پژوهش درپزشکی (مجله پژوهشی دانشکده پزشکی)
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی
دوره ۳۳، شماره ۳، پاییز ۱۳۸۸، صفحات ۱۴۸ تا ۱۵۵

مقاله اصلی
(Original Article)

تولید آنتی‌بادی ضد لیپوپلی‌ساکارید توسط لنفوسیت‌های B پریتونئال و طحال موش Balb/c در شرایط آزمایشگاه

دکتر وحید یاردل[۱]، دکتر نگار سید[۲]، دکتر نریمان مصفا[*۳]

[۱] دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج
[۲] انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران
[۳] گروه ایمونولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

چکیده

سابقه و هدف: *تحت گروه لنفوسیتی CD5+ B-1 در مواقع لزوم قادر به تولید آنتی‌بادی‌های طبیعی با خاصیت واکنشی متعدد بوده و اصلی‌ترین لیگاند آنها، لیپوپلی‌ساکارید (LPS) است. از آنجایی که تولید آنتی‌بادی‌ها در شرایط آزمایشگاهی و خارج از بدن موجود زنده می‌تواند کاربرد بسیاری در تکنولوژی تخلیص مواد داشته باشد، این تحقیق با هدف جداسازی، کشت و تعیین غلظت آنتی‌بادی در مایع رویی کشت این لنفوسیت‌ها انجام شد.*

روش بررسی: *این تحقیق با طراحی اکتشافی انجام گردید. با خون‌گیری مستقیم از قلب، پرفیوژن طحال و خارج‌سازی سلول‌های آن و لاواژ پریتونئال موش‌های نژاد Balb/c سلول‌ها گرفته شدند و با کمک گرادیان فایکول و ستون نایلون وول، لنفوسیت‌های B تخلیص گردیدند و در دو گروه مورد و شاهد در محیط کامل کشت سلولی توسط LPS تحریک شدند و در سه زمان ۲۴،۴۸ و ۷۲ ساعت در انکوباسیون قرار گرفتند. مایع رویی کشت به منظور اندازه‌گیری غلظت IgM با تکنیک الایزا سنجیده و فعالیت حیاتی و قدرت تکثیر توسط آزمون MTT بررسی شد. بررسی‌های ایمونوفنوتایپینگ برای تایید خلوص سلول‌ها به کمک مارکر CD3 و CD5 صورت پذیرفت.*

یافته‌ها: *کشت ۲۴ ساعته لنفوسیت‌ها در دو ارگان طحال و پریتوئن، بالاترین فعالیت ترشحی IgM را داشتند که اختلاف معنی‌داری را با گروه‌های شاهد نشان دادند. در بررسی ایمونوفنوتایپینگ، لنفوسیت‌های B تخلیص شده از پریتوئن در مقایسه با طحال و خون، درصد بالاتری از مارکر CD5 را نشان دادند.*

نتیجه‌گیری: *سلول‌های پریتوئن و طحال منبع بسیار خوبی برای تهیه IgM با اختصاصیت متعدد در شرایط داخل لوله‌ای آزمایشگاهی می‌باشند. تخلیص این سلول‌ها و فراهم نمودن شرایط مناسب کشت سلولی می‌تواند راهگشای انجام مطالعات جامع‌تری باشد.*

واژگان کلیدی: *لنفوسیت B-1، محرک لیپوپلی‌ساکارید، IgM با اختصاصیت متعدد، طحال، پریتوئن، موش Balb/c.*

مقدمه

تحت گروه‌های لنفوسیت‌های B از حیث استقرار آناتومیک با یکدیگر متفاوتند، به طوری که به دو زیرگروه B-1 و B-2 متمایز می‌شوند (۱).

تحت گروه B-2 (Conventional B cell) همان لنفوسیت‌های مرسوم و معمول در تولید و ترشح آنتی‌بادی با خصوصیات متنوع و کلاس‌های مختلف است (۲). از خصوصیات این سلول‌ها می‌توان به میل ترکیبی بالا با آنتی‌ژن‌ها و بروز هم‌زمان IgM و IgD، دارا بودن گنجینه متنوعی از ژن‌های V، الحاق فراوان‌تر به قطعات سازنده IgM و قدرت بالا در بازآرایی ژن‌های زنجیره سبک و سنگین آنتی‌بادی اشاره نمود. هم‌چنین این نکته قابل ذکر است که از نظر انتوژنی بعد از

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، گروه ایمونولوژی، دکتر نریمان مصفا
(**e-mail:** mosaffan@sbmu.ac.ir)

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۲/۲۲
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۸/۸/۲۵

تولد، این سلول‌ها از مغز استخوان منشا می‌گیرند و اغلب $CD5^-$ هستند (۳)، درحالی که تحت گروه B-1 خصوصیات منحصر به فرد در بلوغ و بیان ژن IgM دارند و از نظر انتوژنی برخلاف B-2 در کبد جنین تولید می‌شوند. لنفوسیت‌های B-1 بر خلاف لنفوسیت‌های B-2 خاصیت خودبازسازی (Renewal) در محوطه‌های خاص بدن همچون صفاق را دارند. هم‌چنین می‌توان به نداشتن چرخش ایزوتایپی (Isotype switching) آنها اشاره نمود (۴). شایان ذکر است که B-1 سل‌ها قادر به تولید کلاس IgM آن هم به صورت چندواکنشی (Polyreactive) و با اختصاصیت متعدد (Polyspecific) می‌باشند (۵،۳). از نظر محل لانه‌گزینی B-1 سل‌ها به طور عمده در محوطه‌های سروزی بدن همچون دیافراگم، پلور، مدیاستن، پریکارد و پریتوئن و در سطح کمتری در خون و طحال یافت می‌شوند (۶).

از نظر پاسخ به آنتی‌ژن، B-1 سل‌ها به ساختارهای کربوهیدراتی بخصوص پلی‌ساکاریدی بیشترین تمایل را دارند و میل آنها به آنتی‌ژن‌های پروتئینی هنوز مورد تردید است. در حالی که B-2 سل‌ها دقیقا خاصیت عکس این مورد را داشته و بیشترین پاسخ‌شان به آنتی‌ژن‌های پروتئینی است. B-1 سل‌ها برعکس B-2 سل‌ها جهت عرضه آنتی‌ژن به لنفوسیت‌های T کمک‌کننده شناخته شده نمی‌باشند. B-1 سل‌ها خود به دو تحت گروه B-1a و B-1b تقسیم می‌شوند (۷،۵،۱). B-1a با عرضه مارکر CD5 همان سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی IgM فعال هستند (۸) که به لنفوسیت‌های تولیدکننده آنتی‌بادی‌های طبیعی در مقابل تحریک فلور طبیعی روده نیز شهرت دارند. هم‌چنین این آنتی‌بادی در سرم موش‌های غیرایمونیزه بخش عمده‌ای از IgM با افینتی پایین را تشکیل می‌دهد. این سلول‌ها در نقاطی به نام لکه سفید یا Milk Spot در حفرات بطنی بدن از جمله پریتوئن جایگزین و تجمع می‌یابند و قادرند از لابه‌لای منافذ موجود در لایه محافظ امنتوم به سایر بخش‌های صفاق و حتی جریان خون و لنف ناحیه گردش نمایند. در این مناطق، B-1bها نیز جای می‌گیرند اما برخلاف B-1a خاصیت تحول عملکردی و مورفولوژیک دارند و از آنها نوعی سلول‌های مشابه ماکروفاژ مشتق می‌شود. این سلول‌ها در طول تمایز، خواص فاگوسیتیک یافته و با از دست دادن مارکر CD5 فنوتیپ mac-1 را عرضه می‌کنند (۳). در روند تکثیر و تمایز جمعیت B-1 حضور سایتوکاین IL-5 اهمیت ویژه‌ای داشته، به طوری که در استقرار آناتومیک و خاصیت خود تکثیری این سلول‌ها نقش مهمی را داراست (۹).

با توجه به اینکه روش مرسوم برای تولید آنتی‌بادی‌های با اختصاصیت متعدد (پلی‌کلونال و پلی‌اسپسفیک) تزریق آنتی‌ژن‌ها به حیوان آزمایشگاهی و اخذ سرم به منظور تهیه فرآورده فوق است، می‌تواند مشکلاتی را در روند تولید (از جمله دفعات تزریق و ایمنی‌زایی) به همراه داشته باشد. لذا تلاش برای امکان دستیابی به روشی که در شرایط آزمایشگاهی و کشت، قادر به تهیه آنتی‌بادی‌ها به کمک منابع لنفوسیتی باشد، بسیار ایده‌آل است. در مقابل آنتی‌ژن‌های غیرپروتئینی که ساختار پلی‌ساکاریدی و لیپوپلی‌ساکاریدی داشته باشند، نیازی به انجام مراحل تولید در بدن حیوان نمی‌باشد و روش کشت سلولی می‌تواند علاوه بر حذف موارد اخلاقی کار با حیوان تولید کننده آنتی‌بادی، شرایط هماهنگ و مناسبی را برای اخذ مقادیر بالاتری از IgM به دست آورد.

هدف از انجام این تحقیق، ارزیابی توان تولید IgM با اختصاصیت متعدد بر علیه LPS در شرایط کشت آزمایشگاهی لنفوسیت‌های مزبور بود و غلظت تولید شده آن در شرایط مختلف از حیث زمان و منبع اخذ سلول شامل خون، طحال و محوطه پریتوئن به منظور دستیابی به منبع ایده‌آل این سلول مقایسه شد .

مواد و روشها

۱۲ موش ماده ۸-۶ هفته نژاد خالص Balb/c تهیه شده از انستیتو پاستور ایران در شرایطی منطبق بر اصول NIH (۱۰) نگهداری شدند. به منظور اخذ نمونه، حیوانات با در نظر گرفتن اصول انسانی کشته شدند و سپس در شرایط کاملا استریل اقدام به خروج خون بطنی و نیز برداشت طحال شد. نمونه‌های پریتوئن به صورت مستقل از حیوانات دیگر تهیه گردید. ۶ حیوان برای قلب و طحال و ۶ حیوان برای لاواژ پریتونئال انتخاب شدند.

بلافاصله پس از خروج طحال، به کمک سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری و با سر سوزن ۲۵، با عمل مداوم جریان محیط RPMI 1640 (Sigma) یا پرفیوژن، اقدام به خروج محتویات سلولی طحال شد. این عمل ۳-۲ بار تکرار شد. سوسپانسیون حاصله پس از سانتریفیوژ حاوی سلول‌های طحال بود (۱۱).

بعد از باز کردن پوست شکم، با استفاده از محلول RPMI 1640 سرد لاواژ پریتوئن انجام شد. بدین‌ترتیب که با استفاده از سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری و سرسوزن شماره ۱۴، محلول RPMI سرد از طریق صفاق وارد محوطه شکمی شده و بعد از

چند دقیقه خارج شد. محلول لاواژ شده حاوی سلول‌های پریتوئن بود (۱۱).

بعد از عمل قطع نخاع حیوان (Decerebration) با استفاده از سرنگ انسولین هپارینه، در حالی که قلب همچنان تپش داشت، وارد بطن شده و خون درون قلب کشیده شد. با این روش در حدود ۲-۱/۵ میلی‌لیتر خون به دست آمد. خون بعد از رقیق‌سازی روی ستون فایکول (بهارافشان) قرار گرفت تا سلول‌های تک‌هسته‌ای آن جدا گردد (۱۱).

جهت جداسازی سلول‌های چسبنده یا همان جمعیت ماکروفاژی حاضر، سوسپانسیون‌های سلولی حاصله از ارگان‌ها به داخل فلاسک‌های کشت (Technogen) منتقل شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO_2 دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سلول‌های چسبنده در این مدت به بستر فلاسک چسبیده و سلول‌های شناور که همان لنفوسیت‌ها هستند در مایع رویی قرار گرفتند و بعد از اتمام انکوباسیون توسط پی‌پت پاستور خارج گردیدند. سپس این سلول‌ها جهت جداسازی گلبول‌های قرمز بر روی گرادیان غلظتی فایکول (بهار افشان) قرار گرفتند (۱۱).

جهت جداسازی لنفوسیت‌های B و T از تکنیک نایلون وول (SO-FIL-02) بهره‌گیری شد و لنفوسیت‌های B و T از هم تفکیک شدند. پس از پوش دادن نایلون وول، ۰/۲ -۰/۱ گرم از آن وارد سرنگ‌های ۵ میلی‌لیتر گردید و سرنگ با RPMI 1640 پر شد و در دستگاه بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گرادی قرار گرفت. سپس سلول‌های شناور وارد سرنگ نایلون وول شده و به مدت نیم ساعت در بن‌ماری۳۷ درجه سانتی‌گرادی قرار گرفتند. محتویات سلولی سرنگ تخلیه شد و توسط RPMI گرم به میزان کافی شستشو داده شدند. بدین صورت لنفوسیت‌های T خارج و با RPMI سرد شستشو داده شدند. این شوک سرمایی سبب آزادسازی لنفوسیت‌های B گردید. در مورد جداسازی لنفوسیت‌ها از خون، این نکته قابل ذکر است که ابتدا خون اخذ شده از بطن راست قلب به نسبت یک به دو با RPMI 1640 رقیق‌سازی شد و سپس بر روی فایکول قرار گرفت. با تهیه سوسپانسیون تک هسته‌ای‌ها انجام جداسازی ماکروفاژی عینا مانند طحال و پریتوئن، اجرا گردید. در ضمن به منظور سنجش IgM سرمی حیوان، حجم موردنیازی از سرم جداسازی و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گرادی نگهداری شد (۱۱).

به منظور تایید حضور مارکرهای اختصاصی و اطمینان از خلوص سلول‌های جداسازی شده از آنتی‌بادی‌های منوکلونال کونژوگه شده با فلوئورسئین ایزوتیاسیانات (FITC anti-mouse CD5 - clone: 53-7.3 - Isotype: Rat IgG2a,k) و FITC anti-mouse CD3e - clone: 145-2C11 - Isotype: Armenian Hamster IgG) استفاده گردید. لنفوسیت‌های B-1، فنوتیپ $CD3^-/CD5^+$، لنفوسیت‌های B-2، فنوتیپ $CD3^-/CD5^-$ و لنفوسیت‌های T فنوتیپ $CD3^{+-}/CD5^+$ را دارند.

برای انجام تست ایمونوفلوئورسانس، سوسپانسیون 1×10^5 سلول در لوله‌های اپندورف با ۱۰ لاندا از آنتی‌بادی کونژوگه در بافر (۱۰۰ میلی‌لیتر PBS فیلتر شده ، ۰/۱ میلی‌گرم سدیم آزاید و ۴-۱ میلی‌گرم BSA) مخصوص مخلوط و در شرایط سرما روی یخ به مدت ۲ ساعت انکوبه شده و نتایج به کمک میکروسکوپ فلوئورسانس (Nicon) رویت شدند (۱۲).

سلول‌های B پس از بررسی حیات سلولی توسط تریپان بلو و شمارش، تحت کشت با محیط کامل کشت که شامل RPMI 1640، ۱۰٪ Fetal bovin serum، پنی‌سلین-استرپتومایسین ۱۰۰ U/ml و فونگیزون ۲۵۰ ng بود (Gibco) ، قرار گرفتند. ابتدا سلول‌ها به تعداد 1×10^5 در داخل پلیت مخصوص کشت سلول (۲۴ خانه‌ای NUNC) تقسیم شدند و سپس به هریک از خانه‌های پلیت یک میلی‌لیتری از محیط کشت مغذی اضافه گردید. یادآور می‌شود جهت انجام این بررسی برای هر ارگان مربوط به یک حیوان ۳ پلیت برای سه زمان ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت در نظر گرفته شدند. سلول‌های هر سه منبع اخذ سلولی یعنی پریتوئن و طحال و خون در پلیت‌های جداگانه جای گرفتند. دو ردیف بالای هر پلیت به عنوان نمونه‌های کنترل و دو ردیف پایینی به عنوان نمونه‌های مورد در نظر گرفته شد. این عمل به منظور افزایش اطمینان از امکان خطا در طول کشت سلول انجام پذیرفت. در ضمن شرایط کشت دوتایی (Duplicate) رعایت گردید. به نمونه‌های مورد، LPS (Sigma) به میزان ۵۰ μg/ml اضافه گردید. در حالی که نمونه‌های کنترل فاقد LPS بودند. سپس تحت انکوباتور CO_2 دار، در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و جریان ۵ درصد CO_2 قرار گرفتند. بعد از اتمام انکوباسیون به مدت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، پلیت سانتریفیوژ شده و مایع رویی آن جهت اندازه‌گیری میزان IgM برداشت گردید (۱۲).

در شرایطی مشابه قبل، پس از خاتمه هر انکوباسیون زمانی سلول‌ها به صورت دوپلیکیت به پلیت‌های کشت ۹۶ خانه‌ای منتقل شدند. سلول‌های مربوط به طحال، پریتوئن و خون به صورت جداگانه در چاهک‌های مشخص شده جای گرفتند. به منظور انجام آزمون MTT، نیاز به MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-y1]-2,5-diphenyltetrazolium

bromide) بود تا $۱×۱۰^{۴}$ سلول در هر گوده از میکروپلیت قرار داده شود.

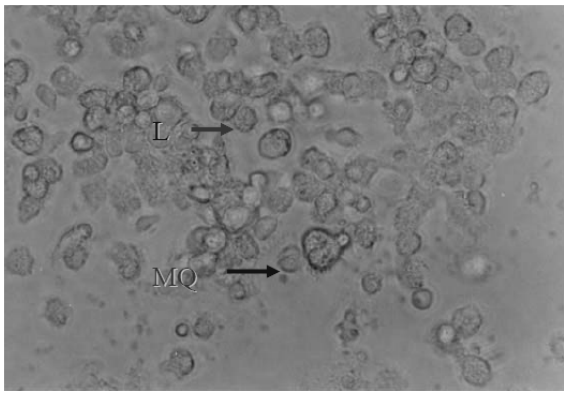
برای رقیق‌سازی MTT (Sigma)، به ازای هر ۱۰ میکرولیتر محلول MTT، ۹۰ میکرولیتر RPMI 1640 به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. برای توقف واکنش از الکل ایزوپروپانول اسیدی (Merck) و ترکیب DMSO (Merck) با اتیلیک الکل استفاده شد. بدین ترتیب که به تکرار دوتایی (Duplicate) اول ایزوپروپانول و به تکرار دوتایی دوم DMSO اضافه شد و در طول موج ۵۷۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر (CECIL2021) قرائت گردید. این عمل و استفاده از دو حلال به منظور افزایش ضریب اطمینان از نتایج صورت پذیرفت. در ضمن پس از خاتمه انکوباسیون وضعیت سلول‌ها با مشاهده بلورهای سرمه‌ای رنگ فورمازان در داخل سیتوپلاسم سلول، کنترل گردیدند (۱۲).

سطوح IgM تولیدی کشت لنفوسیت‌ها توسط الایزا مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین منظور از مایع رویی محیط کشت لنفوسیت‌ها در فواصل معینی نمونه‌برداری و پس از سانتریفیوژ در ۸۰- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بر این اساس از پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای (Microtiter) با بستر مدور (U Bottum) (NUNC) و کیت اندازه‌گیری IgM موشی (BETHYL LABORATORIES.INC) استفاده گردید. در ابتدا پلیت با آنتی‌بادی به دام اندازنده (Capture Ab) (Goat Anti – mouse IgM) پوشانیده گردید (Coating)و سپس سیستم با آنتی‌بادی کونژوگه HRP (Goat Anti- mouse IgM- HRP conjucated) تکمیل شد. همچنین با تعیین حداقل و حداکثر حساسیت کیت، نمونه‌های تحت بررسی رقیق‌سازی شدند و نمونه‌ها به صورت تکرار دوتایی در داخل پلیت جای گرفتند و طبق دستور کار کیت کلیه مراحل انجام پذیرفت. از OPD (اورتوفنیلین دی آمین) به عنوان سوبسترا و H_2SO_4 به عنوان متوقف‌کننده واکنش استفاده شد. سپس OD هریک از نمونه‌ها توسط دستگاه خواننده الایزا تمام اتوماتیک (ANTHOS 2020) در طول موج ۴۹۲ نانومتر برای OPD و ۶۲۰ نانومتر به عنوان طول موج مبدا (Refrence) خوانده شد. به کمک غلظت‌های استاندارد و ترسیم منحنی شیب غلظتی، مقادیر IgM (برحسب ng/ml) مربوط به نمونه‌ها محاسبه گردید (۱۱).

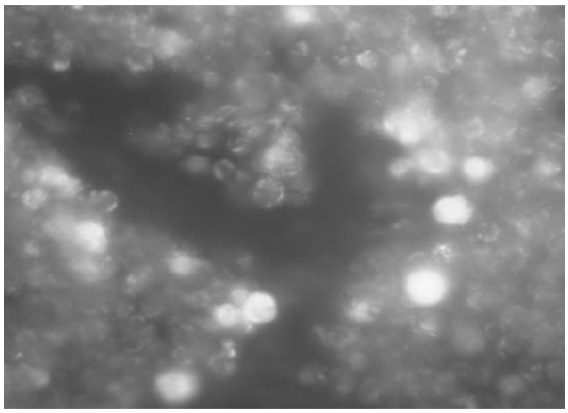
کلیه مقادیر غلظتی IgM قرائت شده توسط دستگاه و نیز OD نمونه‌ها در روش MTT، با نسخه یازدهم نرم‌افزار آماری SPSS و با آزمون t و آزمون Kruskal-Wallis تحلیل شدند. سطح معنی‌داری پایین‌تر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بیش از ۹۰ درصد سلول‌های اخذ شده از پریتوئن $CD3^-/CD5^+$ و بیشتر از ۷۰ درصد سلول‌های طحال $CD3^-/CD5^-$ بودند که بیانگر آن است که اکثریت سلول‌ها در پریتوئن از نوع B-1 و اکثریت سلول‌ها در طحال از نوع B-2 بوده و تنها حدود ۳۰ درصد از سلول‌های طحال مارکر $CD3^-/CD5^+$ که مارکر B-1 سل‌ها می‌باشد را بروز دادند (شکل ۱ و ۲). همان‌گونه که در جدول ۱ آمده است، لنفوسیت‌های خون تعداد بسیار ناچیزی از مارکر $CD3^-/CD5^+$ (کمتر از ۵ درصد) را بروز دادند. سلول‌های پریتوئن پس از خالص‌سازی از ستون نایلون‌وول بالاترین خلوص را داشته و لنفوسیت‌های نهایی از مجموعه تخلیص شده سلولی از نظر مارکرهای T cell بالاترین نشانه‌ها را نشان دادند.



شکل ۱- نمایی از سلول‌های لاواژ شده از پریتوئن.
ماکروفاژهای چسبنده و لنفوسیت‌ها به خوبی در تصویر مشهود می‌باشند.
(L: لنفوسیت – MQ: ماکروفاژ)



شکل ۲- لنفوسیت‌های B تخلیص شده. اینها در طول مراحل جداسازی، مارکر CD5 را به خوبی بیان کردند.

جدول ۱- چگونگی عرضه مارکرهای لنفوسیتی اختصاصی.

	B سل پریتوئن	B سل طحال	B سل خون	T سل در هرسه گروه
CD3	۵> درصد	۵> درصد	۵> درصد	۹۰> درصد
CD5	۹۰> درصد	۳۰ درصد	۵> درصد	۹۰> درصد

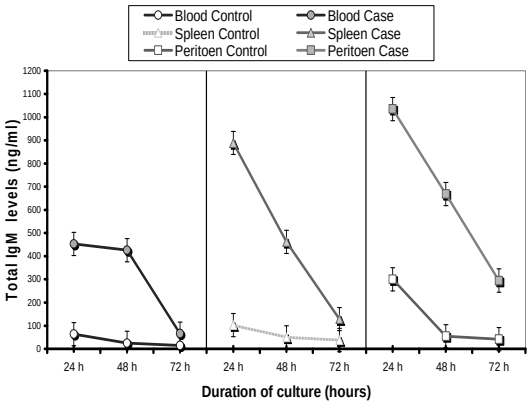
بررسی غلظت‌های به دست آمده حاکی از آن بود که نمونه‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته پریتوئن در مقایسه با نمونه‌های طحال و خون در همان زمان در هر دو گروه مورد و شاهد، میزان IgM بیشتری را تولید نمودند. (جدول ۲).

جدول ۲- اختلاف غلظت IgM (ng/ml) در مایع رویی کشت سلول‌ها برحسب منابع مختلف سلولی

	۲۴ ساعت			۴۸ ساعت			۷۲ ساعت		
	پریتوئن	طحال	خون	پریتوئن	طحال	خون	پریتوئن	طحال	خون
شاهد $(LPS)^-$	۳۰۰/۳	۱۰۲/۴	۶۳/۷	۵۴/۵	۴۹/۵	۲۵/۴	۴۱/۸	۳۸/۲	۱۵/۲
مورد $(LPS)^+$	۱۰۳۵	۸۸۸/۸	۴۵۳	۶۶۸/۴	۴۶۱/۹	۴۲۵/۸	۲۹۴/۷	۱۲۹	۶۶

هم‌چنین مقایسه نمونه‌های پریتوئن و طحال و خون در سه زمان خودشان، نیز همین نتیجه را در برداشت. میانگین IgM تولیدی در کنترل پریتوئن، که بیانگر تولید IgM خودبخودی و طبیعی می‌باشد، در مقایسه با شاهدهای دو منبع طحال و خون در هر سه زمان بیشتر بود. هم‌چنین میانگین نمونه‌های تحریک شده با LPS در پریتوئن از دو منبع طحال و خون در هر سه زمان بیشتر بود. اما در زمان ۴۸ ساعت میزان IgM تولیدی در هر دو گروه مورد و شاهد و در هر سه منبع کاهش چشم‌گیری را در مقایسه با زمان ۲۴ ساعت داشت. در زمان ۷۲ ساعت نیز همانند زمان ۴۸ ساعت، میزان IgM تولیدی در هر دو گروه مورد و شاهد و در هر سه منبع کاهش چشم‌گیری نسبت به زمان ۲۴ و ۴۸ ساعت داشت. اختلاف آماری معنی‌داری بین مقادیر غلظتی IgM لنفوسیت‌های B مشاهده گردید، به طوری که این تفاوت معنی‌دار بین دو گروه شاهد و مورد نیز مشهود است. نمودار ۱ با مقایسه غلظت‌های IgM مایع رویی کشت سلول‌ها موید این مطلب است. علاوه بر آن نمونه‌های شاهد و مورد هر سه منبع با هم تفاوت معنی‌داری را نشان دادند ($p<۰/۰۰۱$).

در بررسی نمونه‌های شاهد و مورد خون، آزمون Kruskal-Wallis در سه زمان نشان داد که میزان IgM در نمونه‌های شاهد خون کمتر از طحال و طحال کمتر از پریتوئن می‌باشد ($p<۰/۰۵$). در زمان ۴۸ ساعت در پریتوئن میزان IgM نسبت به زمان ۲۴ ساعت کاهش چشمگیری داشت. در زمان ۷۲ ساعت افت بیشتری از IgM نسبت به زمان ۴۸ ساعت و در مقایسه با نمونه طحال وجود داشت. با وجودی که نمونه‌های مربوط به پلاسما غلظت بالایی از IgM را نشان دادند، لنفوسیت‌های خون پس از شروع پروسه کشت غلظت پایین‌تری از IgM را در مقایسه با پلاسما تولید نمودند. نمودار ۱ تفاوت آشکاری از مقادیر حاصل از سطوح غلظتی IgM مایع رویی کشت در زمان‌های مختلف انکوباسیون را بیان می‌کند که این تفاوت در مورد پریتوئن و طحال کاملا محسوس می‌باشد. همانطور که مشاهده می‌شود، تولید خودبخود و خودانگیز IgM توسط لنفوسیت‌های B-1 در هر سه مورد قابل توجه است که این موضوع در مورد پریتوئن چشمگیرتر می‌باشد.



نمودار ۱- غلظت‌های مختلف IgM اخذ شده از منابع مختلف کشت سلول‌های B-1 براساس طول مدت انکوباسیون.

لنفوسیت‌های B-1 پریتوئن در مقایسه با B سل‌های طحال از خاصیت تکثیر و ماندگاری کمتری برخوردار بودند. میزان تکثیر سلولی در هر دو گروه شاهد و مورد پریتوئن و طحال با افزایش زمان کاهش داشت. همچنین میزان تکثیر سلولی در دو گروه شاهد و مورد طحال در هر سه زمان در مقایسه با پریتوئن بیشتر بود. سلول‌های لنفوسیتی خون از همان ابتدا از قدرت و فعالیت بسیار کمی برخوردار بودند که قابل ثبت نبود (جدول ۳).

جدول ۳- نتایج حاصل از آزمون تکثیر لنفوسیتی به روش M.T.T (براساس طول موج ۵۷۰ نانومتر).

	اتانول + DMSO			الکل ایزوپروپانول اسیدی		
	۲۴*	۴۸	۷۲	۲۴	۴۸	۷۲
پریتوئن						
شاهد	۰/۱۵۹	۰/۱۱۲۵	۰/۰۲۲۵	۰/۱۱۰	۰/۰۴۱۵	۰/۰۲۴
مورد	۰/۲۵۸	۰/۱۲۶۵	۰/۱۲۱	۰/۱۳۷	۰/۱۱	۰/۰۳۹
طحال						
شاهد	۰/۲۷۹۲	۰/۲۰۳۵	۰/۱۶	۰/۳۰۷	۰/۰۷۶۳	۰/۰۱۱۳
مورد	۱/۳۳۹۵	۰/۲۶۸	۰/۱۹۰	۰/۳۲۱	۰/۰۸۱۵	۰/۰۱۱۹

* زمان انکوباسیون (ساعت)

بحث

سلول‌های B-1 با فنوتیپ و مشخصه‌های عملکردی متفاوت، جمعیت متمایزی از لنفوسیت‌های B را تشکیل می‌دهند. این سلول‌ها که در حفرات سروزی بدن جای می‌گیرند برخلاف مسیر هدایت ایمنی از طریق اختصاصی، با تولید IgM با اختصاصیت متعدد به فعالیت برعلیه اجرامی که با غلظت بالاتر از حد دفاع اکتسابی، بدن را مورد حمله قرار می‌دهند می‌پردازند (۱۳،۶). برای افزایش اعتبار این پژوهش، ما B-1 سل‌های پریتوئن و طحال موش‌های طبیعی را جداسازی نموده و توسط روش ایمونوفنوتایپینگ به کمک آنتی‌بادی منوکلونال کونژوگه با FITC (فلوئورسین ایزوتیوسیانات) از نظر وجود مارکر CD3 و CD5 مورد ارزیابی قرار دادیم. مطالعات انجام شده نشان داده که جمعیت اصلی لنفوسیتی پریتوئن را B-1 سل‌ها تشکیل می‌دهند. طحال با وجود در برداشتن این زیرمجموعه در منطقه مارژینال، حاوی مقادیر دیگری از B-2 سل‌ها در فولیکول‌های لنفاوی می‌باشد (۱۵،۱۴).

نتایج این تحقیق نشان داد که تولید آنتی‌بادی IgM در برابر لیپوپلی‌ساکارید در شرایط آزمایشگاهی توسط لنفوسیت‌های B پریتوئن و طحال قابل توجه می‌باشد. لنفوسیت‌های B در گردش خون پاسخ ناچیزی را در محیط کشت در مقابل محرک LPS بروز دادند و این یافته با سایر پژوهش‌های مرتبط همخوانی دارد (۶،۱).

مطالعات نشان داده جمعیت B-1 در مقادیر غلظتی ۵۰-۱۰ میکروگرم LPS توان پاسخدهی و تولید آنتی‌بادی دارند. در حالی که لنفوسیت‌های B-2 به غلظت ناچیزی تا ۱۰۰ نانوگرم توان پاسخدهی دارند (۱۶). از این یافته در تحقیق فوق استفاده شایانی گردید. چراکه از آنجایی که قادر به جداسازی B-1 و B-2 سل‌های طحال نبودیم، با استفاده از این یافته سعی در تحریک B-1 سل‌های طحال نمودیم. هم‌چنین از آنجایی که B-1 سل‌های طحال از حیث مارکر CD5 ضعیف‌تر از B-1 سل‌های پریتوئن می‌باشند، توان بالای B-1 سل‌های پریتوئن در تولید IgM طبیعی قابل توجیه می‌باشد (۱۴). بقا و عملکرد B-1 سل‌های طحال فقط در صورت تحریک با عوامل محیطی از جمله لیگاندهای کربوهیدراتی و لیپوپلی‌ساکاریدی است (۱۷). آنها به شدت IgM طبیعی در مقابل این آنتی‌ژن‌ها می‌سازند و در مقابل آن تکثیر می‌شوند، اما B-1 سل‌های پریتوئن به طور خودبخود بدون نیاز به LPS دچار self renewal می‌شوند و اصلا به محرک خاصی وابسته نمی‌باشند و به طور خودبخود خیلی بیشتر از B-1 سل‌های طحال IgM می‌سازند (۱۸،۱۴) که این مورد در نمونه‌های شاهد پریتوئن تحقیق حاضر صدق می‌کند.

لنفوسیت‌های B-1 پریتونئال در مقایسه با جمعیت B-2 مدت زمان طولانی‌تری را در محیط کشت آزمایشگاهی به صورت زنده و فعال سپری می‌کنند (۱۴). ما نیز در طول مدت کشت آنها، شاهد زنده ماندن طولانی‌تر آنها در خاتمه ۷۲ ساعت و حتی پس از ۹۶ ساعت بودیم.

یافته‌های ما در رابطه با قدرت حیات سلول‌ها در مقایسه با شاهدها بسیار چشمگیر بود، هرچند تولید خودبخود IgM توسط گروه شاهد نیز قابل توجه بود. سلول می‌تواند تولیدات خود را با توجه به روند قبل از کشت ادامه دهد، ولی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با نمونه‌های تحریک شده داشته باشد.

در ۴۸ ساعت بعدی، قدرت حیاتی و تکثیر کاهش یافته ولی هنوز پابرجاست. موارد شاهد نیز چنین می‌باشند و کماکان شاهد ادامه قدرت حیاتی و تکثیر آنها تا پایان سه روز هستیم که با یافته‌های مطالعه جوزف تدمانگ و همکاران مطابقت دارد (۱۴). با وجودی که آنان از روش‌های بسیار تخصصی برای اثبات این پدیده بهره جستند، ولیکن ما نیز با تکنیک M.T.T تفاوت لنفوسیت‌های B پریتونئال را به اثبات رساندیم. اهمیت وجود محرک در سومین روز کشت برای سلول‌های پریتوئن آن هم به دلیل افت حیات گروه شاهد به اثبات رسید. یکی از نکات بارز در مشاهده یافته‌های این تحقیق، کاهش قدرت حیات سلول‌ها یا افت شدید تکثیر در نمونه‌های ۴۸ ساعته می‌باشد. خصوصا در شرایطی که تولید IgM در ۲۴ ساعت اول به وفور به وقوع پیوسته است. اثر Feedback Regulation در تجربیات سایر دانشمندان به اثبات رسیده است. ما نیز مشاهده کردیم که در صورت افزایش IgM در مایع رویی کشت، در مرحله بعد، تعداد سلول‌ها کاهش بسیاری می‌یابند. در حقیقت تولید IgM خود موجب سرکوب فعالیت لنفوسیت‌های B-1 می‌گردد تا بعد از آن شرایط برای

پاسخ گروه B-2 در مقابل آنتی‌ژن‌های وابسته به T فراهم گردد.

می‌توان غلظت بالای IgM تولید شده در کشت سلول‌های B طحالی را به لنفوسیت‌های B-2 نسبت داد (۱۹). ما قادر به تفکیک لنفوسیت‌های B-1 و B-2 از مجموعه سلولی اخذ شده نبودیم، زیرا نیاز به یک سیستم دقیق سورتینگ به کمک آنتی‌بادی‌های منوکلونال به روش فلوسایتومتری داشتیم.

می‌توان حضور غلظت بالای IgM در کشت سلول‌های طحال را ناشی از دو پدیده دانست: اول اینکه سلول‌های B-2 در محیط کشت در پاسخ به FBS محیط نیز دچار تکثیر و تولید IgM می‌گردند. با وجودی که ماده FBS، برای تکمیل بخش‌های پروتئینی محیط کشت لازم و ضروری است، شاید کاستن از غلظت آن بتواند سلول‌های B-2 را در حداقل فعالیت تحریکی قرار دهد (۱۴). در اینجا نیاز به استفاده از محیط‌های کشت غنی ولی عاری از سرم مورد تایید قرار می‌گیرد. دوم اینکه لنفوسیت‌های B-1 طحالی با وجودی که با غلظت استاندارد و مناسب LPS در تماس بودند (۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت) در مقایسه با جمعیت B-1 پریتوئن به تعداد کمتری حضور داشتند. سعی ما رعایت دقیق اصول شمارش سلول و امید ما قدرت پاسخدهی سلول به LPS بود. ولی در نظر داشته باشیم که لنفوسیت‌های طحالی، با وجود قدرت بقا کمتر از B-1 سل‌های پریتوئن، توان بیشتری در تولید IgM داشتند. یافته‌ها نشان می‌دهد که IgM سازی سلول‌های پریتوئن حتی در وضعیت بدون محرک نیز بالا بوده است. ما شاهد این قدرت در سلول‌های طحال هم هستیم. با وجود ناخالصی لنفوسیت‌های B طحال، آنقدرها که انتظار داشتیم توان IgM سازی لنفوسیت‌های طحالی، تفاوت بسیار زیادی با لنفوسیت‌های پریتوئن نداشت. در ابعاد دیگر تحقیق یعنی ارزیابی توان حیاتی لنفوسیت‌های طحال، علت بالا بودن نسبی قدرت حیاتی لنفوسیت‌های طحال، حضور توام هر دو گروه B-1 و B-2 در مجموعه لنفوسیت‌های طحال بود. می‌دانیم که B-2 طحال قدرت حیاتی بالاتری نسبت به B-1 طحال دارد.

اشکال بزرگ در این بررسی عدم جداسازی لنفوسیت‌های B-1 و B-2 طحال بود که هزینه هنگفتی را در برمی‌داشت. ولی باز هم تفاوت آشکاری را در مجموعه B سل‌های طحال و پریتوئن داشتیم.

در اینجا این نکته را مجددا یادآوری می‌کنیم، که تولید IgM طحال توسط محرک LPS با توجه به دوز بالای LPS (mg/ml ۵۰) خاص تحریک B-1 سل‌های طحال است (۱۶). ما فقط توانستیم در این بخش، به تحریک انتخابی B-1 سل‌های طحالی دست یابیم. اگر مترصد تحریک B-2 سل‌ها بودیم، باید دوز LPS را کاهش می‌دادیم که در آن صورت لنفوسیت‌های B-1 قادر به تولید IgM با اختصاصیت متعدد نبودند.

قدردانی و تشکر

از همکاری و مساعدت همیشگی محقق ارجمند، سرکار خانم دکتر مژگان بنده‌پور در برخی از مراحل انجام تحقیق در آزمایشگاه مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

1. Abbas AK, Lichman AH, Pillai S, eds. Cellular and molecular immunology. 6th edition. New York: W.B Saunders company; 2005.p. 28-175.
2. Montercion-Rodriguez E, Leathers H, Dorshkind K. Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. Nature Immunol 2006;7: 233-44.
3. Stall AM, Wells SM, Lam KP. B-1 cells: unique origin and functions. J Seminars Immunol 1996; 18: 45-59.
4. Ohdan H, Swenson KG, Huw S, Gray K, Yang YG, Xu Y, et al. Mac-1 negative B-1b phenotype of natural antibody producting cells, including those responding to Gal 1,3 epitopes in α 1,3-Galactosyltransferase deficient mice. J Immunol 2000; 165: 5518-29.
5. Takashashi K. Development and differentiation of macrophages and related cells: historical review and current concept. J Clin Exp Hematopathol 2000; 41: 451-64.
6. Honjo T, Ferederick W, Neuberger M. Molecular biology of B cells. 1st edition. Boston: Elsevier academic press; 2004. p.118-212.
7. Tung JW, Parks DR, Moore WA, Herzenberg LH, Herzenberg LA. Identification of B- cell subsets. Methods Mol Biol 2004271 [B cell Protocols]. 2004.
8. Youinou P, Jamin C, Lydyard PM. CD5 expression in human B-cell populations. Immunol Today 2000; 20: 312-16.
9. Gonmoon B, Takaki S, Miyake K, Takatsu K. The role of IL-5 for mature B-1 cells in homeostatic prolifration, cell servival, and Ig production. J Immunol 2004; 172: 6020-29.

10. Research Ethics: Laboratory Animal Care and Use. Offer Labrotory and welfare (OLAW). Available from: http://bioethics.od.nih.gov/animals.html

11. Fernandez-Botran R, Editor. Methods in cellular immunology. 2nd edition. Philadelphia: CRC; 2002.

12. Kaufmann SHE, Kabelitz D, Editors. Methods in microbiology. 2nd edition. Kiel: Institute of Immunology, University of Kiel; 2002. p. 23-85.

13. Kawahara T, Ohdan H, Zhao G, Yang YG, Sykes M. Peritoneal Cavity B cells are precursors of splenic IgM natural antibody – producing cells. J Immunol 2003, 171:5406-5414.

14. Tumang JR, Hastings WD, Bai C, Rothstein TL. Peritoneal and splenic B-1 cells are separable by phenotypeic, Functional, and transcriptomic characteristics. J Immunol 2004; 34: 2158-67.

15. Hayakawa K, Richard R, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 2494.

16. Julia P, editor. B-1 and B-2 B cell responses to lipopolysaccaride: putative roles in the pathogenesis of periodontis. Sidney: University of Sydney, Institute of Dental Research; 2003.

17. Wardemann H, Boehm T, Dear N, Carsetti R. B-1a B cells that link the innate and adaptive immune responses are lacking in the absence of the spleen. J Exp Med 2002; 195: 771-80.

18. Boes M, Esau C, Fischer MB, Schmidt T, Carroll M, Chen J. Enhanced B-1 cell development, but impaired IgG antibody responses in mice deficient in secreted IgM. J Immunol 1998; 160: 4776-87.

19. Hsueh RC, Roach TIA, Lin KM, O'Connell TD, Han H, Yan Z, Eds. Purification and characterization of mouse splenic B Lymphocytes. AFCS Research Reports. Texas: University of Texas Southwestern Medical Center; 2002.