

Monoclonal Antibody Against Antigens of *Leishmania infantum*: Optimize the Growth Condition of Monoclonal Antibody-producing Hybrids

Ezzat Nourizadeh

1. Assistant Professor, Department of Microbiology, College of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Received: 2020/03/25

Accepted: 2020/07/12

Abstract

Introduction: *Leishmania (L.) infantum* is the etiologic cause of visceral leishmaniasis in Iran. Efficient vaccines and diagnosis methods are required to control leishmaniasis. The aim of this study is produce and optimize monoclonal antibodies against promastigotes forms of *L. infantum* antigen.

Materials and Methods: The mice were vaccinated with the *L. infantum* antigen and their antibody titers were determined by the ELISA method. Spleen cells of the most immune mouse were fused with SP2/0 in the presence of Poly Ethylene Glycol. The effect of supernatant of SP2/0 and mice peritoneum macrophage cells culture (SSMCC) on hybridoma cell proliferation was studied.

Results: Among the 12 fusion, a total of 26 monoclonal were positive. 12 of which had acceptable optical absorbance in OD 450 nm. Finally, 4 clones, designated as 8D2 FVI6, 8D2 FVI3, 6G2 FV4 and 6G2 FV3. From these hybrids, anti-promastigotes *L. infantum* monoclonal antibodies were obtained. SSMCC was shown to play a key role in hybridoma proliferation and of mAb production. It seemed that SSMCC is rich of growth factors.

Conclusion: It seems in the near future, this SCCSM can be used as a growth factor for cancerous and non-cancerous cells in research centers at a wider level.

***Corresponding Author:** Ezzat Nourizadeh

Address: Department of Microbiology, College of Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

Tel: +989144543481

E-mail: nourizade@ut.ac.ir

Keywords: Monoclonal antibodies, *Leishmania infantum*, Cell culture

How to cite this article: Nourizadeh E. Monoclonal Antibody Against Antigens of *Leishmania infantum*: Optimize the Growth Condition of Monoclonal Antibody-producing Hybrids, Journal of Sabzevar University of Medical Sciences, 2021; 28(4):775-789.

Introduction

Trypanosomatid protozoans belonging to the genus *Leishmania* are obligate parasites of mammalian macrophages. The life cycle of these organisms goes through two morphologically different stages: the amastigote, which is found in the parasitophorous vacuoles of host macrophages and dendritic cells, and the promastigote, which is an extracellular flagellated form found in the gut of the sandfly vector. At least, 15 *Leishmania* species are infectious for humans and cause a wide spectrum of diseases, including cutaneous, mucocutaneous, and visceral leishmaniasis, as well as asymptomatic infections. Intermediate forms may be encountered, and the same parasite species may cause different forms of disease. Leishmaniasis is prevalent on four continents, and the World Health Organization considers leishmaniasis to be among the major infectious diseases in the world. *Leishmania infantum* is the causative agent of infantile visceral leishmaniasis in the Mediterranean region. *Leishmania* causes several different diseases such as cutaneous leishmaniasis that is self-limiting, and Kala-azar. Due to the importance of the disease there is a need for an effective diagnosis.

Leishmania infantum is the etiologic cause of Visceral leishmaniasis in Iran. Efficient vaccines and diagnosis methods are required to control leishmaniasis. Three forms of this disease have been identified in humans in which visceral leishmaniasis is the most threatening form; visceral leishmaniasis is endemic in 62 countries as well as in the Mediterranean region and Iran. Previous studies showed that the etiological cause of kala-azar in Iran (Ardabil, Fars, East Azarbaijan, North Khorasan, Qom and Bushehr) is the *L. infantum* strain. The aim of this study is to produce and optimize monoclonal antibodies against promastigote forms of *L. infantum* antigen. There are millions of people throughout the world as well as in Iran suffering from leishmaniasis. Antibodies have been used as therapeutics already in the late 19th century in the form of patient or animal derived sera to treat infectious diseases. With the invention in the 1970's of the method to produce monoclonal antibodies (mAbs), the idea of a magic bullet, in particular against tumour specific antigens in addition to infectious diseases, started to take a strong hold.

Monoclonal Antibodies are highly beneficial tools for the diagnosis, biochemical and

immunopathological identification of *Leishmania* parasites. Leishmaniasis is endemic in 88 countries. Amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection. So far, control of these diseases by hygienic methods has not been successful. So treating the disease is the current solution to fight the disease.

The first step in treating the disease is to diagnose the disease early and differentiate it from other diseases. Although there are good practical methods for diagnosis, the sensitivity of these methods is different and some of them do not have high sensitivity and specificity.

Monoclonal antibodies are used in the identification of antigens of various microorganisms as a suitable tool for use in diagnostic, therapeutic and research tests. Monoclonal antibodies are key reagents used in the diagnosis of infectious and non-infectious diseases. Leishmaniasis is widely distributed around the world and is greatly important for humans as a leading cause of serious infectious diseases. Leishmaniasis is one of the most important contagious diseases caused by parasites of the genus *Leishmania*, a common parasite throughout the world and Iran.

Monoclonal antibodies (mAbs) are important for the identification of species determinants on promastigote types of *Leishmania* antigens. These parasites have a relatively simple digenetic life cycle, existing in the sandfly vector as promastigotes and in suitable host macrophages as intracellular amastigotes.

Methodology

First, standard strains were cultured and promastigote antigens of *L. infantum* were obtained.

Promastigote culture: A standard Iranian strain of *Leishmania infantum* (MHOM/IR/04/IPI-UN10) (obtained from Pasteur Institute of Iran) and reference strain of WHO (MHOM/TN/80/IPT1) was used in this study. At first, promastigotes of these strains were cultured in NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) special media. Then, the parasites were transferred to RPMI-1640 medium (Gibco, Frankfurt, Germany) supplemented with fetal bovine serum (FBS) 10% (Biosera, South America), L-glutamine (2 mM) 1% (Gibco), antibiotics penicillin (100u/ml) and streptomycin (100µg/ml) 1% (Merck,

Germany). They were incubated in 24°C to reach appropriate concentration. After that, the cultured promastigotes were used to obtain amastigotes antigens.

Preparation of *L. infantum* antigens: Harvested amastigotes were counted (4×10^9 parasite cells) and their antigens were extracted using the freeze (five times at liquid nitrogen) and thaw at 37°C. For preparation of antigens, different dilutions were prepared in several vials. promastigotes antigens were collected and stored at -70°C until use. Since then, BALB/c mice were immunized and antibody titers were determined.

Immunization of mice: Four female BALB/c (6-8 weeks old) mice were injected intraperitoneally, and subcutaneously (at tail base) with 40 µg of soluble *L. infantum* antigens preparation in complete Freund adjuvant and 2 weeks later were boosted with the same amount of antigen in incomplete Freund adjuvant. Then the serum antibody titers of mice 30 days after injection were measured. When 1/1000 dilution of sera had positive reaction with antigen in ELISA, the mouse with highest OD in ELISA was selected for fusion. Three days before fusion, selected mouse was boosted with 40 µg antigen intravenous through the tail.

Cell fusion

Sp2/0-Ag14 cells (IBRC C10106) were used for fusion and cultured in special mediums. Several cultures of these cells were prepared and their growth rate was assessed precisely, and cultures with live cells higher than 90% were selected for fusion. The cells were kept in exponential growth phase and retained at this phase for fusion. Isolated lymphocytes from spleen of immunized mice and myeloma cells were fused at a ratio of 10 to 1 in the presence of PEG (polyethylene glycol; MW 1450, Sigma) and then fused cells were transferred to the complete culture medium containing HAT (Hypoxanthine-aminopterin-thymidine), 2% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) L-glutamine (2 mM), 20% FBS, 5% CO₂, 1% penicillin (100 U/ml) with streptomycin (100 µg/ml) and were incubated at 37°C. After 1 week HAT, medium were replaced with HT (Hypoxanthine and thymidine) medium (Sigma). Hybridoma cell presence and the colonies were identified using an invert microscope. Part of these cells were suspended in a special freezing medium and reserved in liquid nitrogen for future tests. Also, some parts of them were used for subsequent analyses.

Cloning of hybridoma cells by Limiting Dilution Assay

Positive clones were selected. Each clone was suspended in culture medium using limiting dilution and split into 96-well plates to reach a uniform suspension so that approximately one cell was placed in each well and incubated at 37°C. They were cultured in complete culture medium plates with feeder layer and supplements such as oxalate, pyruvate, and insulin (OPI), (Merck) growth factor. Consequently, mAb producing monoclonal cells were isolated.

Production of Ascitic Fluids

Hybridoma cells with (the highest OD) producing mAbs were grown in RPMI-1640 (Gibco) supplemented with 10% FBS, harvested and washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), (Sigma). Eight days after pristane injection, BALB/c mice were injected intra-peritoneally with 2×10^6 hybridoma cells suspended in 0.5 ml PBS. Fluid was collected from the peritoneal cavity 10 days after the injection of the cells. Ascitic fluid was kept at 4°C for 1 h and centrifuged at (4000 × g, 20 min). Supernatant was collected and stored at -70°C until use.

Preparation of cell culture supernatant

SP2/0 and peritoneum macrophage cells were separately cultured in complete culture medium containing RPMI-1640 (Gibco Co. UK), penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100 µg/ml). This was conducted in the presence of FBS 10% (Gibco Co. UK) and 5% CO₂ in the incubator at 37°C. After proliferation and covering much parts of the flask by cells, the supernatant was discarded and incubated cells were washed twice using centrifuge (8 min, 800 rpm). After 24 h, cells were obtained from the stationary phase and centrifuged for 8 min with 3000 rpm. Subsequently, supernatant was harvested and filtered using 22 µm filters.

Comparison of the effects of cell supernatant and growth factors on hybridoma

Before using the supernatants of sp2/0 and peritoneum macrophage cells, the addition amount to complete medium was analyzed and optimized. The content of the sixth fusion hybridoma was divided between 21 plates and 2.5×10^5 ml cells were positioned in one well of 6-well plates. In the first three plates, complete culture medium containing 10% of sp2/0 cells supernatant was added. In the second set of three plates, complete culture medium containing 10% peritoneum

macrophage cell supernatant was added. In the third three plates, supernatant of SP2/0 and mice peritoneum macrophage cell culture (SSMCC) were added to the complete culture medium equally (10%). In the fourth three plates, only 1% sodium pyruvate was added to the complete culture medium as growth factors. In the fifth three plates, only feeder layer (2000 cells/well) was used and in the sixth three plates, OPI was applied as a growth factor. Finally, three plates that only contained complete culture medium were used as controls. All plates were incubated in an incubator with 5% CO₂, 37°C temperature and 90% humidity. After 1 week, cells in wells were counted and their average number was calculated.

For hybridoma cell formation, lymphocytes isolated from spleen of immunized mice and myeloma cells were fused at a ratio of 10 to 1 in the presence of polyethylene glycol, followed by limiting dilution for the isolation of monoclones. Subsequently, antibody isotypes were determined by using the isotyping kit. The best clone was injected intraperitoneally to pristane-primed mice for large scale production of monoclonal antibodies. The specificity of antibody was determined with Western blotting. The mice were vaccinated with the *L. infantum* antigen and their antibody titers were determined by the ELISA method. Spleen cells of the most immune mouse were fused with SP2/0 in the presence of Poly Ethylene Glycol. The effect of supernatant of SP2/0 and mice peritoneum macrophage cells culture on hybridoma cell proliferation was studied.

Results

Among the 12 fusion, a total of 26 monoclonal were positive. 12 of which had acceptable optical absorbance in OD 450 nm. Finally, 4 clones, designated as 8D2 FVI6, 8D2 FVI3, 6G2 FV4 and 6G2 FV3. From these hybrids, anti-promastigotes *L. infantum* monoclonal antibodies were obtained. SSMCC was shown to play a key role in hybridoma proliferation and of mAb production. It seemed that SSMCC is rich of growth factors.

Conclusion

Since 1975, when Kohler and Milestein discovered monoclonal antibodies, rapid advances in hybridoma technology and the application of monoclonal antibodies have been made. Pan and McMahon-Pratt also developed monoclonal antibodies against *Leishmania pipanoi* amastigotes

in 1988. In 2004, Froes and colleagues developed monoclonal antibodies against *Leishmania shagasi* amastigotes.

To date, monoclonal antibodies specific to the species of *Leishmania mexicana*, *Brasiliensis* and **Tropica** complex and *Donovani* have been produced for use in the immune diagnosis and taxonomic classification of *Leishmania* species. According to various studies on antigens of different species of *Leishmania*, little information is available about *Leishmania infantum*.

However, according to the information available in the network, no specific monoclonal antibody against the pro-mastigot form of *Leishmania infantum* has been prepared in Iran.

Therefore, preparation of a specific monoclonal antibody against the promastigotic form of *Leishmania infantum* of Iranian strain seems to be very necessary. In this study, 12 monoclones had the desired antibody. Compared to the work of other researchers, our results differ in terms of the number of monoclones obtained, and this significant difference can be due to the use of our new applied strategies as well as its breadth. Methods the development of monoclonal antibodies against *Leishmania infantum* promastigotes is important in that it is useful in determining the species of *Leishmania*, its direct diagnosis in the wound. In cell fusion, one of the most essential factors for hybrid production is the presence of a strong growth factor, in the absence of which hybridoma production is difficult. Hybridoma cells usually grow better in a rich culture medium. Growth factors that are imported from abroad, such as OPI and sodium pyruvate, are firstly very expensive and secondly, they are difficult and time consuming to obtain from abroad. To make monoclonal antibodies cost-effective, biological growth factors can be substituted for chemical growth factors. The use of this material as a growth factor is low cost, easy and practical method and secure.

It seems in the near future, this SCCSM can be used as a growth factor for cancerous and non-cancerous cells in research centers at a wider level.

Acknowledgment

This research was conducted with the financial support of the Vice Chancellor for Research of Mohaghegh Ardabili University. We would like to

thank the Vice Chancellor for Research and Technology of Mohaghegh Ardabili University.

Conflict of Interest: Ezzat Nourizadeh (Responsible Author) hereby undertake not to

submit this article to any other publication at the same time and assign the copyright to this publication.

بهینه‌سازی شرایط رشد هیبریدهای مولد آنتی‌بادی مونوکلنال علیه آنتی‌ژن لیشمانیا اینفنتوم

عزت نوری‌زاده^۱

۱. استاد استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۲۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۶

چکیده

زمینه و هدف: لیشمانیا اینفانتوم، عامل اتیولوژیک لیشمانیوز احشایی در ایران است. واکسن‌های مؤثر و روش‌های تشخیصی برای کنترل لیشمانیوز لازم است. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال ابزاری باارزش برای تشخیص، درمان و تعیین ویژگی آنتی‌ژنی انگل‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند. هدف از این مطالعه، بهینه‌سازی شرایط رشد هیبریدهای مولد آنتی‌بادی مونوکلنال علیه آنتی‌ژن پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم است.

مواد و روش‌ها: موش‌ها توسط آنتی‌ژن لیشمانیا اینفنتوم واکسینه شدند و تیتراژ آنتی‌بادی‌های آنان توسط روش الایزا تعیین شدند. سلول‌های طحال موش‌هایی که به‌خوبی توسط آنتی‌ژن لیشمانیا اینفنتوم ایمن شده بودند با سلول‌های SP2/0 در حضور پلی‌اتیلن گلیکول ادغام شدند. تأثیر سوپرناتانت سلول‌های SP2/0 و سلول‌های ماکروفاژ صفاقی موش‌ها بر تکثیر سلول‌های هیبریدوما بررسی شدند.

یافته‌ها: در میان ۱۲ فیوزن در مجموع ۲۶ مونوکلون مثبت بودند که ۱۲ مونوکلون جذب نوری (OD) قابل‌قبولی داشتند. ۴ کلون به‌عنوان 8 D2 FV16، 8D2 FV13، 6G2 FV4 و 6G2 FV3 تعیین شدند. از این هیبریدها، مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها علیه لیشمانیا اینفنتوم به‌دست آمد. همچنین این مطالعه نشان داد که مایع رویی (سلول‌های SP2/0 و سلول‌های ماکروفاژ صفاقی) نقش کلیدی در تکثیر هیبریدوما و تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال دارد که سرشار از فاکتورهای رشد است.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد در آینده نزدیک مایع رویی مذکور می‌تواند به‌عنوان یک فاکتور رشد برای سلول‌های سرطانی و غیرسرطانی در مراکز تحقیقاتی در سطح وسیع‌تری مورد استفاده قرار گیرد.

* نویسنده مسئول: عزت نوری‌زاده

نشانی: اردبیل، دانشگاه محقق اردبیلی، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۴۴۵۴۳۴۸۱

رایانامه: nourizade@ut.ac.ir
شناسه ORCID: 0000-0001-8933-5787

کلیدواژه‌ها:

آنتی‌بادی مونوکلونال، لیشمانیا اینفنتوم، کشت سلولی

مقدمه

شهرنشینی، سرکوب سیستم ایمنی و سوءتغذیه و موفق نبودن درمان، شیوع لیشمانیوز را در جهان افزایش می‌دهد [۱، ۲].

در حال حاضر سالانه بیش از ۴۵۰۰ مورد در مناطق آندمیک گزارش شده است. در میان اشکال بالینی شناخته شده این بیماری، کالآزار شدیدترین و پیش‌رونده‌ترین شکل است؛ زیرا در صورت درمان نشدن، کشنده است [۱]. در بسیاری از نقاط جهان، به‌ویژه در چین، آسیای میانه، خاورمیانه، قفقاز، مدیترانه و آمریکای جنوبی، بیماری خطرناکی است که از طریق حیوانات به انسان منتقل می‌شود [۳].

لیشمانیوز توسط نیش پشه‌های خاکی جنس *Phlebotomus* و *Lutzomyia* منتقل می‌شود. این بیماری در ۹۸ کشور جهان که ۳۵۰ میلیون نفر در معرض خطر عفونت هستند بومی است. تأثیر این بیماری عمدتاً بر جمعیت فقیر در سطح جهان است [۱]. میزبان اصلی لیشمانیوز در بین حیوانات اهلی، سگ‌ها هستند و در اپیدمیولوژی این بیماری نقش اساسی دارند. در میان اشکال لیشمانیوز، لیشمانیوز احشایی شایع‌ترین بیماری است [۲]. چندین عامل خطر از جمله مهاجرت گسترده، تغییر شکل

یک بیمار در ایران در این بررسی در محیط‌های کشت سلولی تکثیر گردید و برای ایمونیزاسیون موش‌ها استفاده شد. این تحقیق مطابق با کد اخلاق دانشگاه محقق اردبیلی (IR.UMA.REC.1400.007) انجام پذیرفت.

۲.۲. کشت سوش‌های استاندارد و تهیه آنتی ژن: برای کشت سوش‌های لیثمانیا اینفنتوم نخست از محیط کشت دو فازی (Novy-MacNeal-Nicolle) NNN استفاده شد و سپس کشت انگل در محیط کشت مایع RPMI 1640 حاوی ۱۰ درصد FBS سرم جنین گوساله، L-glutamine (3mg/ml) و آنتی‌بیوتیک شامل پنی‌سیلین (100 u/ml) و استرپتومایسین (100 µg/ml) انجام گرفت. از انگل‌های کشت شده برای تهیه آنتی‌ژن استفاده شد. بدین ترتیب انگل‌های حاصل شمارش شدند و آنتی‌ژن آنها توسط روش انجماد- ذوب استخراج شد [۹].

۳.۲. روش تهیه آنتی‌ژن: سلول‌های کشت داده شده انگل‌ها پس از شمارش، در چند ویال کرایو تقسیم شدند. سپس درون یک فالکون ۵۰ میلی‌لیتری که روی کل سطح آن سوراخ‌هایی برای ورود ازت مایع تعبیه شده بود قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تانک ازت قرار گرفت و پس از فریز شدن به داخل بن‌ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. این عمل برای هر نمونه ۵ مرتبه تکرار شد. آنتی‌ژن‌های حاصل در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند.

ایمن‌سازی موش‌ها: تعداد ۲۰ موش ماده BALB/c ۵-۶ هفته‌ای (در حدود ۲۰ گرمی) با تزریق به نقاط مختلف بدن موش شامل: داخل صفاقی، قاعده دم، زیرکتفی و زیر جلدی، از آنتی‌ژن‌های تهیه شده از سوش‌های پروماستیگوت لیثمانیا اینفنتوم به مقدار $10^6 \times 30$ انگل به همراه یاور فروند کامل در ایمنی‌زایی اول، یاور فروند ناقص در ایمنی‌زایی دوم و سوم هر کدام به فواصل دو هفته تحت ایمونیزاسیون قرار گرفتند. پس از بررسی سرم موش‌ها از نظر تشکیل آنتی‌بادی با روش الایزا، آنتی‌ژن بدون یاور به‌عنوان بوستر نهایی ۳ روز قبل از فیوژن، داخل ورید دم^۲ تزریق گردید [۱۰]. شکل ۱ ایمونیزاسیون موش‌های BALB/c و تزریق آنتی‌ژن به نقاط مختلف بدن موش‌ها را نشان می‌دهد.

در زمان‌های اخیر، بیماری‌های انگلی ناشی از لیثمانیوز در بسیاری از مناطق جغرافیایی پدید آمده و منجر به نگرانی‌های بهداشتی و اقتصادی جهانی شده است. وضعیت اقتصادی ضعیف خانوارها نیز نقش عمده‌ای در شیوع این بیماری دارند [۴]. طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی، لیثمانیوز از بیماری‌های مهمی است که مشکل جدی برای سلامتی جهان است و در صورت درمان نشدن به مرگ منجر می‌شود [۵].

نتایج تحقیقات سازمان بهداشت جهانی نشان می‌دهد بیماری لیثمانیوز احشایی در جهان در کشورهای کلمبیا، اتیوپی، کنیا، سومالی و سودان در سال‌های ۲۰۰۸ میلادی تا ۲۰۱۶ در حال افزایش است. لیثمانیوز از مهم‌ترین بیماری‌های واگیری است که در سراسر جهان به‌ویژه در کشور ایران در سطح گسترده انتشار دارد. لیثمانیوز علی‌رغم تمام تلاش‌های انجام شده هنوز یکی از مشکلات بهداشتی جهان و منطقه می‌باشد [۶-۸].

تاکنون کنترل این بیماری‌ها با روش‌های بهداشتی موفقیت‌آمیز نبوده است؛ بنابراین درمان بیماری راه‌حل کنونی برای مبارزه با این بیماری است. اولین قدم برای درمان بیماری، تشخیص به‌موقع بیماری و افتراق آن از بیماری‌های دیگر است. با وجود اینکه روش‌های عملی خوبی برای تشخیص وجود دارد اما حساسیت این روش‌ها متفاوت است و برخی از آنها از حساسیت و ویژگی بالایی برخوردار نیستند. آنتی‌بادی‌های مونوکلنال در شناخت آنتی‌ژن‌های مختلف میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان ابزاری مناسب برای استفاده در آزمون‌های تشخیصی، درمانی و امور تحقیقاتی به‌کار می‌روند. برای تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلنال، فاکتورهای رشد از قبیل اگزالات پیرووات انسولین (OPI)^۱ ضروری است. فاکتورهای رشد معمولاً گران‌قیمت هستند. هدف از این تحقیق، طراحی تکنیک‌های کاربردی مقرون‌به‌صرفه به‌منظور تولید بیشتر آنتی‌بادی‌های مونوکلنال علیه اشکال پروماستیگوتی گونه خطرناک لیثمانیاها یعنی لیثمانیا اینفنتوم می‌باشد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. سوش‌های لیثمانیا اینفنتوم: سوش استاندارد لیثمانیا اینفنتوم (MHOM/IR/04/IPI-UN10) جدا شده از



الف- تزریق صفاقی ب- تزریق زیر جلدی ج- تزریق زیر کتفی

شکل ۱. ایمونیزاسیون موش‌های BALB/c و تزریق آنتی‌ژن به نقاط مختلف بدن موش‌ها

شدند و قبل از ادغام سلولی در فاز لگاریتمی و با درصد بالایی از زنده بودن نگهداری شدند و در زمان ادغام سلولی مورد استفاده قرار گرفتند.

جداسازی طحال موش ایمن شده و استخراج سلول‌های آن: برای ادغام سلولی نیاز به سلول‌های لنفوسیت B است که این سلول‌ها در طحال موش ایمن شده وجود دارد. برای این منظور، طحال موش ایمن شده با رعایت شرایط استریل در زیر هود برداشته شد. توسط سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری حاوی محیط RPMI1640 و با سر سوزن ۲۵، محتویات سلولی طحال استخراج شد. این عمل تا تخلیه کلیه سلول‌های طحال چندین بار تکرار شد. برای از بین بردن اریتروسیت‌ها بر روی سوسپانسیون حاصله ۵ml کلریدآمونیم اضافه شد، سپس سانتریفیوژ گردید (۱۰mn، ۱۰g، ۲۰۰×) و سلول‌های حاصل سه بار توسط محیط RPMI1640 شستشو شدند.

روش فیوژن سلولی و هیبریدسازی: سلول‌های طحالی و Sp2/0 پس از شستشو به نسبت ۱۰ به ۲ با یکدیگر مخلوط گردید و با محیط کشت شستشو (RPMI) به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دور ۳۰۰g سانتریفیوژ گردید. مایع رویی به‌طور کامل برداشته شد و رسوب ته لوله با تکان‌های آرام به حالت تعلیق درآمد. یک میلی‌لیتر از پلی‌اتیلن گلیکول به‌صورت قطره‌قطره در یک دقیقه به سوسپانسیون سلولی اضافه شد و در دمای ۳۷ °C به مدت یک دقیقه قرار گرفت. سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت شستشو در ۵-۴ دقیقه به مخلوط سلولی اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۳۰۰g سانتریفیوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و سلول‌ها به محیط کامل حاوی هیپوگزانتین، آمینوپترین، تیمیدین (HAT) ۲ درصد منتقل شد. سپس به چاهک‌های پلیت به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی توسط سمپلر ۸ کاناله اضافه گردید و در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ °C قرار گرفت. مایع رویی چاهک‌هایی که زرد شده بودند برداشته شد تا غرابال توسط روش الایزا به شرح مذکور انجام گیرد.

قطع نخاع شد و در اتانول ۷۰ درصد قرار داده شد. سپس در زیر

روش تعیین تیتراژ آنتی‌بادی سرمی موش‌ها: به‌منظور پوشاندن چاهک‌های پلیت الایزا از Ag آماده شده به مقدار ۳۵ میکروگرم در ۱۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate buffered saline) حل شد و از سوسپانسیون حاصل بر هر چاهک در پلیت الایزا اضافه شد و به مدت ۲۰-۱۶ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس توسط بافر شستشو (PBS حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰) یک بار چاهک‌ها شستشو شدند. در مرحله بعد ۲۰۰ میکرولیتر از PBS حاوی ۲ درصد آلبومین سرم گاوی (BSA) در هر چاهک اضافه گردید طی ۲ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد عمل مسدودسازی صورت گرفت. سپس عمل شستشو انجام گرفت. ۱۰۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی ضدایمونوگلوبولین موشی (کونژوگه) در هر چاهک اضافه شد و انکوبه گردید و عمل شستشو انجام گرفت. سپس توسط سوبسترای تترامتیل بنزیدین (TMB) در محل تاریک انکوبه گردید. به کمک اسیدسولفوریک ۲ میلی‌مولار واکنش متوقف گردید و جذب چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ نانومتر و با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.

۴.۲. آماده‌سازی سلول‌های SP2/0 برای ادغام سلولی: از سلول‌های Sp2/0-Ag14 (IBRC C10106) که منشأ لنفوسیت B با ویژگی غیرتولیدکننده آنتی‌بادی هستند استفاده شد. از این سلول‌ها به‌صورت انبوه با توجه به نیاز کشت داده شد و به‌طور مداوم میزان رشد آنها بررسی گردید تا در شرایط مطلوب از کشت‌هایی که درصد سلول‌های زنده بیش از ۹۰ بود برای فیوژن استفاده شد.

روش کشت سلول‌های SP2/0: ۱۵ درصد از سرم جنین گاوی (FCS)، ۲ درصد ال-گلوتامین، به مقدار ۱ درصد پنی‌سیلین-استرپتوماکسین به آنها اضافه شد. سپس توسط محیط کشت RPMI - 1640 حجم محیط کشت کامل در زیر هود کشت به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید. سپس سلول‌های SP2/0 از نظر رشد و تکثیر و آلودگی کنترل گردید و به یک فلاسک کوچک حاوی محیط کشت کامل منتقل شدند. فلاسک‌های انتخابی برای انجام ادغام سلولی به‌طور مرتب و به‌موقع تعویض محیط و شمارش **۵.۲. طرز استخراج ماکروفاژها از صفاق موش سالم:** موش

از چاهک‌های ۹۶ خانه به ۲۴ خانه منتقل شدند و به تدریج تکثیر یافتند و به فلاسک‌های کوچک منتقل شدند. تعدادی از سلول‌های این مرحله در محیط مخصوص انجماد سوسپانسه گردید و در ازت مایع برای استفاده در آزمایش‌های بعدی نگهداری شدند.

۹.۲. روش محاسبات آماری: برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS با نسخه ۱۸ و از آزمون تی تست استفاده شد.

۱۰.۲. مقایسه تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های sp2/0 و ماکروفاژهای صفاقی) با فاکتورهای رشد بر روی هیبریدوماها: هیبریدهای حاصل از فیوژن ششم به ۲۱ پلیت ۶ خانه‌ای تقسیم شد که به ازای هر چاهک $2/5 \times 10^5$ /ml سلول قرار گرفت. به سه پلیت نخست محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد مایع رویی سلول‌های sp2/0 به مقدار ۱۵۰ میکرولیتر اضافه شد. به سه پلیت دوم محیط کشت کامل حاوی ۱۰ درصد مایع رویی سلول‌های ماکروفاژی صفاقی اضافه شد. به سه پلیت سوم به محیط کامل ترکیبی از مایع رویی (سلول‌های sp2/0 و سلول‌های ماکروفاژی) به میزان مساوی و به مقدار ۱۰ درصد ریخته شد و به سه پلیت چهارم محیط کشت کامل حاوی ۱ درصد سدیم پیرووات فاکتور رشد اضافه شد. در سه پلیت پنجم فقط از لایه فیدرلایر (2000cell/vel) استفاده شد. به سه پلیت ششم فاکتور رشد OPI اضافه شد و در نهایت به سه پلیت آخری تنها محیط کشت کامل جهت کنترل (شاهد) اضافه شد.

۳. یافته‌ها

۱۰.۳. ایمونیزاسیون موش‌ها: تیتراسیون سرم موش‌های ایمن شده به روش الیزا و توسط آنتی‌ژن پروماستیگوت لیثمانیا اینفنتوم (جداشده از یک بیمار در ایران) نشان داد که موش‌ها پس از دریافت سومین دوز آنتی‌ژن، آنتی‌بادی با تیتراژ مناسب علیه اشکال پروماستیگوتی لیثمانیا اینفنتوم تولید کرده‌اند. منحنی تیتراسیون سرم موش‌ها در مقایسه با موش ایمن نشده در شکل ۲ نشان داده شده است.

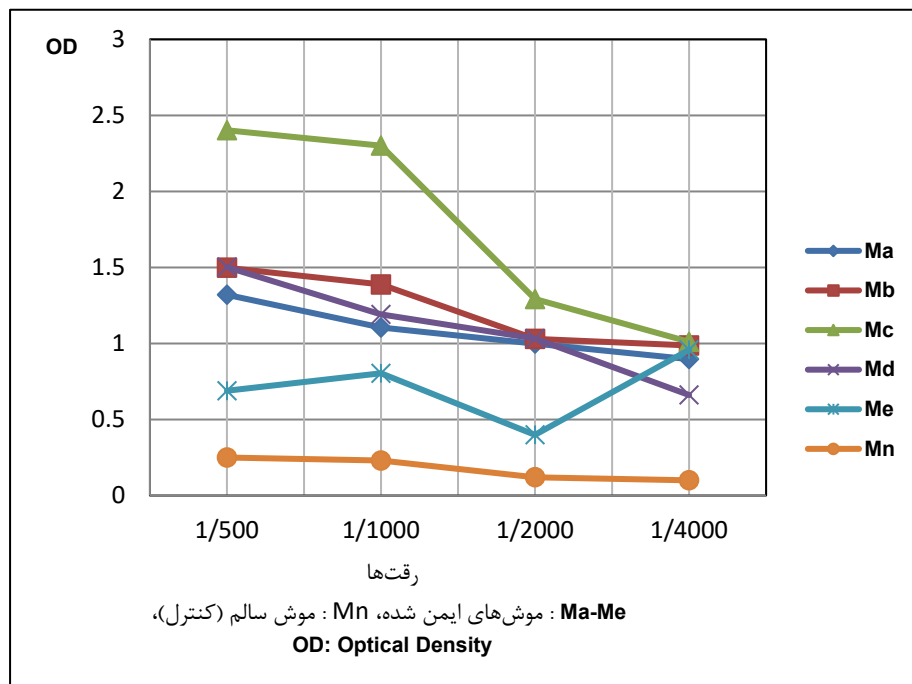
با توجه به نتایج منحنی تیتراسیون سرم موش‌ها، عیار آنتی‌بادی (OD) در سرم موش‌های BALB/c ایمن شده در چهار رقت مختلف (۱/۱، ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸) در موش C در مقایسه با چهار موش دیگر از همه بیشتر بود؛ یعنی تیتراژ آنتی‌بادی ۲/۵ بود؛ بنابراین موش C برای ادغام سلولی انتخاب گردید.

هود در شرایط استریل تشریح گردید و در حدود ۵ ml از محیط کشت RPMI (دمای 37°C) به داخل صفاق موش توسط سرنگ تزریق گردید. سپس مایع تجمع شده در صفاق را توسط سرنگ استریل دیگر کشیده و به فلاکس کوچک حاوی محیط کامل ریخته و در انکوباتور 37°C در مجاورت ۵ درصد CO_2 کشت داده شد.

۶.۲. طرز تهیه مایع رویی (supernatant) کشت سلول‌های SP2/0 و ماکروفاژهای صفاقی: سلول‌های مورد استفاده، SP2/0 و ماکروفاژهای صفاقی هر کدام به‌طور جداگانه با محیط کشت ARPMI-1640 (Gibco Co. UK)، (۱۰۰ U/ml) پنی‌سیلین و $100 \mu\text{g/ml}$ (استرپتومایسین) در حضور ۱۰ درصد FBS (Gibco Co. UK) در انکوباتور در دمای 37°C در مجاورت ۵ درصد CO_2 کشت داده شدند. سپس مایع رویی سلول‌ها دور ریخته و پس از دو بار شستشو توسط محیط کشت کامل طبق شرایط مذکور انکوبه شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت و در فاز ایستا سانتی‌فیوژ شد (به مدت پنج دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ rpm) مایع رویی حاصل از روسوب جدا گردید و از فیلتر ۲۲nm عبور داده شد.

۷.۲. انجام Limiting dilution برای ردیابی منوکلون‌های هیبریدوما: هیبریدوماها پس از تکثیر برای جداسازی منوکلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی آماده‌سازی شدند. کلون‌های مثبت از نظر تولید آنتی‌بادی اختصاصی انتخاب گردید. پس از شمارش، سوسپانسیون سلولی به‌حدی رقیق گردید که در یک میلی‌لیتر آن ده سلول وجود داشته باشد. در این صورت می‌توان با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر در هر چاهک در واقع یک سلول را به هر چاهک انتقال داد که اساس روش نهایی رقت را تشکیل می‌دهد. سپس ۵-۳ روز پس از انجام تکثیر سلولی پلیت‌ها یک روز در میان کنترل و در صورت لزوم تعویض محیط می‌شد و پس از گذشت حدود ۱۰ روز چنانچه فقط یک سلول در یک چاهک انتقال داده شده باشد یک توده سلولی در تمام فضای چاهک دیده خواهد شد ولی چنانچه دو سلول یا بیشتر در یک چاهک انتقال داده شده باشد، دو، سه یا چند توده سلولی در فضای چاهک مشاهده خواهد شد. پس از آنکه چاهک‌های حاوی منوکلون شناسایی شدند و به‌حدی از رشد رسیدند که مایع رویی چاهک زرد گردید نسبت به غربال آنها توسط روش مذکور اقدام می‌شد.

۸.۲. تکثیر سلول‌های هیبریدوما: سلول‌های مثبت مورد نظر



شکل ۲. مقایسه عیار آنتی‌بادی در سرم موش‌های ایمن شده با سرم موش سالم

میانگین تیتراژ آنتی‌بادی در رقت‌های مختلف در موش‌های ایمن شده، در موش c از همه بیشتر (۲/۵) و در موش e از همه کمتر (۰/۶۵) و در موش a متوسط (۱/۲۵)

6G2 FV, 8E6 8G8 FV از فیوژن پنجم، 7F6 FIV, 6C4 FIV, 5H10, 5G6 FVI, 8F4 FV, از فیوژن ششم هیبریدهای 8D2 FV, 6G2 FVI, FVI به ۲۴ خانه منتقل شدند و به تدریج تکثیر یافتند و به پلیت‌های شش‌شش‌خانه‌ای و از این پلیت‌ها به فلاسک‌های کوچک منتقل شدند. تعدادی از سلول‌های این مرحله برای انجام آزمایش برداشته شدند و بقیه در محیط مخصوص انجماد سوسپانسه شده و در ازت مایع نگهداری شدند. نتایج حاصل در جدول ۱ نشان داده شده است.

۲.۳. انتخاب هیبریدوماهای مولد آنتی‌بادی

ضد پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم: از بین هیبریدهای در حال رشد ۱۶ هیبرید که با آنتی‌ژن پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم واکنش مثبت قوی نشان داده بودند و عیار آنتی‌بادی بالاتری را داشتند انتخاب شدند و توسط Limiting dilution بررسی شدند. ساپ‌کلون‌های مورد نظر با آزمون الیزا مورد بررسی قرار گرفتند که شامل از فیوژن سوم 4G1, 4B4 F III, 1A4 F III، شامل از فیوژن چهارم، شامل 4C9 FIV, 1D6 FIV، F III، 8E4 F III، F III

جدول ۱. هیبریدهای مثبت حاصل از چهار فیوژن که بالاترین تیتراژ آنتی‌بادی (Ab) را دارند

فیوژن سوم		فیوژن پنجم		فیوژن چهارم		فیوژن ششم	
نام هیبرید	تیتراژ Ab	نام هیبرید	تیتراژ Ab	نام هیبرید	تیتراژ Ab	نام هیبرید	تیتراژ Ab
1A4 F III	۰/۷۱۹	6G2 FV	۱/۴۶۵	1D6 FIV	۰/۸۱۹	5G6 FVI	۱/۱۶۳
4B4 F III	۰/۷۴۵	8E6 FV	۰/۹۹۸	4C9 FIV	۰/۸۰۱	5H10 FVI	۱/۱۰۷
4G1 F III	۰/۷۴۸	8F4 FV	۰/۹۹۹	6C4 FIV	۰/۸۵۰	6G2 FVI	۱/۱۹۲
8E4 F III	۰/۶۹۲	8G8 FV	۰/۹۹۴	7F6 FIV	۰/۸۵۸	8D2 FVI	۱/۵۱۵

فیوژن ششم: FVI، فیوژن سوم: F III، فیوژن چهارم: FIV، فیوژن پنجم: FV، تیتراژ آنتی‌بادی (Ab)

که در هر چاهک یک یا نیم کلون قرار گرفت و در پلیت‌های حاوی محیط کشت با بستر Feeder layer و فاکتورهای رشد کشت داده شدند.

با این روش تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی مونوکلنال مجزا شدند. جدول ۲ نتایج تکثیر هیبریدوماها برای جداسازی تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی توسط روش حد نهایی رقت را نشان می‌دهد.

۳.۲. انجام حد نهایی رقت ۱ برای ردیابی تک‌کلون‌های

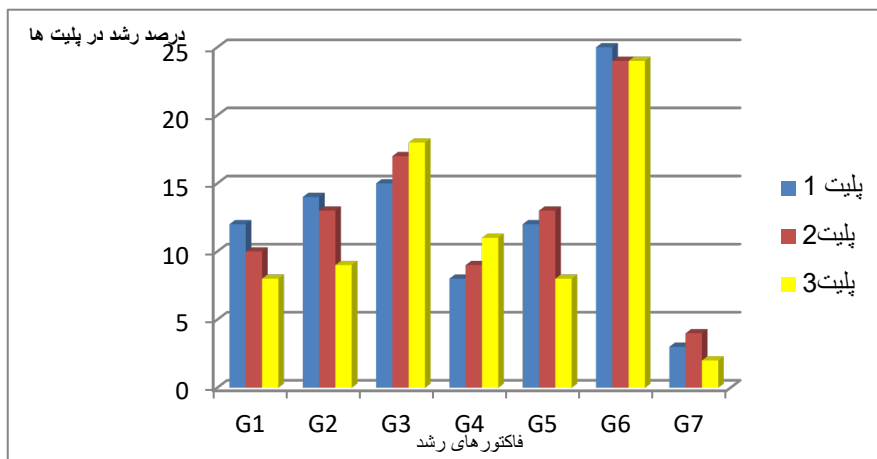
هیبریدوما: هیبریدوماها پس از تکثیر برای جداسازی تک‌کلون‌های تولیدکننده آنتی‌بادی آماده‌سازی شدند. برای این منظور، کلون‌های مثبت از فیوژن‌های پنجم و ششم که از نظر تولید آنتی‌بادی اختصاصی نسبت به سایر کلون‌ها تیر آنتی‌بادی بیشتری داشتند انتخاب شدند و پس از تهیه سوسپانسیون یکنواخت با روش Limiting dilution رقت داده شدند به طوری

جدول ۲. نتایج انجام روش حد نهایی رقت برای ردیابی تک‌کلون‌های هیبریدوما

هیبرید مثبت 8D2 FVI				هیبرید مثبت 6G2 FV			
تیتراژ Ab	نام منوکلن	تیتراژ Ab	نام منوکلن	تیتراژ Ab	نام منوکلن	تیتراژ Ab	نام منوکلن
۱/۵۱۰	8D2 FVI6	۰/۸۹۸	8D2 FVI1	۰/۸۸۹	6G2 FV6	۰/۸۹۰	6G2 FV1
۰/۹۹۰	8D2 FVI7	۰/۹۰۹	8D2 FVI2	۰/۹۰۰	6G2 FV7	۰/۹۸۹	6G2 FV2
۰/۸۸۸	8D2 FVI8	۱/۱۲۳	8D2 FVI3	۰/۸۹۵	6G2 FV8	۱/۱۱۲	6G2 FV3
۰/۷۶۹	8D2 FVI9	۰/۹۹۹	8D2 FVI4	۰/۷۸۸	6G2 FV9	۱/۰۱۰	6G2 FV4
۰/۵۶۷	8D2 FVI10	۰/۹۹۰	8D2 FVI5	۰/۷۷۷	6G2 FV10	۰/۸۹۹	6G2 FV5

و مادر گروه‌های G3 و G6 از همه بیشتر است؛ این نشان‌دهنده آن است که مایع رویی (سلول‌های sp2/0 و سلول‌های ماکروفاژی) از نظر تأثیر با فاکتور رشد OPI قابل مقایسه هستند.

نتایج مقایسه تأثیر مایع رویی کشت سلول‌های (sp2/0 و ماکروفاژهای صفاقی) با فاکتورهای رشد بر روی هیبریدوماها: با توجه به شکل ۳، درصد رشد سلول‌های هیبرید



(G1) ۱۰ درصد مایع رویی سلول‌های SP2/0 (G4) ۱ درصد سدیم پیرووات
 (G2) ۱۰ درصد مایع رویی سلول‌های ماکروفاژهای صفاقی (G5) لایه فیدر لایر (2000cell/vel)
 (G3) ۱۰ درصد مایع رویی سلول‌های (ماکروفاژهای صفاقی و OPI (G6)
 (G7) محیط کشت کامل (کنترل بدون فاکتور رشد)

در هر گروه ۳ پلیت ۶ خانه‌ای

در هر چاهک $10^5 \times 2/5$ سلول هیبریدوما

در هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر محیط کشت کامل

شکل ۳. مقایسه تأثیر مایع رویی (سلول‌های ماکروفاژهای صفاقی و SP2/0) با فاکتورهای مختلف رشد بر روی سلول‌های هیبریدوماها

۴. بحث و نتیجه‌گیری

از سال ۱۹۷۵ یعنی زمانی که کوهر و ملیشتاین^۱ آنتی‌بادی مونوکلنال را کشف کردند پیشرفت سریعی در زمینه تکنولوژی هیبریدوما و کاربرد آنتی‌بادی مونوکلنال به وجود آمده است. همچنین Pan و McMahon-Pratt در سال ۱۹۸۸ آنتی‌بادی مونوکلونی را علیه آماستیگوت‌های لیشمانیا پیفانوئی تهیه کردند [۱۱] و در سال ۲۰۰۴ Froes و همکارانش آنتی‌بادی مونوکلونی را علیه آماستیگوت‌های لیشمانیا شاگاسی تهیه کردند [۱۲].

تاکنون مونوکلنال آنتی‌بادی اختصاصی گونه‌های لیشمانیا مکزیکانا، برازیلیانسیس و کمپلکس تروپیکا و دونووانی برای استفاده در تشخیص ایمنی و تقسیم‌بندی تاکسونمی گونه‌های لیشمانیا تولید شده است [۱۳-۱۷]. با توجه به مطالعات مختلفی که روی آنتی‌ژن‌های گونه‌های مختلف لیشمانیا صورت گرفته است اطلاعات کمی در مورد لیشمانیا اینفنتوم موجود است. با این حال با اطلاعات موجود در شبکه، تاکنون مونوکلنال آنتی‌بادی اختصاصی علیه فرم پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم سویه ایران تهیه نشده است؛ بنابراین تهیه مونوکلنال آنتی‌بادی اختصاصی علیه فرم پروماستیگوتی لیشمانیا اینفنتوم سویه ایرانی بسیار ضروری به نظر می‌رسد.

در این تحقیق ۱۲ فیوژن انجام گرفت که نتایج چهار فیوژن موفقیت‌آمیز بود. چهارمین، پنجمین و ششمین ادغام‌های سلولی همراه با موفقیت بود و منجر به دستیابی کلون‌های متعدد گردید. حدود ۱۰ درصد از چاهک‌ها مربوط به هر پلیت ۹۶ خانه‌ای حاوی کلون‌های مثبت بود که درصد مناسبی است. کلون‌های با جذب بالا در واکنش با آنتی‌ژن پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم برای تکثیر به روش حد نهایی رقت انتخاب گردیدند. هیبریدهایی که تیتراژ آنتی‌بادی‌های آنها بالای یک بود شناسایی شدند (6G2 FV3، 8D2 FVI6، 8D2 FVI3، 6G2 FV4) و برای آزمایش‌های بعدی در تانک ازت نگهداری شدند.

تأثیرات برخی از تکنیک‌های کاربردی طراحی شده به ترتیب به شرح زیر مورد بحث قرار می‌گیرد. یکی از این تکنیک‌ها که در تسریع تکثیر سلول‌های هیبریدوما و افزایش تولید آنتی‌بادی مونوکلنال مؤثر است، بررسی نقش مایع رویی کشت سلول‌های (sp2/0) و ماکروفاژی‌های صفاقی) روی هیبریدهای حاصل از فیوژن است. شکل ۳ نشان می‌دهد که رشد سلول‌های هیبریدوما در گروه‌های G3 و G6 در مقایسه با سایر گروه‌ها از همه بیشتر است. این نتایج نشان‌دهنده آن است که مایع رویی (سلول‌های sp2/0 و

سلول‌های ماکروفاژی) اگر ترکیبی مورد استفاده قرار گیرند اثرات بیشتری دارند و با فاکتور رشد OPI قابل مقایسه هستند. در این تکنیک نکته قابل توجه دیگر این است که در سه پلیت سوم که محیط کامل حاوی ترکیبی از مایع رویی کشت سلول‌های (sp2/0) و ماکروفاژی‌های صفاقی) در مقایسه با G6 که محیط کامل حاوی فاکتور رشد OPI بود هیبریدوماها برعکس حالت عادی که معمولاً طی ۵ روز افزایش می‌یافتند طی ۷ روز افزایش نشان دادند یعنی سه روز دیرتر رشد کردند و تعداد آنها نیز بیشتر از تعداد هیبریدها نسبت به حالت عادی بود (۳۵ درصد در برابر ۲۵ درصد)؛ پس می‌توان نتیجه گرفت که ترکیب مایع رویی کشت سلول‌های (sp2/0) و ماکروفاژی‌های صفاقی) از نظر تأثیر با فاکتور رشد OPI یکسان هستند با این تفاوت که فاکتور رشد OPI در مقایسه با آن سه روز زودتر سبب تکثیر هیبریدها می‌گردد. نتایج ما با این روش با نتایج به دست آمده از مطالعه wu و همکارانش و میرجلیلی و مجیدی و سایر محققان قابل مقایسه می‌باشد (۵۹). این تکنیک سه بار روی هیبریدهای حاصل از عمل فیوژن تکرار شد که نتایج مشابهی حاصل گردید.

نکته دیگری که در این تکنیک جلب توجه می‌کرد این بود که مایع رویی کشت سلول‌های (sp2/0) و ماکروفاژی‌های صفاقی) زمانی بیشتر مؤثر بودند که سلول‌های مذکور در فاز ایستا بودند و برای تأیید این فرایند تأثیر مایع رویی سلول‌هایی که در فاز ایستا بودند با سلول‌هایی که در فاز ایستا نبودند بر روی سلول‌های هیبریدوما مقایسه شد و این عمل نیز سه مرحله تکرار گردید که نتیجه شمریخی را داشت و از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). به نظر می‌رسد در فاز ایستا برخی فاکتورهای رشد ترشح می‌شود و این امر سبب غنی شدن محتویات مایع رویی سلول‌ها می‌شود. مشکل موجود در استفاده از سلول‌های ماکروفاژی‌های صفاقی، تعداد اندک این سلول‌ها است که در اصل در حالت عادی تعداد آنها کم می‌باشد اما توسط گلیکولولت می‌توان آنها را تهییج کرد [۱۸].

در سال ۲۰۰۶ Tang و همکاران در خصوص تأثیر مایع رویی کشت سلول‌ها گزارش دادند که مایع رویی کشت سلول‌های اپیتلیال پوست و اندوتلیال ورید ناف انسان، باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت می‌گردند و نیز باعث بهبود فنوتیپ و عملکرد سلول‌ها در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند [۱۹] که این امر در مطالعه ما روی سلول‌های هیبریدوما صورت گرفته است. از سوی دیگر از آنجا که در کار این محققان بررسی

مطمئن می‌باشد؛ بنابراین در این تحقیق بررسی تأثیر سوپرناتانت کشت سلولی (SP2/0 - ماکروفاژهای صفاقی) بر روی سلول‌های هیبریدومای مولد آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به‌عنوان فاکتور رشد، ضروری به‌نظر می‌رسد.

دلایلی که انگیزه تحقیق ما را تقویت می‌کند تولید نشدن آنتی‌بادی مونوکلونال علیه فرم پروماستیگوت لیشمانیا اینفنتوم در ایران است و نیز در حال حاضر زمینه‌هایی از تحقیق و تشخیص وجود دارد که بدون آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انجام آنها ممکن نیست.

با توجه به نتایج مطالعه حاضر بر روی سلول‌های حاصل از فیوزن، مایع رویی تهیه شده از کشت سلول‌های SP2/0 و ماکروفاژهای صفاقی موش را می‌توان برای طراحی و تهیه فاکتور رشد مؤثر برای تکثیر هیبریدها گام برداشت.

تشکر و قدردانی

این تحقیق منتج از طرح پژوهشی با کد ۲۴۵۴ با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه محقق اردبیلی انجام شد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی سپاسگزاریم.

روی سلول‌های دندریتیک مشتق از مونوسیت، انجام پذیرفته است در این مطالعه فقط از نظر تأثیر مایع رویی کشت سلول‌ها قابل بیان می‌باشد.

در این تحقیق ۱۲ منوکلون تیترا آنتی‌بادی مطلوبی را داشتند. در مقایسه با کار سایر محققان نتایج ما از نظر تعداد منوکلون به‌دست‌آمده اختلاف دارد و این اختلاف چشم‌گیر را می‌توان به دلیل به‌کار بردن استراتژی‌های نوین کاربردی ما و همچنین گستردگی آن روش‌ها دانست که در مطالعه آنها از این روش‌ها استفاده نشده است. ساختن آنتی‌بادی مونوکلونال علیه پروماستیگوت‌های لیشمانیا اینفنتوم از این نظر مهم است که کاربرد در تعیین گونه لیشمانیا، تشخیص مستقیم آن در زخم، مفید واقع می‌گردد [۲۰، ۲۱]. در فیوزن سلولی، برای تولید هیبرید یکی از موارد بسیار ضروری وجود فاکتور رشد قوی است که در صورت نبود، آن تولید هیبریدوما امری مشکل می‌باشد [۲۲، ۲۳]. سلول‌های هیبریدوما معمولاً در محیط کشت غنی بهتر رشد می‌کنند. فاکتورهای رشدی که از خارج از کشور وارد می‌شوند نظیر OPI و سدیم پیرووات، اولاً بسیار گران هستند ثانیاً تهیه آنها از خارج سخت و زمان‌بر است. برای اینکه تولید آنتی‌بادی‌های منوکلونال مقرون‌به‌صرفه باشد می‌توان فاکتورهای رشد بیولوژیکی را جایگزین فاکتورهای رشد شیمیایی کرد. استفاده از این ماده به‌عنوان فاکتور رشد، کم‌هزینه، روش آسان و کاربردی، ایمن و

References

- [1]. Assefa A. Leishmaniasis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis of prevalence in animals and humans. *Heliyon*. 2018; 4(8):723-731.
- [2]. Abrham A, Zewdu S. A Review on Canine Leishmaniasis; Etiology, Clinical Sign, *Global Veterinaria*. 2016; 17 (4): 343-352.
- [3]. Raul R R, et al. Canine Leishmaniasis: An Overview of the Current Status and Strategies for Control. *BioMed Research International*. 2018; 2018: 26:1-12.
- [4]. Oryan, A., Akbari M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2016; 9(10): 925-932.
- [5]. Andréia P T, Tayse D. S, Tatiane A P, Renato L S. Sexual and vertical transmission of visceral leishmaniasis. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2014; 8(4):403-7.
- [6]. Gashaw E, Debalke D, Aman E, Emim B. Review on Leishmaniasis. *Journal of American Science*. 2018; 142: 67-73.
- [7]. Iatta R, Furlanello T, Colella V, Tarallo V, Latrofa M, Brianti E, et al. A nationwide survey of Leishmania infantum infection in cats and associated risk factors in Italy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13: e0007594.
- [8]. Cantos-Barreda A, Navarro R, Pardo-Marín L, Martínez-Subiela S, Ortega E, Cerón JJ, et al. Clinical leishmaniasis in a captive Eurasian otter (*Lutra lutra*) in Spain: a case report. *BMC Vet Res*. 2020; 16:312.
- [9]. Dong, S.; Zhang, C.; Liu, Y.; Zhang, X.; Xie, Y.; Zhong, J.; Xu, C.; Liu, X. Simultaneous production of monoclonal antibodies against *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry1 toxins using a mixture immunization. *Anal. Biochem*. 2017; 531, 60-66.
- [10]. Gao, Y.; Huang, X.; Zhu, Y.; Lv, Z. A brief review of monoclonal antibody technology and its representative applications in immunoassays. *J. Immunoass. Immunochem*. 2018; 39, 351-364.
- [11]. Pan AA, McMahon-Pratt D. Monoclonal antibodies specific for the amastigote stage of *Leishmania pifanoi*. I. Characterization of antigens associated with stage- and species-specific determinants. *J Immunol*. 1988; 140(7):2406-14.
- [12]. Froes AM, Santos CVD, Penha-Filho ML, Teixeira MCA et al. Sub-clinical infection as an effective protocol for obtaining anti-*Leishmania chagasi* amastigote antibodies of different animal species. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004; 99: 135-141.
- [13]. He, K.; Mao, Q.; Zang, X.; Zhang, Y.; Li, H.; Zhang, D. Production of a broad-specificity monoclonal antibody and application as a receptor to detection amatoxins in mushroom. *Biologicals*. 2017; 49, 57-61.
- [14]. Jose F. Santos-Neto, Fabricia O. Technological Advancements in Monoclonal Antibodies. *Hindawi*. 2021; 2021:1-19.
- [15]. Listek M, Hönow A, Gossen M, Hanack K. A novel selection strategy for antibody producing hybridoma cells based on a new transgenic fusion cell line. *Sci. Rep*. 2020; 10 (1): 1664.
- [16]. Mendoza-Roldan, J.A.; Otranto, D.; Zatelli, A. Clinical, haematological and biochemical findings in tigers infected by *Leishmania infantum*. *BMC Vet. Res*. 2020; 16: 214.
- [17]. Azami-Conesa, I.; Martínez-Díaz, R.A.; González, F.; Gómez-Muñoz, M.T. First Detection of *Leishmania infantum* in Common Urban Bats *Pipistrellus pipistrellus* in Europe. *Res. Vet. Sci*. 2020; 132: 172-176.
- [18]. Kuppeveld, B.L. Haagmans, F. Grosveld, B.J. Bosch. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun*. 2020; 11 (1): 2251.
- [19]. Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10. *Blood* 2006; 108(4):1189-97.
- [20]. Zaroff S, Tan G. Hybridoma technology: the preferred method

- for monoclonal antibody generation for in vivo applications. *Biotechniques*.2019; 67 (3) : 90-92.
- [21]. De Almeida R, Nakamura CN, De Lima Fontes M et al. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. *MAbs*.2018; 10(1): 46-54.
- [22]. Watabe I , Kuwabara T. "Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies," *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*.2019;34 (1): 64-70.
- [23]. Grilo AL, Mantalaris A. The increasingly human and profitable monoclonal antibody market. *Trends Biotechnol*. 2019;37(1): 9-16 .