نقش سلولهای تغذیه کننده تیموس و میتوژن ها در کلونینگ سلولهای B

نویسنده: دکتر محمد حسین نیکنام [1]

خلاصه

شناسایی و شمارش سلولهایی که در یک پاسخ ایمنی در قبال پادگن شرکت خواهند نمود اگرچه از طریق مستقیم انجام شدنی نیست، از پدیده تولید سلولهای پیشقراول توسط سلولهای پاسخگو و ایجاد کلونی در این رابطه می توان کمک گرفت. از طرف دیگر با تبدیل تعدادی از سلولهای تکثیر شده به پلاسماسل ها و تولید و ترشح پادتن، وجود پادتن نشانگر وجود کلون و انهم نمایانگر سلول پیش ساز می باشد.

در این مقاله نقش سلولهای تیموس و میتوژن ها در دو تکنیک کلونینگ شامل کلونینگ سلولهای B بر روی دیسک های صافی کاغذی و همچنین واحد تشکیل کلونی سلول B (CFUB) مورد بررسی و مقایسه قرار می گیرد. در تکنیک کلونینگ سلولهای B بر روی دیسک های صافی که جهت تولید کلونهای لنفوسیت B توضیح داده شده است، سلولهای طحالی بر روی صافیهای کاغذی کشت داده می شوند و توسط پادگن یا میتوژن، در محل تحریک می گردند. در این تکنیک حضور سلولهای تغذیه کننده اشعه دیده تیموس موش صحرایی در افزایش تعداد کلونی ها بسیار مؤثر است.

در تکنیک CFUB، کلونی ها در آگار نیمه سخت که به منزله چهارچوبی برای حمایت از لنفوسیت های B جدا از یکدیگر می باشد، تشکیل می گردند. در این تکنیک تشکیل کلونی کاملا وابسته به حضور میتوژن در محیط کشت می باشد.

کلید واژه: کلونینگ، میتوژن، آگار، سلولهای تیموس، فعال کننده های چند رده ای سلول B

مقدمه:

نتیجه فعال شدن سلول B، پاسخ ایمنی هومورال است که شامل تکثیر کلونی لنفوسیت B مشتق شده از مغز استخوان (سلول صلاحیت دار ولی خاموش) و تکامل این سلولها به سلولهای ترشح کننده پادتن می باشد.

یک پاسخ ایمنی بر آیندی از مؤلفه های مختلف است که به صورت پیچیده ای در حال تعادل نسبت به یکدیگر بسر می برند. بنابراین، نتیجه سنجش عیار پادتن و یا تعداد سلولهای ترشح کننده، تنها و به صورت انتزاعی پاسخهای لنفوسیت های B را نشان نمی دهد. بلکه نشانگر پاسخهای تنظیم و تعدیل شده سلول توسط تعداد زیادی از سلولهای زیر رده فعال شده می باشد.

در حالیکه In vivo، در یک بستر طبیعی و فیزیولوژیک، بررسی القاء و دیگر ابعاد یک پاسخ ایمنی را ممکن می سازد، رویکردهای In vitro، بررسی اجزاء مختلف این پاسخ را به مقدار زیادی تسهیل نموده است. انجام آزمایشات In vitro نشانگر این واقعیت است که پاسخهای ایجاد شده در این سیستم به آنچه که در In vivo اتفاق می افتد شباهت بسیار زیادی دارند.

در فرآیند فعال شدن سلولهای B بوسیله پادگن که ابعاد پیچیده ای دارد و مورد مطالعه فراوان قرار گرفته، به جهت ساز و کارهای تنظیمی متعدد، تنها تعداد معدودی از سلولهای

۱. عضو هیأت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تهران

B به هر پادگنی پاسخ می‌دهند. نتایج تحقیقات گواه آن است که در شرایط ایده‌آل تعداد اندکی سلول که به یک پادگن متصل می‌شوند، به آن پاسخ می‌دهند. مشکل ناتوانی سلول اختصاصی B در پاسخ به یک پادگن، یکی از سؤالات اساسی در تنظیم پاسخگویی سلول B است. بررسی تعداد سلولهای پاسخگو به یک پادگن می‌تواند از طریق روشهایی مانند سنجش رقت محدود (Imiting dilution assay) انجام شود که بهترین نشانگر رشد و افتراق سلولهای فعال B می‌باشد. تنها نشانه مستقیم و در دسترس، ترشح پادتن بر علیه پادگن محرک می‌باشد. سیستم کشت میکرو که بوسیله Lefkovits (۱) طراحی شده است، امکان سنجش فعالیت سلول B بوسیله تجمع پادتن و بدست آوردن مایع کشت و سنجش پادتن بوسیله تست همولیتیک را فراهم می‌آورد.

سیستمهای کلونینگ سلولهای B جهت بررسی پاسخهای لنفوسیتها به صورت انفرادی که به وسیله میتوژن ها فعال می‌گردند، طراحی شده‌اند. در یک سیستم برای کلونینگ سلولهای B تحریک شده بوسیله لیپوپلی ساکارید (LPS)، از سلولهای تغذیه کننده با دوز بالا استفاده شده است. در یک مورد، ۶ میلیون سلول تیموس به عنوان حمایت از رشد و تمایز سلولهای B فعال شده استفاده شده است. در این سیستم مشاهده شد که ۳۰٪ لنفوسیت‌های B فعال طحالی موشها به تحریک پاسخ دادند (۲). بعلاوه، هر سلول B پاسخگو، به دسته ای از سلولهای ترشح کننده IgM تبدیل می‌شود و هر کدام از اعضاء یک کلون، ایمونوگلوبولین IgM را به میزانی که بوسیله سلول تشکیل د هنده پلاک، شناسایی شوند، ترشح می کنند. همچنین مشاهده شد که حدود ۱۰٪ سلولهای B که به ترشح IgM تحریک شده بودند، به ترشح IgG سوئیچ کردند (۳). در این سیستم مشاهدات مورفولوژیکی مراحل مختلف فعال شدن سلولهای B ممکن نیست.

ابتدا از سلولهای تیموس موش به عنوان سلولهای تغذیه کننده در محیطهای کشت پس از جدا کردن سلولهای B استفاده می‌شد، در حالی که در تغییرات بعدی از سلولهای تیموس موش صحرایی که در معرض اشعه X با دوز کم قرار می‌گرفتند استفاده شد. در این حالت سلولهای ترشح کننده Ig بدون تغییر نقش تغذیه کنندگی شان کاهش می یابند.

در سیستم دیگر، آگار نیمه جامد و یا شل به عنوان حمایت کننده از لنفوسیتهای B بکار گرفته می‌شود. در این سیستم سلولهای B به صورت جداگانه با تشکیل کلونی‌های جدا از یکدیگر متشکل از سلولهای پیشقراول از ۵۰ تا ۲۰۰ سلول، به میتوژن پاسخ می‌دهند. لازمه این رشد وجود LPS و ۲- مرکاپتواتانول (2mE) و همچنین میتوژنهای موجود در آگار می باشد (۴). افزودن ماکروفاژها برای افزایش تعداد کلونی‌های القاء شده در این سیستم مؤثر ارزیابی شده ند (۴،۵) فراوانی سلولهای B که به تشکیل کلونی در این سیستم تحریک می شوند در بهترین شرایط ۲۰٪ است و ۱۰٪-۱٪ بیشتر شایع است (۶).

وقتی گلبولهای قرمز گوسفند (SRBC) به آگار افزوده می‌شوند، کلونی‌های لنفوسیت B تمایل به ترشح پادتن می یابند (۶). فراوانی این سلولهای B تقریباً ۰/۱٪ است. این نکته گزارش شده است که افزودن محیط کشت از کشتهای تیموس به محیط کشت آگار می تواند زیر رده‌های سلول B را به تشکیل کلونی و ترشح Ig تحریک کند (۷). ازطرف دیگر گزارش شده است که مایع روبی سلولهای طحالی تحریک شده با Con A می تواند تشکیل کلونی توسط لنفوسیت B را سرکوب نماید (۶). ظاهراً،

جدول شماره ۱- سلولهای تغذیه کننده تیموس تشکیل کلونی را تقویت می کنند

Number of Input Cells[1]	10^5	10^6	10^7	10^8
Without Thymocyte	N	N	N	N
	5	13	28	69
	3	11	24	77
Mean ±2SD	4 ±2.8	12 ±2.8	26 ±5.6	73 ±11.2
With Thymocyte[2] (2×10^7)	N	N	N	N
	24	142	99	24
	16	158	105	18
Mean ±2SD	20 ±11.2	150 ±22.6	102 ±8.4	21 ±8.4

1: Spleen cells of normal C57BL/6 2: Rat thymocytes

N: تعداد کلونی‌های شمارش شده در فتوراد یوگرافی

تشکیل کلونی در آگار نتیجه پاسخ زیر رده های لنفوسیت های B که در حدود ۷۰٪ آنها حامل slg D می باشند، است.

فعال کننده های چند رده ای موادی هستند که تکثیر سلول B را تحریک نموده و تمایز آنها را به سلولهای پلاسماسل تولید کننده پادتن پیش می برند. فعال کننده های چند رده ای سلول B که بیشتر مورد استفاده قرار می گیرند، عبارتند از::

1-Pokeweed mitogen(8) ,2-Dextran sulfate (9,13), 3- Polyvinyl pyrrolidone (9,12), 4- Pneumococcal polysaccharide III, 5- Poly(A-U) (9,12), 6- Purified protein derivative (9,13), 7- Poly (I.C) (9), 8- Lipopolysaccharide (9),9- Staphylococal organisms (15,16), 10- Bacto streptolysin O reagent (17),11Staphylococcal phage lyate (14), 12- Epstein - Barr Virus (18,19), 13- *Nocardia* Water - Soluble mitogen (20).

روش کار :

کلونینگ لنفوسیت های B بر روی دیسک های صافی کاغذی:

کلونینگ لنفوسیت های B بر روی دیسک های صافی کاغذی روشی مؤثر برای شمارش و بررسی لنفوسیت های پیش ساز می باشد. در این روش با سلولهای طحالی با تراکم کم (10^7 - 10^6 سلول) همراه با سلولهای تیموس صافیهای کاغذی را می پوشانیم. سپس لنفوسیت های گسترده شده در محل بوسیله میتوژن تحریک می شوند. سلولهای فعال شده تکثیر گشته و افتراق می یابند و کلونی های خالصی را تشکیل می دهند. کلونهای ترشح کننده پادتن در قالب سلولزی کاغذ ثابت می شوند. از آنجا که هر کلونی در واقع از یک لنفوسیت B منشأ می گیرد، شمارش و بررسی خصوصیات کلونی ها، در واقع سلولهای B طحالی را توصیف می کند.

موش C57BL/6 به عنوان دهنده سلولهای طحالی استفاده شده اند. موش صحرائی نیز به عنوان دهنده سلول تیموس مورد استفاده قرار گرفته است.

سلولهای طحالی گسترده شده بر روی صفحه کاغذی، در محیط Iscove's Modified Dulbecos Medium که به آن سرم ۷/۵٪ جنین گاوی (FCS) 2-mE و مخلوط پنی سیلین/ استرپتومایسین (P/S) اضافه شده است، کشت داده می شوند

تولید سلولهای ترشح کننده پادتن منحصراً وابسته به وجود پادگن یا میتوژن در محیط کشت می باشد. (E.coli LPS 0127:B8) پس از دیالیز شدن در سه دور با آب مقطر (۴ درجه سانتیگراد و در سه روز)، لیوفیلیزه شده و در Hanks balanced (HBSS) salt solution به صورت محلول آماده می شود.

دیسک های کاغذی Whatman ۵۴ (با قطر ۸/۲۶ سانتیمتر) به عنوان چارچوب رشد کلونی ها مورد استفاده قرار می گیرند. قبل از استفاده، هر دیسک با مداد شماره و جهت گذاری می شود. این علائم در پیدا کردن جهت آزمایشهای مشابه و در مقایسه آنها با یکدیگر بکار می آیند.

برای جستجوی کلونی های ASC از طریق همولیزهای اختصاصی، دیسک های صافی کاغذی از محیط کشت خارج شده (پس از ۴ تا ۷ روز)، و پس از ۳ بار شستشو در

جدول شماره ۲- تعیین غلظت بهینه بعنوان میتوژن و تعداد سلولهای طحالی برای تشکیل کلونی

cells[1] (×10[6])	1	3	5
Control	N	N	N
	2	3	7
	4	4	6
Mean ±2SD	3 ±2.8	3.5 ±1.4	6.5 ±1.4
+LPS[2] 10 ug/ml	N	N	N
	8	12	12
	11	9	8
Mean ±2SD	9.5 ±4.2	10.5 ±4.2	10 ±5.6
+DxS[3] 10 ug/ml	N	N	N
	10	11	8
	8	7	12
Mean ±2SD	9 ±2.8	9 ±5.6	10 ±5.6
+LPS 5 ug/ml +DxS 10 ug/ml	N	N	N
	11	19	33
	15	21	29
Mean ±2SD	13 ±5.6	20 ±2.8	31 ±5.6
+LPS 10 ug/ml +DxS 10 ug/ml	N	N	N
	18	68	148
	22	71	153
Mean ±2SD	20 ±5.6	69.5 ±4.2	150.5 ±7
+LPS 15 ug/ml -DxS 10 ug/ml	N	N	N
	22	71	151
	25	65	168
Mean ±2SD	23.5 ±4.2	68 ±8.4	160.5 ±7

1: Spleen cells of normal C57BL/6
2: Lipopolysaccharide
3: Dextran sulfate

N: تعداد کلونی های شمارش شده در توربیدوگرافی
رشد کلونی در حضور سلولهای تخلیه کننده تیموس بعد گرفته است

Washing Medium (WM) به آرامی به صورت رو به پایین بر روی ژل نشانگر قرار داده می شوند.

به این ترتیب ژل ها و دیسک ها برای حدود ۲ ساعت در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد در فضای مرطوب ۹۵٪ هوا و ۵٪ CO2 ،مجاور می شوند. دیسک ها سپس با اضافه نمودن چند میلی لیتر rinse medium (RM) در پتری دیش به راحتی قابل جابجایی می باشند. محل پلاکهای همولیتیک با ماژیک بر روی پتری دیش علامت گذاری می شود. به این وسیله توزیع نقاط همولیتیک (کلونی های اختصاصی ASC) در مقایسه با علائم جهت یابی که بر روی پتری دیش وجود دارد، ثبت می شود.

تکنیک ایمونوبلات روش دیگری برای جستجوی کلونی های ASC می باشد. دیسک های نیترو سلولز در آب مقطر خیسانده شده و به بافر ضعیف از نظر قدرت یونی منتقل می گردند. دیسک ها سپس در طی شب در همان بافر که حاوی ۵۰۰ μg/ml پادگن مورد نظر می باشد خیسانده می شوند. حجم این محلول به گونه ای تنظیم می شود که غلظت پادگن ۸۰۰-۵۰۰ میکروگرم برای هر دیسک نیتروسلولز باشد. دیسک های پوشانده شده سپس بلوک می شوند.

دیسک های نیتروسلولز ممکن است با مقادیر مشابه از پادتن آنتی ایمونوگلوبولین خالص شده بر اساس میل ترکیبی تام و یا تک رده (به عنوان مثال anti-IgM) پوشانده شود که در این صورت دیسک ها، کلونی های ترشح کننده IgM را جستجو خواهند نمود. کلونی های مخصوص با انکوباسیون نیتروسلولزهای لکه گذاری با پادگن های نشان دار آشکار می گردند.

دیسک های صافی کاغذی که حاوی کلونی های سلول B فعال شده می باشند را از کشت خارج می کنیم (پس از ۳ تا ۷ روز)، آنها را شسته و به صورت رو به پایین بر روی دیسک های نیتروسلولز قرار می دهیم. پس از برداشتن کاغذهای صافی، هر دیسک نیتروسلولز ۵ بار در PBS حاوی ۰/۱٪ آلبومین سرم گاوی (BSA) و ۰/۰۵٪ Tween 20 شسته می شوند. نیتروسلولزهای شسته شده سپس با محلول PBS/BSA/Tween 20 حاوی پادتن دوم نشاندار شده توسط رادیوایزوتوپ و یا آنزیم، پوشانده می شوند. برای پادتن های نشان دار توسط مواد رادیواکتیو، 5×10^5 تا 5×10^6 input c.p.m برای هر دیسک مناسب است. دیسک ها با مواد نشاندار شده با رادیوایزوتوپ و آنزیم در طول مدت یک شب در حرارت ۴ درجه سانتیگراد انکوبه می شوند، سپس به خوبی با محلول PBS/BSA/Tween 20 شسته و سپس خشک می شوند. اتو رادیوگرافی در حرارت ۷۰ درجه سانتیگراد بر روی فیلم X-AR5 همراه با صفحه مشدد انجام می گردد. زمان در معرض قرار گرفتن از ۷۲ ساعت تا ۱۲۰ ساعت متغیر است.

جدول شماره ۳- مقایسه رشد کلونی ها در CFUB در حضور وغیاب LPS ،SRBC وسلوهای تغذیه کننده تیموس

Expriment #	LPS 10 μg/ml	SRBC 20%	Tymus Cells 10^6 c	Colonies Mean ± 2SD
1	-	-	-	0
2	+	-	-	382 ± 32
3	-	+	-	464 ± 38
4	-	-	+	300 ± 24
5	+	+	-	1148 ± 78
6	+	-	+	1131 ± 52
7	-	+	+	1120 ± 366
8	+	+	+	1146 ± 84

سلول 5×10^5 سلول B غدد لنفاوی موش

SRBC:Sheep Red Blood Cell
LPS:Lipopolysaccharide

واحد تشکیل کلونی سلول B:

تشکیل کلونی در کشتهای آگاروز توسط سلولهای B بوسیله روش تعدیل شده واحد تشکیل کلونی (CFU) که توسط Kincade et al (۲۱) توصیف شده است، انجام می شود.

مجموع $1-2 \times 10^5$ سلول B در ظرفهای کشت به اندازه ۱۰۰ × ۳۵ میلی لیتر (Falcon 3001,son) که دور آن با ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ۲۰٪ گلبولهای قرمز گوسفند به صورت حلقه ای پوشیده شده است. در حجم یک میلی لیتر محلول کشت s lscove s، حاوی ۱/۶٪ آگاروز شل شونده در حرارت پایین از نوع Sea Prep که با نوتریدوما ۱٪ تکمیل می شود، کشت داده می شوند. لنفوکاین های مناسب را می توان به کشت اضافه نمود. کشتها برای یک ساعت در حرارت ۴ درجه سانتیگراد و به منظور ژل شدن آگاروز قرار داده می شوند و سپس در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد و برای ۷ روز در ۵٪ CO2 مجاور می شوند و پس از آن کلونی ها بوسیله میکروسکوپ شمارش می گردند.

از موشهای ماده SJL/J (در سن ۴ تا ۶ هفته)

و BALB/c، سلولهای طحالی، غدد لنفاوی و صفاقی را تهیه می کنیم.

مایع محیط کشت، محلول 2 x Iscove's می باشد که حاوی محلول پودر Iscove's می باشد که به آن 2 mE ، $NaHCO_3$ ، L-glutamine , p/s, fetal calf serum (FCS) و نوتریدوما اضافه شده و پس از صافی مورد استفاده قرار می گیرد.

نتایج:

میانگین تعداد کلونی های ASC برحسب تعداد سلولهای طحالی با دیدن سلولهای تیموس:

همانگونه که جدول شماره ۱ نشان می دهد با $p<0/05$ به تعداد کلونهای ASC ، در غیاب و یا در حضور سلولهای تیموس تا غلظت 10^6 سلول به ترتیب اختلاف معنی داری را در جهت افزایش کلونی نشان می دهد و از طرفی این اختلافها در گروهی که سلولهای تیموس به آنها اضافه شده است کاملاً بیشتر مشهود می باشد. بدین مفهوم که بیشترین میانگین رشد پلاک در غلظت 10^6 در حضور سلولهای تیموس ۲۲/۶± ۱۵۰ می باشد.

استفاده از سلولهای تغذیه ای، تعداد کلونی های القاء شده توسط LPS را افزایش می دهد و تشکیل کلونی در غلظتهای به مراتب کمتر را موجب می شود. تنها تأثیرات مفید زمانی حاصل می شود که 2×10^7 تیموسیت استفاده گردد (شکل ۱) و مناسبت تر از غلظتهای کمتر و بیشتر بکار رفته در آزمایشات اولیه بود.

در آزمایش مقایسه پاسخ سلولهای طحالی با و بدون سلولهای تیموس، LPS و DxS (نشان داده نشده است)، بهترین پاسخ در حضور LPS+DxS و تیموسیت می باشد و تعداد کلونی های ایجاد شده در غیاب هر کدام از عوامل فوق الذکر نسبتاً بسیار کم و اختلافات آنها با یکدیگر معنی دار نمی باشد. افزایش تعداد سلولهای طحالی بیش از 10^6 سلول برای هر دیسک در حضور 2×10^7 تیموسیت به افزایش کلونی ها منجر نمی شود.

رابطه مستقیم سلولها و تعداد کلونی ها نشانگر این حقیقت است که کلونی های موجود بر روی دیسک ها جدا از یکدیگر می باشند و فضای کافی برای رشد دارند. از طرف دیگر تیره شدن زمینه امکان شمارش بیشتر را محدود می کند.

تعیین غلظت بهینه LPS به عنوان میتوژن و تعداد سلول های طحالی برای تشکیل کلونی:

نتایج بررسی تعیین مناسب ترین غلظت LPS و تعداد سلولهای طحالی در کشت، در جدول شماره ۲ خلاصه شده است. در این آزمایش 1×10^6، 3×10^6 و 5×10^6 سلول طحالی برای ۵ روز در غیاب و در حضور مقادیر مختلف LPS (۲۰ µg/ml و ۱۰ ,۵) و DxS ۱۰ µg/ml به عنوان محرک کمکی (Co-mitogen) کشت داده شده اند. هر دیسک سپس برای تعداد کلونی های ASC آزمایش شد. سلولهای طحالی ، همگی پاسخ نسبتاً خوبی در غلظتهای مختلف سلولی نشان دادند بجز در غیاب و یا کمترین مقدار (LPS۵ µg/ml) تغییرات در میزان میتوژن، اثر کمی را بر روی کلونی های تولید کننده Ig موجب می شود، اگرچه، مقدار µg/ml ۱۰ و 5×10^6 به ترتیب مناسب ترین غلظت LPS و تعداد سلول می باشد (شکل ۲). همانند آزمایشات گذشته، این بررسی هم نشان می دهد که در حضور تیموسیت ها هر کدام از میتوژنهای LPS و DxS به تنهائی موجب تشکیل کلونی

جدول شماره ۴- مقایسه مقادیر مختلف LPS وDxS وتأثیر آن بر تعداد کلونی ها

LPS 10 µg/ml	LPS 25 µg/ml	DxS 10 µg/ml	DxS 25 µg/ml	Colonies N Mean ±2SD
-	-	-	-	0
+	-	-	-	82±16.8
-	+	-	-	83±14
-	-	+	-	0
-	-	-	+	0
+	-	+	-	180.5±26
+	-	-	+	182±30
-	+	+	-	179±19.6
-	+	-	+	181±16.8

این بررسی بر روی سلولهای B غدد لنفاوی موش BALB/c انجام شد.

N: تعداد (میانگین و انحراف معیار) کلونی های شمارش شده.

LPS: Lipopolysachcaride

DxS: Dextran sulfate

زیاد نمی شوند.

مقایسه رشد کلونی ها در CFUB در حضور و غیاب SRBC ، LPS و سلولهای تغذیه کننده تیموس:

در این بررسی کـه با 5×10^5 سلول غـده لنفـاوی BALB/c انجـام شـد (جـدول ۳) LPS,SRBC, نقش مـهـمی در افـزایش کلونی ها دارند. سلولهای تغذیه کننده تیموس در حـضـور LPS و SRBC افـزایشی را مـوجب نمی شوند.

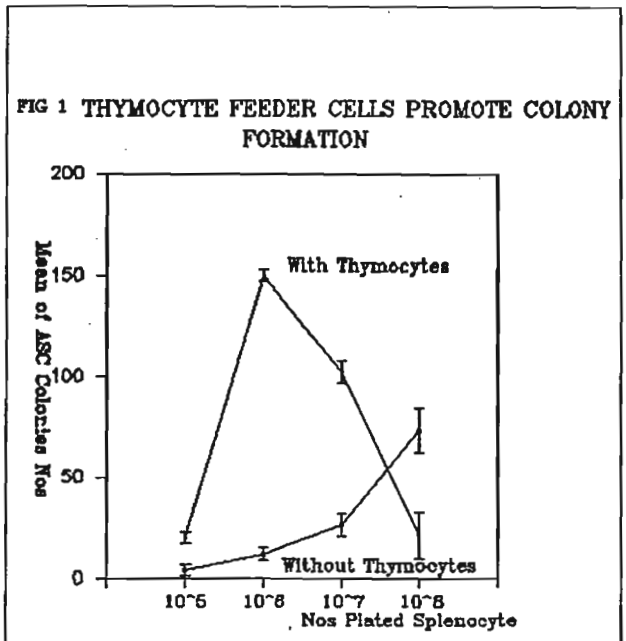
این آزمایش در غلظت سلولـی 1×10^5 نیـز انجـام شـد (اطلاعـات نشـان داده نشـده است) که در مقایسه با غلظت سلولی 5×10^5، تعداد کلونی ها بسیار کـمتر می باشد. لذا در آزمایشات بعدی از SRBC و LPS استفاده شد.

مقایسه مقادیر مختلف LPS و DxS و تأثیر آن بر تعداد کلونی ه:

در این بررسی که بر روی سلولهای B غدد لنفاوی موش BALB/c انجام شد، در مقایسه تعـداد کلونی ها به تفکیک مـیـانگین و با $p<0/05$، LPS و DxS بهـتـرین پاسخ را موجب می شوند. مقادیر بیشتر از ۱۰ µg، LPS و DxS تغییر معنی داری را در تعداد کلونی های تشکیل شـده مـوجب نمی گـردند (جـدول ۴). نکتـه دیگر تشکیل تعـدادی کلونی در پاسخ به تحـریک با LPS است در حالیکه این امر در مورد DxS صدق نمی کند.

بحث:

در تعـیـین تعـداد سلولهائی که در یک پاسخ ایمنی در قـبـال پادگن شرکت می کنند، مشکل آن است کـه نمی توان این سلولهـا را از طریق رؤیت مستقیم و یا با استفاده از روشهایی چون تشکیل روزت و یا اتصـال به پادگن شـمـارش نمود بعلاوه سیستمی که در آن بتوان از شاخص مخصوصی برای شناسایی این سلولها استفاده نمود و یا ویژگیهای ظاهری که بر اساس آن بتوا ن سلولهایی که در آینده به پادگن پاسخ خواهند داد را شناسایی نمود، وجود ندارد. اما علیرغم آنچه گفته شد، پدیده ای که می توان از آن در شناسایی این سلولها بهره جـست، تولیـد سلولهـای پیشقراول توسط این دسته از سلولهـای پاسـخگو است. تعـدادی از این سلولهـا به پلاسـمـا سل ها تبـدیل می شوند که ظرفیت تولید و ترشح مـقـادیر زیاد پادتن را پیـدا می کنند. بنابراین، وجود پادتن نشـانگر وجود کلون و آنهم به نوبه خـود نمـایانگر سلول اولیـه می باشد.

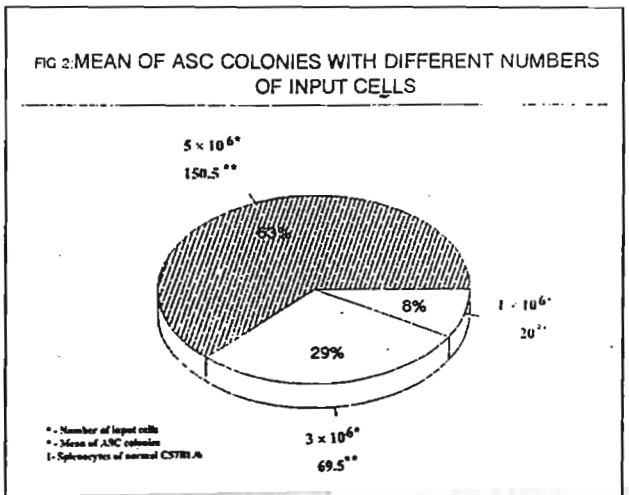


شکل شماره ۱- سلولهای تغذیه کننده تیموس، تشکیل کلونی را تقویت می کنند

بنابراین هر روشی که بتواند امکان شمارش چنین کلونی هائی را فـراهم نماید، اطلاعـاتی را در مـورد تعـداد سلولهـای B پیش سـاز کـه به پاسخگوئی تحریک شده اند در اختیار ما خواهد گـذاشت کـه از این طریق به فـراوانی آنهـا پی خواهیم برد.

به منظور درک کامل تر پاسخهای لنفوسیت B ، میتوژنهای غیراختصاصی مورد استفاده قرار گرفته اند. این مواد تکثیر و تمایز سلولی را در سطح بسیار وسیع و ظاهراً مستقل از مرحله اتصال پادگنی، القاء می نمایند. بنابراین، فعالیت ایجاد شده صرفنظر از وابستگی پادگن اختصاصی لنفوسیت ها اتفاق می افتد و این فعال شدن چند رده ای می باشد.

تکنیک کلونینگ سلولهای انتخابی B روی دیسک های صافی کاغذی امکان تجزیه و تحلیل فنوتیپ لنفوسیت های تکثیر یافته بوسیله پادگن B برای میتوژن در شرایط مشابه را فراهم آورده و یک مقایسه مستقیم بین مجموعه پادتن انتخاب شده توسط پادگن و میتوژن را ممکن می سازد.



شکل شماره ۲- میزان متوسط کلونی های ASC با تعداد متفاوت سلول ها

سیستم دیگری که برای کلونینگ سلول های لنفوسیتهای B فعال شده توسط میتوژن بکار گرفته می شود، تکنیک واحد تشکیل کلونی سلول B می باشد. در این تکنیک که آگار نیمه سخت و یا شل به منزله چارچوبی برای حمایت از لنفوسیتهای B جدا از یکدیگر بکار گرفته می شود، سلولهای B به صورت منفرد، با تشکیل سلولهای پیشقراول به صورت کلونی های جدا از یکدیگر متشکل از ۲۰۰-۵۰ سلول به تحریک میتوژنها پاسخ می دهند. زمانی که آگار حاوی گلبولهای قرمز گوسفند (SRBC) باشد، کلونی های لنفوسیت Bبه سلولهای ترشح کننده پادتن تمایز می یابند. علیرغم جدا بودن کلونی های تشکیل شده در آگار، ارتباطات سلولی به نوعی برقرار است.

تأثیر مثبت حضور تعداد مشخصی از سلولهای اشعه دیده تیموس موش صحرایی در افزایش تشکیل کلونی بر روی دیسک های صافی کاغذی کاملاً مشخص است. این سلولها با ایجاد محیط مناسب تری برای رشد کلونی های سلول B کلونی های تشکیل شده سلولهای طحالی موش را به بیش از ۱۰ برابر افزایش می دهد (جدول ۱ و شکل ۱). در تکنیک CFUB اگرچه حضور تیموسیتها در غیاب و یا حضور LPS یا SRBC نقش مشابهی با آنچه در فوق آمد بازی می کند، اما متفاوت با آنچه که در تکنیک کلونینگ بر روی دیسک های صافی کاغذی ذکر شد، در حضور میتوژنها افزایشی را موجب نمی شوند. اینکه آیا نقش تحریکی آگاروز موجود در محیط کشت در حضور میتوژنها جایگزین نقش سلولهای تیموس می شوند باید بررسی گردد. در هر دو تکنیک کلونینگ بررسی شده، تشکیل کلونی کاملاً وابسته به حضور میتوژن می باشد و در حد تعداد سلولهایی که مورد بررسی قرار می گیرند، تعداد کلونی ها با تعداد سلولها رابطه مستقیم دارد. اگرچه در تکنیک کلونینگ بر روی دیسک های صافی کاغذی در غیاب میتوژنها و حتی سلولهای تیموس، تعداد بسیار محدودی کلونی رشد می کنند، اما در CFUB مطلقاً کلونی تشکیل نمی گردد.

این تکنیک می تواند در بررسی تفاوت های کمی تولید کلونی بوسیله سلولهای B موش در پاسخ به میتوژن بکار گرفته شود. به عنوان مثال، با توجه به اینکه تحقیقات قبلی نشان داده بود سلولهای B صفاقی از موش BALB/c به شدت توسط DxS و IL-5 تحریک کمکی می شود (این موضوع در موش SJL صدق نمی کند) (۲۳)، ما ظرفیت سلولهای (Peanut agglutinin) PNA+B (۲۲) غده لنفاوی را در تولید کولونی در آگاروز شل (CFUB) بررسی کرده و با سلولهای B صفاقی BALB/c مقایسه نمودیم (۲۴).

REFERENCES:

1- Lefkovits I., Growth of antibody-producing cell clones in micro-cultures, Methods Enzymol., 1987, 150:240-51.

2- Andersson J., Coutinho A., Melchers F., and Watanable T., Growth and maturation of single clones of normal murine T and B lymphocytes in vitro. Cold spring Harb. Symp. Quant. Biol.,1977, 1:227-36.

3- Andersson J., Coutinho A., and Melchers F., The switch from IgM to IgG secretion in single mitogen-stimulated B-cell clones, *J. Exp. Med.* ,1978, 147: 1744-54.

4- Kincade P.W., Paige C.J., Parkhouse and Lee G., Characterization of murine colony-forming B cells, distribution, resistance to anti-immunoglobulin antibodies, and experssion of Ia antigens, *J.Immunol.*, 1978, 120: 1289-94.

5- Metcalf D., Wilson J.W., Shortman K., Miller, J.F.A.P., and stocker J., The nature of the cells generating B-lymphocyte colonies in vitro, *J. Cell. Physiol.*, 1976, 88: 107-16.

6-Claesson M.H., Layton J.E., and luckenbach G.A., Specific antibody-forming B-lymphocyte colonies distribution and nature of SRBC antibody-forming B-Lymphocyte colonies . Distribution and nature of SRBC antibody-forming B-lymphocyte colonies in mouse lymphomyeloid organs, Immunology, 1978, 35:397.

7- Sredni B., Gopas J. and Rozenszjan L.A., Induction of B lymphocyte colony growth in vitro by thymus-derived stimulatory factor, *Eur.J. Immunol.* ,1978, 8: 681-5.

8-Janossy G., Gomez De La Concha E., Waxdal M.J., and Platts-mills T., The effects of purified mitogenic proteins (Pa-1 and Pa-2) from Pokeweed on

human T and B lymphocytes in vitro, Clin. Exp. Immunol ,1976, 26: 108-17.

9- Anderson J.,Sjoberg O.,and Moller G., Induction of immunoglobulin and antibody synthesis in vitro by lipopolysaccarides, *Eur.J. immunol.*, 1972, 2: 349-53.

10-Coutinho A., and Moller G., Mitogenic properties of the thymus_independent antigen pmeumococal polysaccharide S3, *Eur.J. Immunol.* ,1973, 3: 608-13.

11- Dorries R., Schimpl A., and Wecker E., Action of dextran sulfate as a direct and general B cell mitogem, *Eur. J. Immunol.* , 1974, 4: 230-3.

12- Janossy G., and Greaves M., Functional analysis of murine and human B lymphocyte subsets, Transplant. Rev. ,1975, 24:177-236.

13-Fauci A.S., and Pratt K.R., Activation of human B lymphocytes. Direct plaque-forming cell assay for the measurment of polyclone activation and antigenic stimulation of human B lymphocytes, *J. Exp. Med.* ,1976, 144: 674-84.

14-Dean J.H., Silva J.S., McCoy J.L., Chan S.P., Baker J.J., leonard C., and Herberman R.B., In Vitro human reactivity to staphylococal phage lysate, *J. Immunol.* ,1975, 115: 1060-4.

15- Lipsky P.E., Staphylococal protein A, T cell-regulated polyclonal activation of human B cells, *J. immunol.* ,1980, 125: 155-62.

16- Montazeri G., Chrorazzi N., F.U., S.M., and Kunkle H.G., Regulatory role of circulating monocytes in differentiative and proliferative responses of human B lymphocytes, Clin. Immunol. Immunopathol.,1980, 16:1-10.

17- Waldmann T.A., and Broder S., Polyclonal B-Cell activators in the study of the regulation of immunoglobulin synthesis in the human system,Adv. immunol.,1982, 32:1-63.

18- Kirchner H., Tosato G., Blaese R.M., Broder S., and Magrath I., Folyclonal immunoglobulin secretion by human B lymphocytes to Epstein-Barr virus in vitro, *J. Immunol.* ,1979, 122: 1310-3.

19- Tosato G., Magrath I.T., Koski I.R., Dooley N.J., and Blaese R.M., B cell differentiation and immunoregulatory T cell function in human cord blood lymphocytes, *J. Clin. invest.* ,1980, 66: 383-8.

20- Bona C., Broder S., Dintriv A., and Waldmann T.A., polyclonal activation of human B lymphocytes by Nocardia water soluble mitogen (NWSM), Immunol.Rev. ,1979, 45:69-92.

21- Kincade P.W., Ralph P., and Morr M.A.S., *J.Exp. Med.* ,1979,143:1265.

22- Coico R.F., Bhogal B.S., and Thorbecke G.J., Relationship of germinal centers in lymphoid tissue to immunologic memory. Transfer of B cell memory with lymph node cells fractionated according to their receptors for peanut agglutinin, *J. Immunol.* ,1983, 131: 2254-7.

23- Rabinowitz J.L., Tsiagbe V.K., Nicknam M.H., and Thorbecke G.J., Germinal center cells are a major IL-5-responsive B cell population in peripheral lymph nodes engaged in the immune response, *J. Immunol.*,1990, 145:2440-7.

24- Tsiagbe V.K., Nicknam M.H., Fattah D. and Thorbecke G.J., IL-5 responsive subsets among normal and lymphomatous murine B cells, Ann. N.Y. Acad.Sci., 1992, 651:270-2.