواد کمک محرک، خود آنتی‌ژن نیز در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی دخیل است. از جمله مهم‌ترین پارامترهای مرتبط با آنتی‌ژن که در بهبود ایمونیزاسیون آزمایشگاهی دخیل می‌باشد می‌توان به غلظت و اشکال آنتی‌ژن اشاره کرد. افزایش غلظت آنتی‌ژن از آن جایی که با افزایش سیگنال اول فعال‌سازی لنفوسیت‌ها همراه است، موجب بهبود ایمونیزاسیون می‌گردد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که با افزایش غلظت آنتی‌ژن، تولید آنتی‌بادی افزایش می‌یابد (۲۸، ۲۹).

آنتی‌ژن‌ها موادی هستند که می‌توانند پاسخ ایمنی را القا کنند. آنتی‌ژن‌هایی که برای ایمنی‌زایی به جهت تولید آنتی‌بادی استفاده می‌شوند، آنتی‌ژن‌های وابسته به T می‌باشند. یعنی آنتی‌ژن‌هایی که برای تحریک سلول B و تولید آنتی‌بادی نیاز به سلول‌های T کمکی (T helper) و تعامل آن با سلول‌های B دارند. آنتی‌ژن‌هایی با جنس پروتئینی تنها آنتی‌ژن‌هایی هستند که وابسته به سلول‌های T helper می‌باشند لذا بهترین آنتی‌ژن جهت ایمنی‌زایی به منظور تولید آنتی‌بادی، آنتی‌ژن‌های پروتئینی هستند (۱۱).

برای تحریک تولید آنتی بادی خاص بهینه است (۱۴).

۵) نوع و غلظت لئوسیت:

لئوسیت‌های B گروهی از گلبول‌های سفید (WBC) می‌باشند، که نقش مهمی در پاسخ ایمنی و تولید آنتی بادی ایفا می‌کنند. ایمنی‌زایی آزمایشگاهی (in vitro immunization) به فرآیند تحریک سیستم ایمنی در خارج از بدن و در یک محیط آزمایشگاهی کنترل شده می‌گویند یعنی زمانی که لئوسیت‌های B در یک محیط کشت با آنتی ژن مواجه شده و به دنبال آن فعال می‌شوند و تولید آنتی بادی اختصاصی علیه آنتی ژن می‌نمایند. بدین منظور می‌توان لئوسیت‌ها را از کیسه خون اهداکنندگان سالم، با استفاده از معرف فایکول (نوعی محیط گرادیان چگالی) سانتریفیوژ جداسازی کرد. به جای لئوسیت‌های خون محیطی از لئوسیت‌های لوزه‌ها که بخشی از سیستم لئوای می‌باشند و حاوی غلظت بالایی از سلول‌های ایمنی هستند نیز می‌توان استفاده کرد. لئوسیت‌های لوزه در برابر سمیت سلولی ناشی از سرم مورد استفاده در محیط کشت انعطاف پذیرتر هستند (۱۴).

استفاده از لئوسیت‌های خون محیطی انسان در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی به دلیل در دسترس بودن و اثربخشی بیشتر در تولید آنتی بادی به لئوسیت‌های لوزه و سلول‌های مغز استخوان ترجیح داده می‌شود (۲۷).

غلظت بهینه سلول جهت کشت نیز در ایمنی‌زایی مؤثر می‌باشد. هنگامی که لئوسیت‌ها در غلظت سلولی کمتر از 1×10^6 کشت داده شدند، سطح آنتی بادی‌های خاص تولید شده در مقایسه با غلظت بهینه 2×10^6 به طور قابل توجهی کمتر بود و در آزمایش‌هایی که از غلظت سلولی بالاتر از 4×10^6 استفاده شده است، سطح تولید آنتی بادی کمتر از آزمایش با میزان سلول 2×10^6 بود که این نشان‌دهنده اهمیت غلظت لئوسیت‌ها در محیط کشت می‌باشد (۱۴). مطالعه‌های دیگری نیز اهمیت تعداد سلول‌های لئوسیت موجود در کشت، ایمنی‌زایی و تولید آنتی بادی را اثبات کرده‌اند (۳۲).

۶) شرایط فیزیولوژیک محیط کشت:

جهت ایمنی‌زاییون آزمایشگاهی، سلول‌های لئوسیت

کف پلیت‌های کشت به صورت یکنواخت توزیع می‌گردند. جهت تأمین مواد مغذی که رشد یکنواخت سلول‌ها را به همراه داشته باشد، باید محیط کشت مناسب همراه با سرم مانند سرم جنین گاوی (FBS) و یا سرم گوساله گاوی (FCS) استفاده کرد. وجود سرم در محیط کشت برای تأمین مواد مغذی لازم، فاکتورهای رشد و حمایت از لئوسیت‌ها برای تکثیر و تمایز به سلول‌های ترشح‌کننده آنتی بادی ضروری است.

نتایج مطالعه لاگاک و همکاران، نشان داده است که لئوسیت‌های خون محیطی نسبت به وجود سرم جنین گاوی در محیط کشت حساس می‌باشند. هنگامی که لئوسیت‌ها در محیط بدون سرم و یا غلظت پائین سرم کشت داده شدند، تولید آنتی بادی اختصاصی مشاهده نشد که نشان‌دهنده لزوم وجود اجزای سرم برای ایمنی‌سازی in vitro می‌باشد. علاوه بر این‌ها، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در محیط کشت مانند جنتامایسین جهت جلوگیری از رشد باکتری و ال-گلوتامین به عنوان اسید آمینه برای حمایت از زنده ماندن سلول و رشد سلولی در محیط کشت پیشنهاد می‌شود (۱۴). محیط کشت شامل ERDF (Enhanced RDF) و یا RPMI، ۱۰٪ سرم جنین گاوی، مواد مغذی و فاکتورهای رشد ضروری برای رشد سلول‌ها جهت ایمنی‌زایی در محیط کشت پیشنهاد شده است (۲۳).

۷) مدت زمان انکوباسیون:

تولید آنتی بادی در یک دوره ۱۱ روزه زیر نظر گرفته شد، تا چارچوب زمانی بهینه برای حداکثر ترشح آنتی بادی تعیین شود. داده‌های ارائه شده نشان داد که سطح آنتی بادی اختصاصی تولید شده پس از ۷ روز انکوباسیون به اوج خود می‌رسد و در روز پنجم هنوز سطح آنتی بادی پائین است. در روز نهم نیز هم زنده ماندنی (viability) و هم سنتز آنتی بادی کاهش می‌یابد. ۷ روز انکوباسیون جهت ایمنی‌زایی لئوسیت‌ها مناسب می‌باشد (۳۳).

۸) تفاوت پاسخ ایمنی اهداکنندگان:

محققان مشاهده کردند که لئوسیت‌های خون محیطی اهداکنندگان مختلف شرایط بهینه متفاوتی جهت ایمنی‌زایی به منظور تولید آنتی بادی نشان می‌دهند. تفاوت نیازهای بهینه شرایط ایمنی‌سازی برای هر فرد نشان‌دهنده پاسخ‌های

جدول ۱: تفاوت پاسخ ایمنی در اهداکنندگان سالم و دارای آلرژی (۳۴)

شماره	سن	جنس	سطح سرمی آنتی بادی		
			IgE (mg/mL ⁻¹)	IgG (mg/mL ⁻¹)	IgM (mg/mL ⁻¹)
۱	۲۳	مرد	ND	ND	ND*
۲	۲۳	مرد	۰/۲۴	۴/۶۱	۰/۵۵
۳	۲۴	زن	ND	ND	ND
۴	۳۱	مرد	۰/۵۲	۶/۱۹	۰/۵۹
۵	۲۳	زن	۳/۶۶	۳/۲۸	۱/۳۴
۶	۲۴	زن	ND	ND	ND
۷	۲۸	زن	۰/۲۶	۴/۵۰	۱/۴۴
۸	۲۶	مرد	۰/۳۶	۴/۰۷	۰/۶۸
۹	۳۴	مرد	۰/۲۲	۴/۳۵	۰/۵۲
۱۰	۲۳	مرد	ND	ND	ND
۱۱	۳۱	مرد	۶۹/۶۶	۲/۱۳	۰/۰۹
۱۲	۲۴	مرد	۱۴/۴۲	۲/۵۸	۰/۱۸

* ND= Not determined

می‌دهد یا نه، این پروتئین را با ۸ جمعیت مختلف سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به دست آمده از ۸ نمونه خون اهداکنندگان مجزا ایمن کردند. نتایج نشان داد که این پروتئین قادر به تحریک پاسخ ایمنی در همه نمونه‌های خون بود البته با شدت متفاوت. مطلب فوق هم‌چنان می‌تواند نشان‌دهنده پاسخ ایمنی متفاوت اهداکنندگان در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی باشد (۳۱).

بحث

آنتی‌بادی‌ها در بخش تشخیص و درمان بسیار کاربرد دارند. تاکنون روش‌های مختلفی برای تولید این آنتی‌بادی‌ها استفاده شده است. ایمنی‌زایی مرحله مقدماتی در تمامی این روش‌ها می‌باشد که به شیوه‌های مختلفی صورت می‌گیرد. یکی از مهم‌ترین شیوه‌های ایمنی‌زایی، *in vitro* immunization می‌باشد. در این روش سلول‌های ایمنی از سلول‌های خون محیطی جدا شده و در آزمایشگاه به وسیله آنتی‌ژن مد نظر تحریک می‌شوند و در نتیجه کلون‌های لنفوسیتی تولیدکننده آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن هدف القا می‌شود. جهت دستیابی به بهترین دستورالعمل ایمنی‌زایی آزمایشگاهی باید یک سری نکات را مد نظر داشت که عبارتند از:

نوع و غلظت آنتی‌ژن که آنتی‌ژن‌هایی با جنس پروتئینی

ایمنی منحصر به فرد هر شخص در برابر یک آنتی‌ژن محلول خاص می‌باشد. برای بررسی بیشتر محققان نیاز ویژه به ایتترلوکین ۲ (IL-2) و ایتترلوکین ۴ (IL-4) برای القای تولید آنتی‌بادی را در لنفوسیت‌های خون محیطی (PBLs) از ۱۲ داوطلب اهدای خون که ۹ نفر آنان اهداکنندگان سالم و ۳ نفر آنان دچار آلرژی بودند، بررسی کردند و پاسخ‌های ایمنی آن‌ها را مقایسه نمودند. نتایج نشان داده که نیاز برای این سیتوکاین‌ها در ایمنی‌زایی در بین این اهداکنندگان متفاوت می‌باشد (جدول ۱). PBLs از افراد متفاوت پاسخ‌های متفاوتی به IL-2 نشان می‌دهند. برخی افراد هیچ وابستگی به IL-2 نشان ندادند در حالی که برخی افزایش یا کاهش تولید آنتی‌بادی را در پاسخ به IL-2 داشتند. پاسخ‌های متنوع به IL-2 در بین اهداکنندگان سالم نشان می‌دهد که سیستم ایمنی فردی ممکن است نیازهای منحصر به فردی به سیتوکاین‌ها برای تولید مؤثر آنتی‌بادی داشته باشند. این مطلب بیان می‌کند که مقادیر بهینه سیتوکاین‌های مورد نیاز برای ایمنی‌زایی از فردی به فرد دیگر متفاوت است. این تنوع، پیچیدگی پاسخ ایمنی و نیاز به رویکردهای شخصی در مطالعه‌های ایمنی را برجسته می‌کند (۳۴). در مطالعه مبارک و همکاران که از پروتئین فیوژن Ztat101 جهت ایمنی‌زایی استفاده شده، برای بررسی این که آیا پروتئین فیوژن تنوع در تحریک ایمنی نشان

در محیط کشت منجر به افزایش ایمنی‌زایی و تکثیر لنفوسیت‌های B و تولید آنتی‌بادی خواهد شد. مدت زمان انکوباسیون نیز بر روی ایمنی‌زایی جهت تولید آنتی‌بادی مؤثر می‌باشد. انکوباسیون به مدت ۷ روز جهت ایمنی‌زایی لنفوسیت‌ها مناسب است. این نکته را نیز باید توجه داشت که لنفوسیت‌های خون اهداکنندگان مختلف شرایط بهینه متفاوتی برای ایمنی‌زایی به منظور دستیابی به آنتی‌بادی نیاز دارند. این تنوع پیچیدگی پاسخ ایمنی نشان‌دهنده این است که مقادیر بهینه برای ایمنی‌زایی از فردی به فرد دیگر متفاوت است و نیاز است در مطالعه‌های ایمنی، رویکردهای شخصی را نیز مد نظر گرفت.

نتیجه‌گیری

جهت دستیابی به کلون تولیدکننده آنتی‌بادی علیه یک آنتی‌ژن دلخواه در شرایط آزمایشگاهی باید به عوامل مؤثر در ایجاد ایمنی‌زایی که در این مقاله مروری به آن‌ها اشاره شده است، توجه نمود.

نقش نویسندگان

فائزه خیری اردهایی: ایده مقاله و نگارش نسخه اولیه مقاله
دکتر فاطمه یاری: نظارت بر تحقیق و نگارش مقاله و اصلاح و تهیه نسخه نهایی مقاله

و غلظت $1-10 \text{ ng/mL}$ بهینه می‌باشد. نوع و غلظت لنفوسیت نیز حائز اهمیت می‌باشد که لنفوسیت‌های خون محیطی به علت این که در دسترس می‌باشند و اثر بخشی بیشتری دارند، ترجیح داده می‌شوند. غلظت لنفوسیت‌ها در محیط کشت نیز در ایمنی‌زایی جهت تولید آنتی‌بادی مؤثر می‌باشد که غلظت 2×10^6 سلول بهینه است. جهت ایمنی‌زایی مؤثر باید شرایط فیزیولوژیک محیط کشت را نیز تأمین کرد. وجود اجزای سرم در محیط کشت برای تأمین مواد مغذی لازم، فاکتورهای رشد، تکثیر و تمایز لنفوسیت‌ها ضروری می‌باشد. علاوه بر این‌ها استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط کشت جهت جلوگیری از رشد باکتری و ال‌گوتامین برای حمایت از زنده‌مانی و رشد سلول مؤثر می‌باشد. استفاده از ادجوانت‌ها و سیتوکاین‌ها در محیط کشت سبب افزایش تحریک ایمنی لنفوسیت‌های B و تولید آنتی‌بادی خواهد شد. یکی از عوامل دیگر در بهینه‌سازی ایمونیزاسیون آزمایشگاهی، استفاده از ال‌لوسین متیل‌استر می‌باشد که سبب از بین بردن و حذف جمعیت سلولی غنی از لیزوزوم می‌شود. این سلول‌ها شامل: مونوسیت، سلول‌های T سیتوتوکسیک، سلول‌های T تنظیمی و سلول‌های کشنده طبیعی (NK) هستند. با حذف این سلول‌ها که عمدتاً سبب مهار پاسخ ایمنی می‌شوند، تنها لنفوسیت‌های B و T باقی می‌مانند که میانکنش آن‌ها

References:

- 1- Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)* 2014; 3(4): 113-6. [DOI:10.1016/j.amsu.2014.09.001] [PMID]
- 2- Voak D. Monoclonal antibodies as blood grouping reagents. *Baillieres Clin Haematol* 1990; 3(2): 219-42. [DOI:10.1016/S0950-3536(05)80048-4] [PMID]
- 3- Trier NH, Houen G. Peptide Antibodies in Clinical Laboratory Diagnostics. *Adv Clin Chem* 2017; 81: 43-96. [DOI:10.1016/bs.acc.2017.01.002] [PMID]
- 4- Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(10): 767-74. [DOI:10.1038/nrd3229] [PMID]
- 5- Panch SR, Montemayor-Garcia C, Klein HG. Hemolytic Transfusion Reactions. *N Engl J Med* 2019; 381(2): 150-62. [DOI:10.1056/NEJMr1802338] [PMID]
- 6- Matsumoto SE, Yamashita M, Katakura Y, Aiba Y, Tomimatsu K, Kabayama S, et al. A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by *in vitro* immunization and the phage display method. *J Immunol Methods* 2008; 332(1-2): 2-9. [DOI:10.1016/j.jim.2007.12.005] [PMID]
- 7- Xu H, Xiang X, Ding W, Dong W, Hu Y. The Research Progress on Immortalization of Human B Cells. *Microorganisms* 2023; 11(12): 2936. [DOI:10.3390/microorganisms11122936] [PMID]
- 8- Borrebaeck CA, Danielsson L, Möller SA. Human monoclonal antibodies produced from L-leucine methyl ester-treated and *in vitro* immunized peripheral blood lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 148(3): 941-6. [DOI:10.1016/S0006-291X(87)80223-1] [PMID]
- 9- Borrebaeck CA. Development of *in vitro* immunization in murine and human hybridoma technology. *J Pharm Biomed Anal* 1987; 5(8): 783-92. [DOI:10.1016/0731-7085(87)80096-1] [PMID]
- 10- Kato M, Yan H, Tsuji NM, Chiba T, Hanyu Y. A method for inducing antigen-specific IgG production by *in vitro* immunization. *J Immunol Methods* 2012; 386(1-2): 60-9. [DOI:10.1016/j.jim.2012.08.019] [PMID]
- 11- Borrebaeck CA, Danielsson L, Möller SA. Human monoclonal antibodies produced by primary *in vitro* immunization of peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85(11): 3995-9. [DOI:10.1073/pnas.85.11.3995] [PMID]
- 12- Thiele DL, Lipsky PE. Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(1): 83-7. [DOI:10.1073/pnas.87.1.83] [PMID]
- 13- Tobeyani F, Milani S, Yari F. Evaluation of effective factors during an *in Vitro* immunization against Kell

- blood group antigen. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2022; 19(2):108-21. [Article in Farsi]
- 14- Lagacé J, Brodeur BR. Parameters affecting *in vitro* immunization of human lymphocytes. *J Immunol Methods* 1985; 85(1): 127-36. [[DOI:10.1016/0022-1759\(85\)90281-9](#)] [[PMID](#)]
 - 15- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013; 4: 114. [[DOI:10.3389/fimmu.2013.00114](#)] [[PMID](#)]
 - 16- Jiang W, Lederman MM, Harding CV, Rodriguez B, Mohnher RJ, Sieg SF. TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. *Eur J Immunol* 2007; 37(8): 2205-13. [[DOI:10.1002/eji.200636984](#)] [[PMID](#)]
 - 17- Matsuda Y, Imamura R, Takahara S. Evaluation of Antigen-Specific IgM and IgG Production during an *In Vitro* Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture Assay. *Front Immunol* 2017; 8: 794. [[DOI:10.3389/fimmu.2017.00794](#)] [[PMID](#)]
 - 18- Liu W, Tolar P, Song W, Kim TJ. Editorial: BCR Signaling and B Cell Activation. *Front Immunol* 2020; 11: 45. [[DOI:10.3389/fimmu.2020.00045](#)] [[PMID](#)]
 - 19- Xu TT, Qi Y, Pan Y, Li SQ, Chen HX, Li JM, *et al.* Screening of immune adjuvant and optimization of immunization protocol of glycoprotein D2 subunit vaccine against herpes simplex virus type 2. *Chinese Journal of Biologicals* 2018; 31: 689-94.
 - 20- Zhang B, Yuan C, Song X, Xu L, Yan R, Shah MAA, *et al.* Optimization of Immunization Procedure for *Eimeria tenella* DNA Vaccine pVAX1-pEtK2-IL-2 and Its Stability. *Acta Parasitol* 2019; 64(4): 745-52. [[DOI:10.2478/s11686-019-00090-4](#)] [[PMID](#)]
 - 21- Amrovani M, Yari F, Milani S, Amoohossein B. Evaluation of effective factors in the optimization of immunization to achieve antibodies against RhD antigen in culture medium. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2022; 19(4): 257-69.
 - 22- Pissas G, Eleftheriadis T. Assessment of Humoral Alloimmunity in Mixed Lymphocyte Reaction. *Bio Protoc* 2019; 9(2): e3139. [[DOI:10.21769/BioProtoc.3139](#)] [[PMID](#)]
 - 23- Milani S, Yari F. Alloimmune lymphocytes proliferation in presence of Mixed Lymphocyte Culture and cyclosporine. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2021; 18(2): 97-104. [Article in Farsi]
 - 24- Ichikawa A, Katakura Y, Teruya K, Hashizume S, Shirahata S. In vitro immunization of human peripheral blood lymphocytes: establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. *Cytotechnology* 1999; 31(1-2): 133-41.
 - 25- Xu Q, Katakura Y, Yamashita M, Fang S, Tamura T, Matsumoto SE, *et al.* IL-10 augments antibody production in *in vitro* immunized lymphocytes by inducing a Th2-type response and B cell maturation. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004; 68(11): 2279-84. [[DOI:10.1271/bbb.68.2279](#)] [[PMID](#)]
 - 26- Yamashita M, Katakura Y, Aiba Y, Matsumoto SE, Morihara K, Teruya K, *et al.* Involvement of IL-10 in the suppression of antibody production by *in vitro* immunized peripheral blood mononuclear cells. *Cytotechnology* 2007; 55(2-3): 71-7. [[DOI:10.1007/s10616-007-9088-x](#)] [[PMID](#)]
 - 27- Danielsson L, Möller SA, Borrebaeck CA. Effect of cytokines on specific *in vitro* immunization of human peripheral B lymphocytes against T-cell dependent antigens. *Immunology* 1987; 61(1): 51-5.
 - 28- Sprenger KG, Louveau JE, Murugan PM, Chakraborty AK. Optimizing immunization protocols to elicit broadly neutralizing antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2020; 117(33): 20077-87. [[DOI:10.1073/pnas.1919329117](#)] [[PMID](#)]
 - 29- Bonenfant C, Dimier-Poisson I, Velge-Roussel F, Buzoni-Gatel D, Del Giudice G, Rappuoli R, Bout D. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 2001; 69(3): 1605-12. [[DOI:10.1128/IAI.69.3.1605-1612.2001](#)] [[PMID](#)] []
 - 30- Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody Production with Synthetic Peptides. *Methods Mol Biol* 2016; 1474: 25-47. [[DOI:10.1007/978-1-4939-6352-2_2](#)] [[PMID](#)]
 - 31- Ait Mebarek M, Wijkhuisen A, Adel-Patient K, Lamourette P, Léonetti M, Volland H. Production of human antibodies by *in vitro* immunization using a fusion protein containing the transcriptional transactivator of HIV-1. *J Immunol Methods* 2013; 396(1-2): 96-106. [[DOI:10.1016/j.jim.2013.07.015](#)] [[PMID](#)]
 - 32- Tamura T, Tomimatsu K, Katakura Y, Yamashita M, Matsumoto SE, Aiba Y, *et al.* Anti-peptide antibody production elicited by *in vitro* immunization of human peripheral blood mononuclear cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; 71(12): 2871-5. [[DOI:10.1271/bbb.60460](#)] [[PMID](#)]
 - 33- Ho MK, Rand N, Murray J, Kato K, Rabin H. *In vitro* immunization of human lymphocytes. I. Production of human monoclonal antibodies against bombesin and tetanus toxoid. *J Immunol* 1985; 135(6): 3831-8. [[DOI:10.4049/jimmunol.135.6.3831](#)]
 - 34- Yamashita M, Katakura Y, Shim SY, Matsumoto SE, Tamura T, Morihara K, *et al.* Different individual immune responses elicited by *in vitro* immunization. *Cytotechnology* 2002; 40(1-3): 161-5.