

**Review Article**

## **Effective factors in creating immunization against a desired antigen in the culture medium**

*Kheiri Ardahaei F.<sup>1</sup>, Yari F.<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran*

### **Abstract**

#### **Background and Objectives**

Antibodies are glycoprotein molecules that play a significant role in both diagnosis and treatment. Various methods exist for their production, with laboratory immunization being one of them. This study aims to investigate the laboratory immunization method and the factors influencing the optimization of immunization to achieve antibody-producing immunized lymphocytes in a laboratory setting.

#### **Materials and Methods**

A literature review was conducted using the databases in PubMed and Google Scholar, employing the keywords immunization, in vitro technique, and antibodies, covering the period from 1985 to 2023. About 50 articles were found with these keywords, 34 of which are used in this article.

#### **Results**

The studies reviewed indicate that in vitro immunization offers several advantages over in vivo immunization, including shorter immunization time, high reproducibility, and the ability to obtain IgM-producing clones. However, this method is not universally applicable for producing antibodies against all antigens. Numerous factors influence laboratory immunization, including the type and concentration of the antigen, the type and number of lymphocytes, the removal of immune-suppressing cells, the use of adjuvants and cytokines, the physiological conditions of the culture environment, the incubation duration, and the variability in immune responses among donors.

#### **Conclusions**

For the production of antibodies in vitro, it is essential to consider the effective factors to enhance the efficiency of laboratory immunization.

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

*Received: 3 Nov 2024*

*Accepted: 23 Dec 2024*

---

*Correspondence:* Yari F., PhD of Immunology. 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; Fax: (+9821) 88601555  
E-mail: [f.yari@ibto.ir](mailto:f.yari@ibto.ir)

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

فائزه خیری اردهایی<sup>۱</sup>، فاطمه یاری<sup>۲</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌های گلیکوپروتئینی هستند که در تشخیص و درمان، بسیار مورد استفاده می‌باشند. روش‌های گوناگونی برای تولید آن‌ها وجود دارد که ایمنی‌زایی آزمایشگاهی یکی از آنان می‌باشد. لذا در این مطالعه، به بررسی روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی و عوامل مؤثر در بهینگی ایمونیزاسیون جهت دستیابی به لئوسیت ایمونیزه شده تولیدکننده آنتی‌بادی در محیط آزمایشگاه پرداخته شده است.

#### مواد و روش‌ها

برای انجام این مقاله مروری در پایگاه‌های اطلاعاتی PubMed و Google scholar با استفاده از کلمات کلیدی *in vitro technique*، immunization و antibodies از سال ۱۹۸۵ تا ۲۰۲۳ جستجو انجام شد. حدود ۵۰ مقاله با این کلمات کلیدی یافت شد که ۳۴ مورد آن در این مقاله استفاده شده است.

#### یافته‌ها

مطالعه‌های پیش رو نشان داد که ایمنی‌زایی *in vitro* مزیت‌هایی را نسبت به ایمنی‌زایی *in vivo* دارد که از جمله آن‌ها؛ مدت زمان کوتاه‌تر ایمنی‌زایی، تکرارپذیری بالا و دستیابی به کلون‌های تولیدکننده IgM می‌باشد. از طرفی این روش برای تولید آنتی‌بادی علیه همه آنتی‌ژن‌ها کاربرد ندارد. عوامل زیادی در ایجاد ایمنی‌زایی آزمایشگاهی مؤثر می‌باشند که شامل نوع و غلظت آنتی‌ژن، نوع و غلظت لئوسیت، حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی، ادجوانت‌ها و سیتوکاین‌ها، شرایط فیزیولوژیک محیط کشت، مدت زمان انکوباسیون و تفاوت پاسخ ایمنی اهداکنندگان است.

#### نتیجه‌گیری

جهت تولید آنتی‌بادی می‌توان از روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی استفاده کرد که مزیت‌هایی را نسبت به روش‌های *in vivo* دارد ولی جهت دستیابی به سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی در شرایط آزمایشگاهی باید به عوامل مؤثر در ایجاد ایمنی‌زایی در مقدار مناسب آن‌ها توجه کرد.

**کلمات کلیدی:** ایمنی‌زایی، روش‌های درون آزمایشگاهی، آنتی‌بادی‌ها

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۸/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۳

- ۱- کارشناسی ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران  
 ۲- نویسنده مسئول: PhD ایمونولوژی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

### 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 برعلیه 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 فنوتیپ 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 ایمونی‌زایی قرار می‌گیرد (۴، ۵).

ایمونی‌زایی مقدمه تولید آنتی‌بادی می‌باشد که به روش‌های مختلفی انجام می‌شود. یکی از این روش‌ها ایمونی‌زایی 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 میلومایی 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 کایمیرزاسیون 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

ایمونی‌زایی 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

سلول‌های پلاسماسل را افزایش می‌دهد که آنتی‌بادی‌های IgG اختصاصی آنتی ژن تولید کنند. این مراحل احتمالاً شامل قرار گرفتن در معرض آنتی ژن 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 آنتی ژن را با افزایش تعداد سلول‌های تولیدکننده این آنتی‌بادی‌ها افزایش می‌دهد.

این روش باعث فعال‌شدن فعال‌کننده‌های سلول B و سلول‌های کمکی CD4<sup>+</sup> 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 (CpG) Oligodeoxynucleotides) به عنوان یک محرک ایمنی در طول تحریک اولیه آنتی ژن 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 آنتی ژن 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 آنتی ژن در پایان کشت ضروری هستند (۱۰).

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 سلول‌های سلول B نامیرا جهت ایمنی‌زایی استفاده کرد. استفاده از سلول‌های 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 آنتی ژن 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 آنتی ژن تحریک شده باشد (۸، ۹).

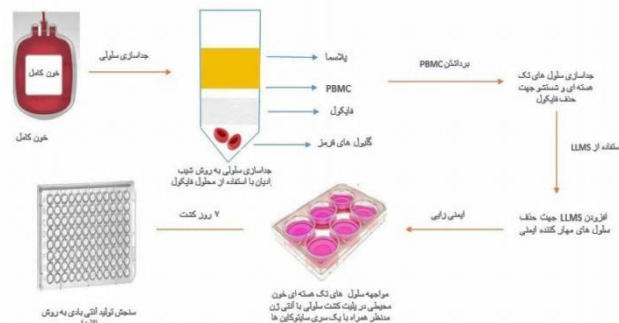
ایمنی‌زایی آزمایشگاهی با توجه به همه مزیت‌هایی که نسبت به ایمنی‌زایی‌های سنتی دارد دارای محدودیت‌هایی نیز می‌باشد که منجر به چالش‌هایی در به دست آوردن تعداد کافی سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی با میل ترکیبی (affinity) بالا می‌شود. روش ایمنی‌زایی آزمایشگاهی تولید آنتی‌بادی با میل ترکیبی پایین و تولید آنتی‌بادی 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 آنتی ژن و به دنبال آن گسترش سلولی است. این فرآیند فرکانس

## عوامل مؤثر در ایجاد ایمنی زایی 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 لیزوزوم‌تروپیک به ترکیباتی اطلاق می‌شود که می‌توانند وارد لیزوزوم‌ها شوند. استرهای اسید آمینه L، نوعی عوامل لیزوزوم‌تروپیک هستند که می‌توانند 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 لیزوزوم‌تروپیک 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 سیتولیتیک 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  $TC8^+$  بر روی سلول‌های B ترشح‌کننده آنتی‌بادی تحریک شده با میتوز اختصاصی، اثر مهاری دارند. استفاده از ماده ال‌لوسین متیل‌استر سبب حذف این سلول‌های مهارکننده ایمنی بدون هیچ اثر منفی بر روی سلول‌های B و سلول‌های T کمکی (Th) می‌شود. زمان استفاده از ماده LLME بعد از جداسازی سلول‌های 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 مهارکننده ایمنی می‌گردد. بعد استفاده از LLME، درصد سلول‌های بیان‌کننده مارکرهای Lue11 و Lue7 (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).



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

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 سانتیفریوژ با شیب گرادیان 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- $\gamma$ ) 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 به‌سزایی ایفا می‌کنند. از جمله مهم‌ترین مواد کمک تحریکی می‌توان به سیتوکاین‌هایی هم‌چون، اینترلوکین ۴ (IL-4) و اینترفرون گاما (INF- $\gamma$ ) اشاره کرد. این دو سیتوکاین می‌توانند در

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 مهایری OKT8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> افزوده و بعد کمپلمان خرگوش اضافه گردید، که در نهایت لیز سلول‌های OKT8<sup>+</sup> را به همراه داشت (۱۴).

### 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 دی‌پتید (MDP) هستند. استفاده از ادجوانت‌ها در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی سبب افزایش تحریک ایمنی لنفوسیت‌های B به آنتی‌ژن می‌شود (۱۵).

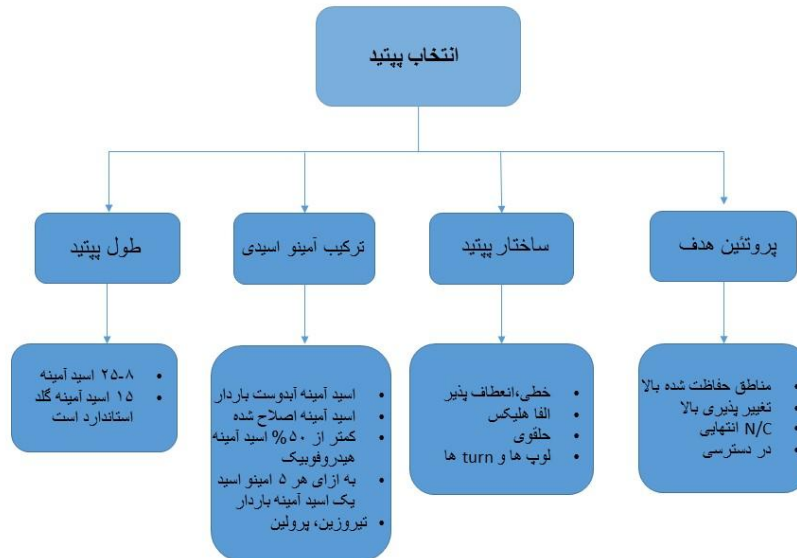
در شرایط فیزیولوژیک، سلول‌های B بکر یا B پاسخ ایمونولوژیک ضعیفی دارند. در حالی که وجود ادجوانت CPG ODN، مارکرهای CD8، CD40 و HLA-DR بر سطح سلول‌های B Native را افزایش می‌دهد که متعاقباً باعث فعال‌سازی هر چه بیشتر سلول‌های T می‌شود. این اثر در نهایت منجر به پاسخ ایمنی به مراتب قوی‌تری خواهد شد (۱۶).

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

(۲۴). اینترلوکین ۱۰ (IL-10) یا عامل مهار تولید سیتوکاین انسانی (Cy tokine synthesis in hibitory factor : CSIF) توسط انواع مختلفی از سلول‌ها تولید می‌شود و به عنوان یک سرکوب‌کننده کلی تکثیر سلول‌های ایمنی و پاسخ‌های سیتوکاینی عمل می‌کند. در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی حضور IL-10 قبل از ایمن‌سازی با آنتی‌ژن باعث مهار تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌های خون محیطی می‌شود. با تجزیه و تحلیل الگوهای بیان ژن‌های مختلف سیتوکاینی، نشان داده شد که بیان IL-10 قبل از قرار گرفتن سلول‌ها در معرض آنتی‌ژن می‌تواند با سرکوب تولید آنتی‌بادی بر پاسخ ایمنی تاثیر بگذارد. در صورتی که این اینترلوکین در صورت اضافه شدن به سلول‌های تک هسته‌ای ایمن شده با آنتی‌ژن می‌تواند موجب افزایش تکثیر و بقای لنفوسیت‌های B و تولید آنتی‌بادی نیز شود. زمانی که IL-10 به عنوان سیتوکاین در طول ایمن‌سازی آزمایشگاهی به سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تیمار شده با LLME اضافه می‌شود، تولید آنتی‌بادی را به طور چشمگیری تقویت می‌کند. نتایج نشان داد که بیان ژن IL-10 همراه با تولید آنتی‌بادی افزایش یافته است. هنگامی که IL-10 در محیط آزمایشگاه، به سلول‌های ایمنی مواجه شده با آنتی‌ژن اضافه می‌شود، پاسخ ایمنی را به سمت Th2، هدایت می‌کند. در واقع IL-10 بر الگوهای بیان سیتوکاینی در سلول‌های B و T تاثیر می‌گذارد و با کاهش سیتوکاین‌های نوع Th1 و تنظیم مثبت سیتوکاین‌های Th2 پاسخ ایمنی را به سمت تولید آنتی‌بادی تقویت می‌کند. با تجزیه و تحلیل بیان آنتی‌ژن سطحی خاص بر سطح سلول‌های B با استفاده از روش‌های فلوسیتومتری، مشاهده شد که IL-10 با افزایش بیان مارکر CD38 در تمایز و بلوغ سلول‌های B به پلاسما سل‌های تولیدکننده آنتی‌بادی نیز نقش دارد. در مقابل در صورتی که IL-10 به سلول‌های ایمنی قبل از ایمنی‌زایی با آنتی‌ژن اضافه شود، تولید آنتی‌بادی را با مکانیسم‌های مستقیم و غیر مستقیم سرکوب می‌کند. IL-10 مستقیماً از تکثیر سلول‌های T و تولید سیتوکاین جلوگیری می‌کند در حالی که به طور غیر مستقیم بر بلوغ سلول‌های دندریتیک تاثیر می‌گذارد و آنان را به سلول‌های ارائه‌دهنده آنتی‌ژنی تلوروژنیک (Tolerogenic) تبدیل می‌کند.

بهبود ایمنیزاسیون 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 آلوایمنیزاسیون 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 می‌تواند اثر مهارکنندگی سیکلوسپورین بر روی فرآیند آپوپتوز باشد که منجر به افزایش تکثیر لنفوسیتی می‌شود (۲۳). اینترلوکین ۴ که به عنوان فاکتور رشد سلول B (BCGF) شناخته می‌شود، نقش مهمی در فعال‌سازی سلول‌های B در مراحل اولیه پاسخ ایمنی ایفا می‌کند. IL-4 کمک می‌کند تا سلول‌های B آماده پاسخ به IL-2 و سایر اینترلوکین‌ها شوند. این سیتوکاین برای فعال‌سازی اولیه سلول B ضروری است و آنان را برای پاسخ‌های ایمنی بیشتر آماده می‌کند. اینترلوکین ۲ یک فاکتور رشد سلول T می‌باشد که برای گسترش مجموعه سلول‌های T کمکی که به آنتی‌ژن‌ها پاسخ می‌دهند حیاتی است. بر اساس نتایج به دست آمده، ترکیب IL-4 و IL-2 نقش به‌سزایی برای ایمنی‌زایی آزمایشگاهی علیه آنتی‌ژن‌های محلول دارد. این ترکیب در تقویت رشد و تمایز سلول‌های B مؤثر است. هیچ مشاهده‌ای یافت نشده است که افزودن IL-6 برای پاسخ ایمنی اولیه به آنتی‌ژن‌های محلول ضروری باشد



شکل ۲: فاکتورهای مؤثر برای انتخاب پپتید سنتتیک به عنوان ایمونوژن. طول پپتید و ساختار آن در انتخاب آن برای ایمنی‌زایی مهم می‌باشد (۳).

#### (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

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).



از طرفی، غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن بر تولید آنتی‌بادی‌های خاص در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی تأثیر می‌گذارد. معمولاً غلظت‌های پائین آنتی‌ژن (۱۰-۱ ng/mL) برای تحریک تولید آنتی‌بادی 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 آنتی‌بادی 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 آنتی‌ژن مواجه شده و به دنبال آن فعال می‌شوند و تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن 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 لنفاوی 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 آنتی‌بادی 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  $1 \times 10^6$  کشت داده شدند، سطح آنتی‌بادی‌های خاص تولید شده در مقایسه با غلظت بهینه  $2 \times 10^6$  به طور قابل توجهی کمتر بود و در آزمایش‌هایی که از غلظت سلولی بالاتر از  $4 \times 10^6$  استفاده شده است، سطح تولید آنتی‌بادی کمتر از آزمایش با میزان سلول  $2 \times 10^6$  بود که این نشان‌دهنده اهمیت غلظت لئوسیت‌ها در محیط کشت می‌باشد (۱۴). مطالعه‌های دیگری نیز اهمیت تعداد سلول‌های لئوسیت

منظور تولید آنتی‌بادی، آنتی‌ژن‌های پروتئینی هستند (۱۱). 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 (transcriptonal 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).

موجود در کشت، ایمنی زایی و تولید آنتی بادی را اثبات کرده‌اند (۳۲).

ایمنی زایی لئوسیت‌ها مناسب می‌باشد (۳۳).

#### ۸) تفاوت پاسخ ایمنی اهداکنندگان:

محققان مشاهده کردند که لئوسیت‌های خون محیطی اهداکنندگان مختلف شرایط بهینه متفاوتی جهت ایمنی زایی به منظور تولید آنتی بادی نشان می‌دهند. تفاوت نیازهای بهینه شرایط ایمنی سازی برای هر فرد نشان‌دهنده پاسخ‌های ایمنی منحصر به فرد هر شخص در برابر یک آنتی ژن محلول خاص می‌باشد. برای بررسی بیشتر محققان نیاز ویژه به اینترلوکین ۲ (IL-2) و اینترلوکین ۴ (IL-4) برای القای تولید آنتی بادی را در لئوسیت‌های 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 ایمنی زایی 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 آنتی بادی 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 آنتی بادی داشته باشند. این مطلب بیان می‌کند که مقادیر بهینه سیتوکاین‌های مورد نیاز برای ایمنی زایی 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 ایمنی زایی استفاده شده، برای بررسی این که آیا پروتئین فیوژن تنوع در تحریک ایمنی نشان 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 ایمنی زایی آزمایشگاهی باشد (۳۱).

#### ۹) شرایط فیزیولوژیک محیط کشت:

جهت ایمنی‌زاسیون 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 ایمن‌سازی *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 ایمنی زایی 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 زنده‌مانی (viability) و هم سنتز آنتی بادی کاهش می‌یابد. ۷ روز انکوباسیون جهت

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

شماره	سن	جنس	سطح سرمی آنتی بادی		
			IgE (mg/mL <sup>-1</sup> )	IgG (mg/mL <sup>-1</sup> )	IgM (mg/mL <sup>-1</sup> )
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

## بحث

آنتی بادی‌ها در بخش تشخیص و درمان بسیار کاربرد دارند. تاکنون روش‌های مختلفی برای تولید این آنتی بادی‌ها 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 و غلظت ۱-۱۰ 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  $2 \times 10^6$  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 ال‌گلوتامین 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 ایمنی‌زاییون 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 در محیط کشت منجر به افزایش ایمنی‌زایی و تکثیر لنفوسیت‌های B و تولید آنتی‌بادی خواهد شد. مدت زمان

**نتیجه گیری**

جهت دستیابی به کلون تولیدکننده آنتی بادی علیه یک آنتی ژن دلخواه در شرایط آزمایشگاهی باید به عوامل مؤثر در ایجاد ایمنی زایی 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

انکوباسیون نیز بر روی ایمنی زایی جهت تولید آنتی بادی مؤثر می باشد. انکوباسیون به مدت ۷ روز جهت ایمنی زایی لنفوسیت ها مناسب است. این نکته را نیز باید توجه داشت که لنفوسیت های خون اهداکنندگان مختلف شرایط بهینه متفاوتی برای ایمنی زایی به منظور دستیابی به آنتی بادی نیاز دارند. این تنوع پیچیدگی پاسخ ایمنی نشان دهنده این است که مقادیر بهینه برای ایمنی زایی از فردی به فرد دیگر متفاوت است و نیاز است در مطالعه های ایمنی، رویکردهای شخصی را نیز مد نظر گرفت.

**References:**

- Liu JK. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. *Ann Med Surg (Lond)* 2014; 3(4): 113-6.
- Voak D. Monoclonal antibodies as blood grouping reagents. *Baillieres Clin Haematol* 1990; 3(2): 219-42.
- Trier NH, Houen G. Peptide Antibodies in Clinical Laboratory Diagnostics. *Adv Clin Chem* 2017; 81: 43-96.
- Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(10): 767-74.
- Panch SR, Montemayor-Garcia C, Klein HG. Hemolytic Transfusion Reactions. *N Engl J Med* 2019; 381(2): 150-62.
- 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.
- Xu H, Xiang X, Ding W, Dong W, Hu Y. The Research Progress on Immortalization of Human B Cells. *Microorganisms* 2023; 11(12): 2936.
- 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.
- Borrebaeck CA. Development of *in vitro* immunization in murine and human hybridoma technology. *J Pharm Biomed Anal* 1987; 5(8): 783-92.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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]
- Lagacé J, Brodeur BR. Parameters affecting *in vitro* immunization of human lymphocytes. *J Immunol Methods* 1985; 85(1): 127-36.
- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol* 2013; 4: 114.
- Jiang W, Lederman MM, Harding CV, Rodriguez B, Mohner 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.
- 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.
- Liu W, Tolar P, Song W, Kim TJ. Editorial: BCR Signaling and B Cell Activation. *Front Immunol* 2020; 11: 45.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 30- Lee BS, Huang JS, Jayathilaka LP, Lee J, Gupta S. Antibody Production with Synthetic Peptides. *Methods Mol Biol* 2016; 1474: 25-47.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.