فصل اول

مقدمه

مقدمه

آنتی‌بادیهای مونوکلونال از زمان توصیف در سال ۱۹۷۵ تا امروز در عرصه‌های مختلف بیولوژی و پزشکی تحول ایجاد کرده‌اند. این آنتی‌بادیها دارای ویژگی بالائی بوده، لذا می توان از این معرفهای بیولوژیکی به طور وسیع در زمینه‌های مختلف تحقیقاتی، تشخیصی و درمانی استفاده نمود.

آنتی‌بادیهای مونوکلونال، آنتی‌بادیهای اختصاصی هستند که به طور طبیعی یا تجربی توسط یک کلون خاص لنفوسیتی تولید می‌گردند. هم اکنون تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال موشی یکی از بهترین روشهای موجود تولید آنتی‌بادی مونوکلونال است. یک آنتی‌بادی مونوکلونال به وسیله سلولهای نامیرا حاصل از امتزاج بین سلولهای میلوما با لنفوسیت B به دست آمده از طحال موش ایمن شده تولید می-شود.

رده سلولی میلوما فاقد مسیر ضروری باز یافت[1] برای سنتز DNA است لذا این رده سلولی در اثر توقف مسیر اصلی سنتز DNA خواهد مرد، همچنین لنفوسیتهای طحالی امتزاج نیافته قادر به ادامه حیات نیستند و دچار مرگ فیزیولوژیک می‌گردند. تنها سلولی که دریک محیط انتخابی زنده می‌ماند سلول-های هیبریدوما است. هیبریدوماها خصوصیت نامیرائی و قابلیت ترشح آنتی‌بادی را از سلولهای میلوما و مسیر بازیافت سنتز DNA و ژنهای کد کننده آنتی‌بادی را از سلولهای لنفوسیت B طحال کسب می-کنند.

[1] Salvage Pathway

آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باکتریایی *Bacillus* sp.KR8104 از ۴۲۲ اسید آمینه تشکیل شده و ۴۸ کیلو دالتون جرم دارد. این آنزیم یک آنزیم ترشحی می‌باشد که توسط این سویه به فضای خارج سلولی ترشح میشود و ساختار سه بعدی این آنزیم با روش کریستالوگرافی اشعه ایکس مشخص شده‌است که ساختار آن در پایگاه PDB با شماره 3DC0 موجود می‌باشد و با توجه به ساختار سه بعدی آن این آنزیم دارای سه دومین ساختاری A,B,C می‌باشد. باقیمانده‌های اسید آمینه‌ای جایگاه فعال (Glu230, Asp249, Asp217) و نیز باقیمانده های اسید آمینه ای درگیر در اتصال کلسیم CaI (Gly313, Glu276, Glu276)، CaII (Asn104, Thr 137,Asp146, Asp146, His180) و CaIII (Gly169, Asp171, Asp171) درساختار آن حفاظت شده می‌باشند.

هدف از این مطالعه تولید سلولهای هیبریدومای ترشح کننده آنتی‌بادی موشی ضد آنزیم آلفا آمیلاز از سویه باکتریایی *Bacillus* sp.KR8104 بود تا بتوان از آن به عنوان یک معرف بیولوژیک در تشخیص این آنزیم استفاده نمود.

۱-۱. تولید آنتی‌بادیهای مونوکلونال

آنتی‌بادیهای مونوکلونال محصول یک کلون خاص از لنفوسیتهای B هستند. در طحال یک موش، میلیونها کلون از لنفوسیتها B وجود دارد که همگی آنها از سلول ریشه‌ای اولیه منشاء گرفته‌اند و هر کلون به طور مستقل توانائی تولید آنتی‌بادی علیه یک شاخص آنتی ژنی را دارا می‌باشد. هنگامی که حیوانی مانند موش را با ماده‌ای ایمونوژن تحریک می‌کنند، در بدن موش آنتی‌بادیهای مختلفی علیه شاخص‌های آنتی‌ژنی آن ماده ساخته می‌شود که هر آنتی‌بادی در واقع به وسیله یک کلون لنفوسیتی که تبدیل به پلاسماسل شده‌است، تولید می‌گردد. تحقیقات نشان داده‌است که کشت سلولهای طحال حیوان ایمن شده در محیط آزمایشگاه به دلیل عمرکوتاه پلاسماسل‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد، لذا با استفاده از یکسری تومورهای سلولهای سیستم ایمنی به نام میلوما یا پلاسماسیتوما که تکثیر سریع

داشته و امتزاج سلولهای B ایمن شده طحال با آنها سلولهائی تولید می‌گردند به نام هیبریدوما که هم رشد سریعی داشته و هم قادر به تولید مقادیر فراوانی آنتی‌بادی مونوکلونال اختصاصی می‌باشند[۱].

۱-۱-۱. تاریخچه

در سال ۱۸۹۰، آنتی‌بادی به عنوان مولکولی گلیکوپروتئینی توسط Von Behring، Kitazato کشف شد[۲].

روشهای کشت سلولی برای اولین بار توسط Harrison در سال ۱۹۰۷ شرح داده شد[۳]. در سال ۱۹۵۶ تئوری Clonal Selection توسط Burnet شرح داده‌شد[۴].

در سال ۱۹۶۰، Barski و همکارانش امتزاج خودبخودی سلولها را در محیط کشت مشاهده نمودند[۵و۶]. در سال ۱۹۶۲، Okada، Tadokora گزارش نمودند که ویروس سندائی[1] از خانواده پارامیسکوویریده یا ویروس هماگلوتینین ژاپنی[2] قادر است سلولهای امتزاج یافته را از یک حالت خودبخود که به ندرت صورت می‌پذیرد به یک حالت قابل پیش‌بینی و بسیار موثر سوق دهد[۳و۶و۷].

در سال ۱۹۶۲، Potter، Boyce تومورهای پلاسماسل را در موش به وسیله روغن معدنی القاء نمودند[۶].

در سال ۱۹۶۴، Littlefield توانست با استفاده از سلولهای جهش یافته و محیط انتخابی سلولهای هیبرید را جدا نماید[۸].

در سال ۱۹۷۰، Horibata, Harris موفق به کشت سلولهای پلاسماسیتوما در محیط کشت شدند[۹].

در سال ۱۹۷۳، Cotton, Milstein نشان‌دادند که امتزاج دو ردهٔ سلولی میلومای موشی تولیدکنندهٔ آنتی‌بادی سبب ایجاد هیبرید می‌شودکه محصولات هر دو لاین سلول مادری را بیان می‌کند[۶و۱۰].

[1] Sendai
[2] Hemaglutinin virus japaneas

در سال ۱۹۷۳، Cohen ,Schwaber نشان‌دادند که امتزاج لنفوسیتهای انسانی با سلولهای میلومای موشی سبب تولید هیبریدهائی می‌شود که ایمیونوگلوبولینهای لنفوسیت و میلوما را ترشح می‌کنند[۶].

بدین ترتیب در سال ۱۹۷۵ زمینه برای Kohler و Milstein فراهم شد تا ثابت کنندکه امتزاج سلولهای طحال موش ایمن شده با سلولهای میلومای موش سبب تولید هیبریدومای ترشح کننده آنتی‌بادیهای اختصاصی می‌گردد[۶].

کاریوتایپ سلولهای هیبریدوما چند ماه پس از رشد در محیط کشت سلولی اندکی کمتر از مجموع کروموزمهای سلولهای اولیه می‌شود[۶و۱۱].

سرانجام در سال ۱۹۸۴، Milestein ,Kohler به همراه Jerne به خاطر ارائه فن‌آوری تولید آنتی‌بادی مونوکلونال برنده جایزۀ نوبل شدند[۴].

۱-۱-۲. اساس تولید آنتی‌بادی مونوکلونال به روش امتزاج سلولی

اساس تولید آنتی‌بادی مونوکلونال بر ادغام شدن سلولهای سوماتیک استوار است.

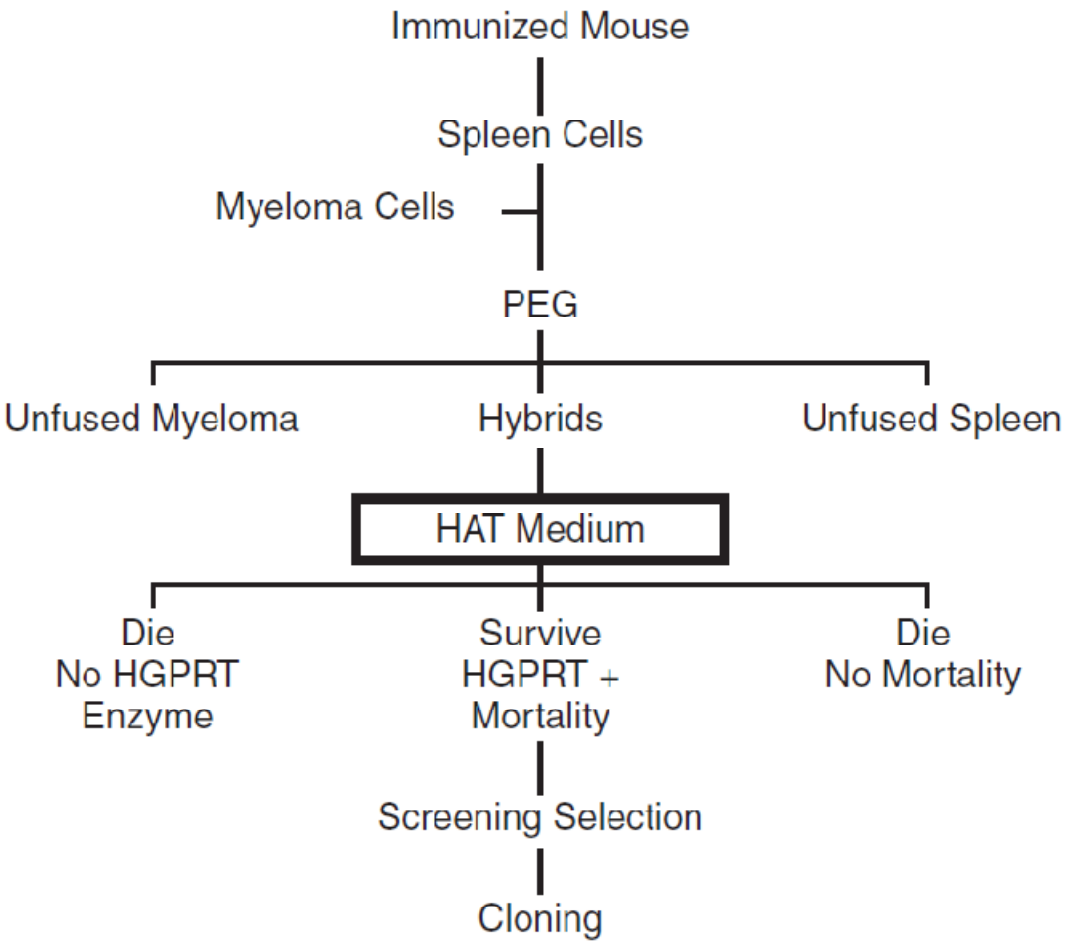
وقتی سلولها به وسیله ویروس سندائی یا پلی اتیلن گلیکول تیمار می‌شوند، غشاء آنها ادغام شده سلولهائی چند هسته‌ای به نام Heterokaryon تشکیل می‌شوند[۱۲].

در تقسیمات بعدی سلول، هسته‌ها با هم ادغام شده، سلولهای دختری مواد ژنتیکی بیشتر یا کمتری را به ارث می‌برند[۱۳].

سلولهای هیبرید به دست آمده از نظر ژنتیکی پایدار نیستند و تمایل زیادی برای از دست دادن کروموزومهایشان دارند. از دست دادن کروموزوم کاملاً تصادفی نیست و به گونه و نوع سلول بستگی دارد.

سرانجام اینکه سلولهای هیبرید پایدار تولید آنتی‌بادی مونوکلونال می‌نمایند.

آنتی‌بادی مونوکلونال تولیدی از نظر ویژگی، میل ترکیبی و ایزوتیپ کاملاً یکنواخت بوده تنها علیه یک شاخص آنتی‌ژنی می‌باشد(شکل۱-۱)[۱۴و۱۵].



شکل۱-۱ اساس تولید آنتی‌بادی مونوکلونال

۱-۱-۳. انتخاب حیوان مناسب

در اغلب موارد انتخاب گونه برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال به موش و موش صحرائی (Rat) محدود می‌شود. موفقیتهای اندکی در تولید هیبریدوما از لنفوسیتهای انسانی به دست آمده‌است [۱۶و۱۷]. معمولاً موش به دلیل سهولت، دسترسی به لاینهای مناسب میلوما و تکثیر سریع(۲۱ روز) ترجیح داده می‌شود. تمام لاینهای سلولی میلومای موش در دسترس، منشاء BALB/c دارند، به همین دلیل بیشتر محققین از موشهای BALB/c به عنوان منبعی از سلولهای طحال استفاده می‌کنند. و نژادهای دیگر موش شامل C57B1/6 , SJL , DBA/2129 , CBA-A/J , AKR , NZB می‌باشد با این توضیح که سلولهای طحال موشهای مختلف را می‌توان با میلومای گونهٔ BALB/c پیوند زد چون باهم سازگار می-باشند[۱] و در مورد موشهای صحرائی بیشتر از نژاد Lou/c استفاده می‌کنند[۱۸و۱۹].

چنانچه موش C57B1 نسبت به آنتی‌ژن حساس شود. هیبریدومای بدست آمده به وسیله همان نژاد به علت وجود آنتی‌ژنهای سازگار بافتی BALB/c پس زده‌می‌شود. چنین هیبریدومائی در نسل اول نژادهای C57B1 , BALB/c قادر به رشد خواهندبود. محققین بسیاری موفق به ایجاد هیبریدوما بین سلولهای طحالی موش صحرائی با میلومای موش شده‌اند[۲۰].

این هیبریدها نظیر هیبریدهای موش- موش پایدار هستند اما فقط قادر به رشد در محیط کشت هستند. به طور اتفاقی این هیبریدها در nud mice (موش بدون تیموس) رشد می‌کنند اما نگهداری و تکثیر چنین موشهایی بسیار مشکل است.

در مورد سن حیوان بهتر است که اولین تزریق در موش‌های ۶-۴ هفته‌ای انجام گردد چون سیستم ایمنی موش‌ها در ۶ هفته پس از تولد تکامل می‌یابد، اگر چه می‌توان از حیوانات مسن‌تر هم استفاده کرد[۱۸].

۱-۱-۴. روشهای ایمن‌سازی

اولین مرحله در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال ایمن‌سازی[1] است.

حیوانات قادر به تولید آنتی‌بادی بر علیه بسیاری از مولکولها هستند، در این رابطه دو استثناء وجود دارد:

۱- معمولاً حیوانات علیه آنتی‌ژنهای خودی آنتی‌بادی تولید نمی‌کنند.

۲- معمولاً حیوانات مولکولهای کوچک نظیر اسید آمینه را نمی‌شناسند مگر زمانی که به مولکولهای حامل متصل شوند.

برای تولید آنتی‌بادی از نوع IgG با تمایل زیاد[2]، روش ایمن‌سازی باید قادر به تحریک سلولهای T-helper باشد[۲۱].

این روش توسط آنتی‌ژنهای پروتئینی و ایمیونیزاسیون invivo امکان‌پذیر است.

روشهای متعددی برای ایمیونیزاسیون حیوانات وجود دارد. عموماً شکل متراکم آنتی‌ژن نسبت به فرم منومر آن بسیار ایمیونوژنیک‌تر است. در مورد آنتی‌ژنهای محلول بهتر است که از یک ادجوانت[3] استفاده گردد. ادجوانت کامل فروند همچنان یکی از ادجوانتهای مؤثر و مرسوم است اگر چه خیلی از کمیته‌های اخلاقی حیوانات نگران اثرات جانبی ناشی از آن هستند. ادجوانتهای متعدد دیگری با اثر CFA[4] و اثرات جانبی کمتر پیشنهاد شده‌است[۲۲].

ایمیونیزاسیون دوم یا یادآور ۲ تا ۴ هفته بعد از اولین ایمیونیزاسیون و بدون CFA (به علت احتمال شوک آنافیلاکتیک) اما همراه با اجوانت ناقص فروند(IFA) انجام می‌شود.

آنتی‌ژن محلول را می‌توان به صورت داخل صفاقی، داخل رگی، زیر جلدی یا از طریق کف پای موش(Foot pad) تزریق کرد[۲۳].

---

[1] Immunization
[2] High affinity
[3] Adjuvant
[4] Complete Freund's Adjuvant

روش استاندارد ایمیونیزاسیون به قرار زیر است:

ایمیونیزاسیون اول به صورت[1] IP با ۵۰-۱۰ میکروگرم از آنتی‌ژن به همراه CFA .

ایمیونیزاسیون دوم به فاصله ۲ تا ۴ هفته از اولین تزریق همراه با اجوانت ناقص فروند و در نهایت یک تزریق IV[2] یا IP با ۵۰۰-۵۰ میکروگرم آنتی‌ژن در سرم فیزیولوژی[۱۹].

در مورد آنتی‌ژنهای سطح سلول که بسیار ایمیونوژنیک هستند، حدود $1x10^7$ سلول به ازاء هر موش در PBS به صورت IP تزریق شده ۴ هفته بعد طی ایمیونیزاسیون دوم همین تعداد سلول تزریق می‌شود و۳ تا ۴ روز بعد امتزاج صورت پذیرد[۲۱].

در مورد آنتی‌ژنهای با حلالیت کم و همچنین مقدار اندک آنتی‌ژن از روشهای ایمیونیزاسیون متداول که شرح داده شد نمی‌توان استفاده‌کرد. روشهای متعددی برای ایمیونیزاسیون حیوان با مقدار اندک آنتی-ژن مورد استفاده قرار می‌گیرد که عبارتند از:

۱- ایمیونیزاسیون in vitro [۲۴]

۲- ایمیونیزاسیون داخل طحال[3] [۲۵]

۳- تلقیح آنتی‌ژن به غدد لنفاوی[4] [۲۶]

۴- خالص‌سازی مقدار کم آنتی‌ژن روی غشاء نیتروسلولز و تزریق به صورت داخل طحال یا in vitro [۲۷].

این روشها عمدتاً سبب تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال با ایزوتیپ IgM و اغلب با تمایل کم[5] می‌شود و به همین جهت کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند[۲۱].

[1] Intra Peritoneal
[2] Intra Venous
[3] Intrasplenic
[4] Lymph node deposition
[5] Low affinity

لازم به ذکر است که چون حیوانات پاسخهای مختلفی به آنتی‌ژن مورد نظر می‌دهند بنابراین بایستی بیش از یک حیوان ایمیونیزه گردد همچنین بیشتر از یک روش ایمیونیزاسیون به کارگرفته شود[۱۹].

۱-۱-۵. میلوما وسل لاینهای میلومائی

تومور ایجاد شده به وسیله سلولهای بدخیم ترشح کننده آنتی‌بادی پلاسماستیوما یا میلوما نامیده می-شود. میلوما به خودی خود ندرتاً در موش اتفاق می‌افتد[۲۸]، اما در موش صحرائی نژاد Lou/c کاملاً شایع است[۲۹].

همچنین میلوما در گونه‌های دیگر ندرتاً اتفاق می‌افتد اما در انسان غیر معمول نیست.

در سال ۱۹۵۹ نقش محرکهای صفاقی در تولید میلوما در موش BALB/c کاملا اتفاقی کشف شد. در سال ۱۹۶۲ نقش روغن معدنی یا پریستان[1] به عنوان القاء کننده قوی میلوما در موش BALB/c به وسیله Potter و Boyce کشف شد. طی یک سال در ۴۰٪ موشهائی که سه تزریق داخل صفاقی از روغن معدنی داشتند تومورهای میلوما ظاهر شد[۳۰].

ایجاد پلاسماسیتوما در موش معمولاً همراه با ترانس لوکاسیون بین کروموزومهای ۱۵(حاوی ژن C-myc) و ۱۲ (حاوی ژن زنجیره سنگین) است. ترانس لوکاسیون باعث فعال شدن ژن C-myc شده، بنابراین مرحلهٔ مهمی در ترانسفورم شدن سلول محسوب می‌شود[۳۱].

گروههای زیادی در زمینه تولید میلوما فعالیت نمودند اما این میلوماها قادر به ادامهٔ حیات خود در محیط کشت سلولی نبوند تا اینکه در سال ۱۹۷۰ Horibata و Harris موفق به تثبیت و رشد مستمر تعداد میلوما در محیط کشت سلولی در آزمایشگاه شدند. سلولهای Mopc-21 اولین میلومیاهائی بودند که رشد آنها در محیط کشت سلولی تثبیت گردید[۹].

تولید آنتی‌بادیها توسط سلولهای میلومای موش و موش صحرائی با الگوی سرمی آنها مطابقت ندارد.

[1] pristane

در حدود ۵۰٪-۳۰٪ از میلوماهای IgA BALB/c، ۳۰٪ IgG و ۳٪ IgM تولید می‌کنند در حالی که ۲۰٪ از میلوماهای NZB، IgA، ۵۰٪Ig M و ۲٪ IgM ترشح می‌کنند[۳۲].

در موش صحرائی الگوی ترشحی سلولهای میلوما به قرار زیر است:

۴۷٪ IgG، ۳۴٪ IgE، ۳٪ IgM، ۲٪ IgD و ۰.۶٪ IgA

در بعضی از رده‌های میلوما هم ممکن است فقط زنجیره کاپا تولید گردد و یا اینکه هیچگونه آنتی‌بادی ترشح ننمایند[۳۱].

برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال به سلولهایی نیاز است که اولاً دارای بقاء دائمی بوده ثانیاً توانایی تولید آنتی‌بادی را نداشته باشند و ثانیاً در یک آنزیم مهم ولی غیر ضروری برای بقاء خود دچار نقص فعالیت باشند[۲].

تاکنون سل لاینهای متعددی میلومایی گونه‌های موش و موش صحرائی و انسان تهیه شده-است(جدول۱-۱)[۶].

Myeloma	Species	Derivation
P3X63Ag8.653	Mouse	MOPC21→P3K→ P3X63Ag8
Sp2/0-AG14	Mouse	MOPC21→P3K→ P3X63Ag8→Fuse with splenocytes
NSO/1	Mouse	MOPC21→P3K→ NSI/1-Ag4–1
YB2/0	Rat	S210→Y3-Ag 1.2.3 fused to AO splenocytes→YB2/3HL

جدول(۱-۱) سل لاینهای میلومای مورد استفاده در تولید هیبریدوما

۱-۱-۶. روشهای انتخاب

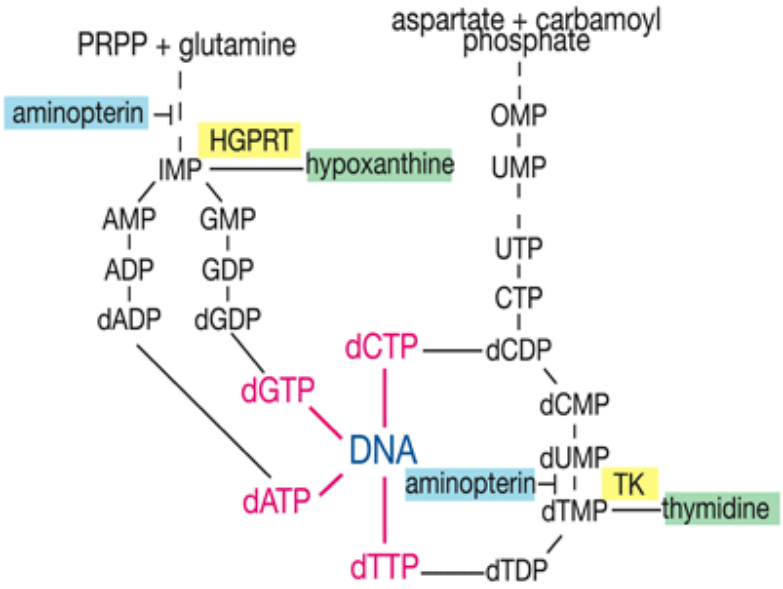
از آنجا که طی پدیده امتزاج، برخوردهای متعددی بین سلولها اتفاق می‌افتد، لذا امتزاج‌های ناخواستهٔ فراوانی رخ می‌دهد. بنابراین برای تولید لاین سلولی هیبرید و افتراق آن از سایر سلولها نیاز به یک روش انتخابی داریم. متداولترین روش انتخابی تحت عنوان HAT selection به وسیله Littlefield در سال ۱۹۶۴ پیشنهاد شد. برای درک مکانیسم HAT selection ابتدا نیاز به شناخت سنتز اسید نوکلئیک است. سنتز اسیدهای نوکلئیک از دو مسیر صورت می‌پذیرد:

۱- مسیر سنتز مجدد[۱]

۲- مسیر سنتز بازیافت[۲]

تمام سلولهای طبیعی از مسیر سنتز مجدد استفاده می‌کنند اما وقتی این مسیر مسدود می‌شود، آنها از مسیر بازیافت استفاده می‌کنند. براساس روش Littlefield وقتی مسیر denovo بیوسنتز گوانوزین به وسیله آنتگونیست فولیک اسید یعنی آمینوپترین مسدود می‌شود، در مسیر بازیافت برای سنتز پورین‌ها از هیپوزانتین و گوانین به عنوان سوبسترا استفاده می‌شود و از آنها به کمک آنزیم HGPRT[۳] مولکولهای Inosinic ribose phosphate و Guanine acid ribose phosphate ساخته می‌شود(شکل۱-۲)[۲].

[1] Denovo pathway
[2] Salvage pathway
[3] Hypoxantin phosphoribosyl transferase



شکل ۱-۲. اساس بیوشیمیایی HAT selection

همچنین در مسیر بازیافت برای سنتز پیریمیدین‌ها از تیمیدین به عنوان سوبسترا استفاده شده با کمک آنزیم Thymidine Kinase مولکول Thymidine Monophosphate ساخته می‌شود.

سلولهای فاقد آنزیم HGPRT در محیط حاوی هیپوزانتین، آمینوپترین، تیمیدین (HAT) به علت مسدود شدن هر دو مسیر بیوسنتز DNA یعنی مسیر سنتز مجدد و مسیر بازیافت خواهند مرد. تنها وقتی یک سلول $HGPRT^-$ قادر به ادامه حیات در محیط HAT است که آنزیم گمشده خود را از طریق امتزاج با یک سلول $HGPRT^+$ باز یابد(جدول ۱-۲)[۱۵].

DNA synthesis			
Cell type	Salvage pathway	De novo pathway	**Survival in HAT medium**
Myeloma	$HGPRT^-$	Aminopterin sensitive	Die(no DNA synthesis)
Spleen	$HGPRT^+$	Aminopterin sensitive	Die(finite survival in vitro)
Myloma/spleen hybrid	$HGPRT^+$	Aminopterin sensitive	Live
Myeloma/myeloma hybrid	$HGPRT^-$	Aminopterin sensitive	Die(no DNA synthesis)
Spleen/spleen hybrid	$HGPRT^+$	Aminopterin sensitive	Die(finite survival in vitro)

جدول ۱-۲. انتخاب سلولهای هیبریدوما پس از امتزاج سلولی در محیط HAT

انتخاب سلولهای $HGPRT^-$ از طریق مصرف بازهای مشابه سمی نظیر 8-azaguanine یا 6-thioguanine که از طریق مسیر بازیافت وارد DNA می‌شوند، ممکن می‌گردد. از آنجا که مسیر بازیافت به طور معمول برای حیات سلول ضروری نیست، موتان‌هایی که فاقد HGPRT هستند به رشد خود ادامه داده در حالی که سلولهای $HGPRT^+$ خواهند مرد.

آنزیم HGPRT به وسیله کروموزوم X کد می‌شود و از آنجا که تنها یک کروموزوم X فعال در هر سلول وجود دارد بنابراین انتخاب واریته‌های $HGPRT^-$ کار آسانی خواهد بود[۳۳].

انتخاب واریته‌های فاقد آنزیم Thymidine kinase که آنزیمی اتوزومی است به دلیل نیاز به دو موتاسیون همزمان بسیار مشکل‌تر است.

۱-۱-۷. امتزاج[1]

سلولها در تمام مراحل سیکل سلولی ادغام می‌شوند، ولی به دلیل غیر طبیعی بودن کروموزومها، تعداد بسیاری از هیبریدوماهای تولیدی هرگز به میتوز نمی‌رسند. در تکنیک هیبریدوما، هتروکریون‌ها از

[1] Fusion

ادغام سلولهای میتوزی با سلولهائی در مرحله G2, S, G1 به دست می‌آیند. پس از ادغام سلولی همزمان شدن[1] DNA برای ادامه حیات هیبریدوما ضروری است[۳۴].

در هنگام ادغام سلولهای میتوزی(میلوما) با سلولهائی در فاز اینترفار(پلاسماسل‌ها) دو اتفاق می‌افتد:

۱- پدیده PCC[2] که اصطلاحاً به آن Prophasing نیز گفته می‌شود و در سال ۱۹۷۰ به وسیله Rao و Johanson شرح داده شده‌است[۳۵].

در این پدیده کروماتین هسته‌های اینترفاز متراکم شده مشابه ساختمان کروموزومها می‌گردند و سپس غشاء هسته‌ای ناپدید می‌شود. در واقع هسته اینترفاز دچار یک ترانسفورماسیون القاء شده به وسیله فاکتورهای موجود در سلول متافاز می‌شود. این پدیده ظرف ۱۰ دقیقه پس از ادغام اتفاق می‌افتد. کروموزومهای متراکم شده به طور تصادفی وارد هستهٔ سلول دختر می‌شوند و یا در سیتوپلاسم باقی می‌مانند و در میتوز بعدی حذف می‌شوند.

۲- پدیده TLN[3] که در آن پس از ادغام سلولها، هسته اینترفاز تغییر نمی‌کند ولی در اطراف کروموزومهای متافاز پوشش هسته‌ای تشکیل می‌گردد[۳۶].

به نظر می‌رسد بهترین مرحله برای ادغام دو سلول مرحله اینترفاز است. اگر هر دو سلول در مرحله G1 قرار گرفته باشند تمام سلولها سنتز را DNA با هم شروع خواهند نمود اما اگر دو سلول هتروفاز باشند یکی در مرحله G1 و دیگری در مرحله S، آنگاه مواد تحریک کننده از سیتوپلاسم سلول در فاز S به سمت هسته G1 می‌روند و سنتز DNA را القاء می‌کنند. در هنگامی که یکی از سلولها در مرحله اینترفاز و دیگری در مرحله میتوز باشد در آن صورت پدیده PPC اتفاق می‌افتد. در واقع یکی از فاکتورهایی که باعث حذف کروموزومها در سلولهای هیبریدوما می‌گردد همین PPC است[۳۷].

[1] Snchronization
[2] Premature chromosome condensation
[3] Telophase-like nucleus

اینکه کدام پدیده در هنگام ادغام سلولی بیشتر اتفاق می‌افتد بستگی به PH محیط دارد. در PHهای ۸-۶/۶ پدیده PCC بیشتر اتفاق می‌افتد در حالی که در PHهای ۸/۵-۸ پدیدهٔ دوم غالب است. بعلاوه ایجاد هر کدام ازدو پدیده مقدار زیادی بستگی به نسبت سلولهای متافاز به اینترفاز دارد. هنگامی که این نسبت حدود ۳۳٪ باشد TLN و هنگامی که نسبت حدود ۲ باشد PCC بیشتر اتفاق می‌افتد. تجربه نشان داده‌است که بیشترین تعداد هیبریدوما هنگامی تشکیل می‌شود که PH ماده ادغام کننده در حدود ۸ تا ۸/۲ باشد[۳۷].

ادغام شامل دو مرحله جداگانه است. اول آگلوتیناسیون سلولی که در طی آن غشای سلولهای مجاور در کنار همدیگر می‌گیرد و دوم تشکیل پل‌های سیتوپلاسمی بین سلولهایی که متعاقب آن ادغام غشاء سلولی در یک منطقه وسیع و سپس تورم اسمزی رخ داده، هترکرویون تشکیل می‌گردد.

۱-۱-۷-۱. روشهای امتزاج سلولی

فیوژن یا امتزاج عبارتست از جوش خوردن غشاء دو سلول سوماتیک یکسان یا متفاوت و تشکیل یک سلول جدید برای امتزاج سلولها، روشهای متعددی ابداع گردیده که مهمترین آنها عبارتند از:

۱- امتزاج به کمک لیزولستین

در این روش تعداد مساوی از دو گونهٔ سلول میلوما و طبیعی در بافر استات مخلوط شده پس از شستشو و سانتریفیوژ، بافر استات حاوی لیزولستین اضافه شده و پس از ۱۵ دقیقه مجدداً شستشو داده شده بعد از تقسیم به انکوباتور حاوی Co_2 منتقل می‌گردد[۳۱].

۲- امتزاج الکتریکی[1]

الکتروفیوژن عبارت است از جوش خوردن غشاء سلولها با ملکولهایی مانند DNA به وسیله پالسهای الکتریکی با ولتاژ بالا که این روش برای ادغام غشاء سلولها نیز استفاده می‌شود[۶].

[1] Electro fusion

در سال ۱۹۸۲، Zimmerman جهت امتزاج سلولهای پستانداران این روش را ابداع کرد. در این روش، ابتدا سلولهای طحال و میلوما در یک میدان الکتریکی متناوب به هم متصل می‌شوند و سپس سلول-هایی که نزدیک هم قرار گرفته‌اند با یک ولتاژ مستقیم کوتاه به هم پیوند می‌یابند. این روش دارای فوائد زیادی می‌باشد که مهمترین آنها موفقیت بالای آن است به طوری که مراحل امتزاج می توانند به طور میکروسکوپی پی‌گیری شوند و هیبریدوماهای حاصل با استفاده از وسایل میکروسکوپی برداشته شوند[۶].

۳- پیوند سلولی به وسیله Electro acoustic

این روش امتزاج در سال ۱۹۹۰ توسط Bardsley و همکارانش ابداع شد. در این روش، در میدان حاوی یک مگاهرتز صوت در اثر نیروی سه اشعه سلولها به هم نزدیک می‌شوند. یک نیرو باعث اتصال سلولها به هم شده و نیروی دوم سلولها را در مسیر دلخواه قرار می‌دهد و نیروی سومی موج آکوستیک ایجاد نموده و باعث می‌شود سلولها در یک محل که به وسیله نصف طول موج از هم جدا شده‌اند جمع شوند[۱۸].

۴- استفاده از پلی‌اتیلن گلیکول

اگر چه Kohler و Milstein از ویروس غیر فعال شده سندائی برای القاء امتزاج سلولی استفاده کردند اما تقریباً تمام هیبریدوماهای امروزی با استفاده از PEG[1] تهیه می‌شوند.

Pontecorro در سال۱۹۷۵ و Daridson و همکارانش در سال ۱۹۷۶ نشان دادند که PEG یک ماده بسیار مؤثر برای امتزاج سلولی است[۳۸و۳۹]. روشهای تولید هیبریدوما با PEG شناخته شده‌است اما پارامترهای متعددی در امتزاج با PEG مؤثرند.

[1] Poly Ethylene Glycole

نقش PEG در امتزاج سلولهای میلوما برای اولین بار در سال ۱۹۷۷ توسط Galfre و همکارانش شرح داده‌شد. اثرات سمی PEG برکاهش چشمگیر هیبریداسیون گزارش شده‌است.

Schneiderman و همکارانش در سال ۱۹۷۹ و Mercer ، Baserga در سال ۱۹۸۲ گزارش دادن که کاهش غلظت کلیسیم در طی امتزاج سلولی و بعد از آن، سبب کاهش سمیت PEG می‌گردد و پیشنهاد کردند که امکان دارد یونهای کلیسیم در سیتوتوکسیسیتی سلولها تأثیر داشته‌باشد و چنانچه محیط عمل فاقد کلسیم باشد و سلول بعد از امتزاج به مدت ۱۵ دقیقه در محیط بدون کلسیم انکوبه شوند این اثر سمی کاهش می‌یابد[۶ و ۴۰].

Schlegel, Mercer گزارش دادند که آغشته کردن با لکتین فیتوهماگلوتینین قبل از ادغام سلولها، امتزاج سلولی را تشدید می‌کند[۶].

و Norwood و همکارانش در سال ۱۹۷۶ و Norwood, Zeigler در سال ۱۹۸۲ گزارش دادند که DMSO، امتزاج سلولهای پستانداران را در تمام غلظتهای آزمایش شده PEG تشدید می‌کند. و بالاخره در سال ۱۹۸۴، Miyahara و همکارانش گزارش دادند که آغشته کردن سلولهای میلوما با کلسمید[1] امتزاج سلولی ناشی از PEG را افزایش می‌دهد[۶].

تجمع پراکسیدها در اثر فتواکسیداسیون یکی از عوامل سمی شدن PEG محسوب می‌شود همچنین آلوده شدن PEG به آلدئیدها از دیگر عوامل سمی شدن PEG می‌باشد[۴۱].

اما مهمترین متغیرها در القاء امتزاج به وسیله PEG به قرار زیرند:

۱- غلظت PEG، در غلظت پایین‌تر از ۳۰٪ تعداد بسیار کمی هیبرید تشکیل می‌گردد و بالاتر از ۵۰٪ اثر سمی آن افزایش می‌یابد و بهترین غلظت معمولاً ۵۰٪-۴۰٪ است.

۲- خلوص PEG، همان طور که قبلاً اشاره شد آلودگی PEG باعث افزایش اثرات سمی آن می‌شود.

[1] Colcemide

۳- PH محلول PEG، در سال ۱۹۸۰، Sharon و همکارانش نشان‌دادند که بازدهی امتزاج سلولی بسیار وابسته به PH است، طوری که حداکثر بازدهی در PH بین ۸ تا ۸/۲ به دست می‌آید[۴۲].

۴- مدت زمان مواجههٔ سلولها با PEG، بازدهی امتزاج و همچنین اثرات سمی PEG همراه با زمان افزایش می‌یابد. سایر فاکتورهایی که اثرات کمتری در فرآیند امتزاج دارند عبارتند از: دما($20-37^{o}C$)، تعداد سلول، وزن مولکولی PEG، نسبت سلولهای طحالی به سلولهای میلوما و حضور یا عدم حضور سرم و گلبول قرمز طی امتزاج.

۱-۱-۷-۲. مکانیسم پلی‌اتیلن گلیکول در امتزاج سلولی

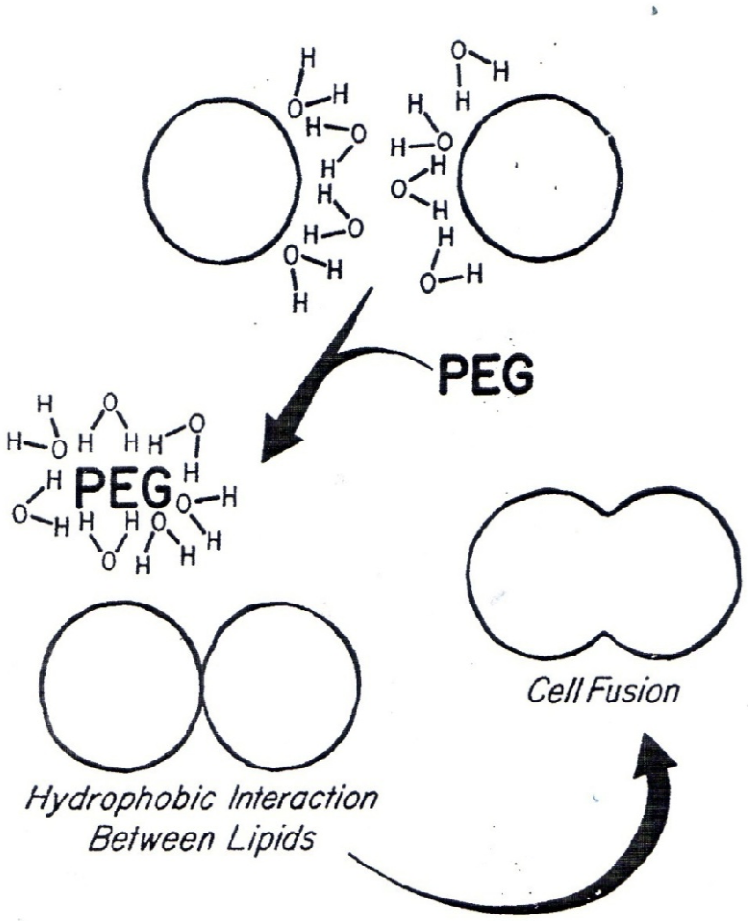
مطالعات آغاز شده در سال ۱۹۷۰ توانایی بسیاری از ترکیبات را در ادغام سلولها نشان داد اگر چه ترکیبات متعددی قادر به ادغام سلولها هستند اما دسته کوچکی از آنها قادر به تولید سلولهای هیبرید زنده می‌باشند. Fusogen به ترکیباتی اطلاق می‌گرددکه قادر به به ادغام سلولها هستند و Hybridogen به PEG و ترکیبات نظیر آن اطلاق می‌گردد که قادر به تولید هیبرید قابل تکثیر هستند. مطالعه مشتقات PEG نشان دادند که مشتقات هیدروفیلیک فعالیت هیبریدژنیک را حفظ می‌کنند در حالی که مشتقات هیدروفوبیک قادر به ایجاد هیبرید نیستند[۶]. تمامی ترکیبات هیبریدژنیک یا مشتقاتی از PEG هستند یا از نظر ساختمانی شبیه PEG هستند و خاصیت هیدروفیلیک دارند به جز لیزولستین که مکانیسم ادغام سلولی آن با PEG متفاوت است.

فرمول ساختمانی PEG به صورت $HO(CH_2CH_2O)H$ نشان داده می‌شود.

PEG دارای اجزاء دو قطبی موقت بسیار است. اولین اثر PEG در امتزاج سلولی از تأثیر این مولکول روی ساختمان آب ناشی می‌شود. اجزاء دو قطبی موقت PEG باعث تجمع آب در اطراف آن می‌شود. با همین اثر بخشی، PEG باعث رسوب مولکولهای پروتئینی می‌شود.

Lucy و همکارانش نشان دادند که PEG با غلظت ٪۶۰-٪۵۰ قادر است تمام آب محلول را به خود جذب کند[۴۳].

وقتی آب از محیط عمل خارج شد، با مجاورت گروههای فسفولیپیدی قطبی غشاءهای سلولی و اندرکنش هیدروفوبیک بین آنها دو سلول مجاور در هم ادغام می‌شوند.(شکل۱-۳)[۶].



شکل۱-۳. مکانیسم عمل PEG در ادغام

۱-۱-۸. سلولهای غذا دهنده[1]

تعداد کم سلولهای لنفوئیدی به تنهایی قادر به رشد نیستند. برای حل این مشکل از سلولهای غذا دهنده یا فاکتورهای رشد متعدد استفاده‌می‌شود. مؤثرترین عامل رشد هیبریدوماها اینترلوکین۶[1] است و با اضافه کردن آن به محیط کشت، آنتی‌بادی مونوکلونال بیشتری به دست می‌آید. ژن تولید IL-6

[1] Feeder cells