خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۹ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۱ (۱۲۱-۱۰۸)

مقاله پژوهشی

عوامل تأثیرگذار در ایمنی‌زایی علیه آنتی‌ژن گروه خونی Kell در محیط کشت

فاطمه توبه‌یانی[۱]، سعیده میلانی[۲]، فاطمه یاری[۳]

چکیده

سابقه و هدف

ایمنی‌زایی در آزمایشگاه، امکان‌پذیر می‌باشد. در این روش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، جداسازی شده و با فاکتورهای لازم جهت ایمنی‌زایی در محیط کشت مواجه می‌شوند. در این مطالعه، به دنبال شناخت فاکتورهای مختلف و عوامل دخیل در فرآیند ایمنی‌زایی لنفوسیت‌های B در آزمایشگاه به عنوان مرحله مقدماتی در ایجاد آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌ژن گروه خونی Kell بودیم.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، آنتی‌ژن Kell از کیسه‌های خون کامل $Kell^+$ جداسازی و تخلیص شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از کیسه‌های خون کامل $Kell^-$ با استفاده از روش گرادیان دانسیته، جداسازی شدند و پس از مواجهه با ال ـ لوسیل ال ـ لوسین متیل استر، با کلیه فاکتورهای لازم جهت ایمنی‌زایی در محیط کشت با غلظت مناسب از آنتی‌ژن، ادجوانت و سیتوکاین‌های اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما مواجه گردیدند. پس از ۱۱-۷ روز، سوپ‌روبی سلول‌ها از نظر تولید آنتی‌بادی با روش حساس الایزا بررسی شدند.

یافته‌ها

مطلوب‌ترین شرایط کشت به منظور ایجاد ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی اختصاصی Anti-Kell ، مواجهه سلول‌های تک هسته‌ای با غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار LLME و به کارگیری ۱۰۰۰-۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر آنتی‌ژن Kell به همراه ۱۰ میکرولیتر MLC (Mix lymphocyte culture) است. میانگین جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر که بیانگر تولید آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن Kell می‌باشد، در این حالت ۰/۰۳ ± ۲/۰۵۲ به دست آمد.

نتیجه گیری

بر اساس مطالعه انجام شده، انجام ایمنی‌زایی در محیط کشت علیه آنتی‌ژن Kell امکان‌پذیر می‌باشد و می‌توان با به کارگیری عوامل مختلف، تحریک سلول‌های تولیدکننده Anti-Kell در محیط کشت را بهینه سازی کرد.

کلمات کلیدی: ایمنی‌زایی، آنتی‌بادی، سیستم گروه خونی Kell

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۲۷
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۲۲

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD زیست فناوری ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- مؤلف مسئول: PhD ایمونولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

مقدمه

آنتی‌بادی‌ها، مولکول‌های گلیکوپروتئینی هستند که به وسیله پلاسما سل و در پاسخ به آنتی‌ژن تولید می‌شوند. آنتی‌بادی‌های مونوکلونال گروهی از آنتی‌بادی‌ها با ویژگی یکسان هستند که توسط کلون یکسان از سلول‌های B بر علیه یک آنتی‌ژن خاص تولید می‌شوند و به اپی‌توپ‌های مشابه اتصال می‌یابند(۱).

آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در زمینه‌های مختلف هم‌چون تحقیقات، تشخیص و درمان مورد توجه هستند(۲). بنابراین به منظور رسیدن به این اهداف، دستیابی به کلون‌های سلولی تولید کننده آنتی‌بادی اختصاصی برای آنتی‌ژن مورد نظر با افینیتی بالا ضروری می‌باشد. تاکنون روش‌های مختلفی برای تولید این آنتی‌بادی‌ها استفاده شده است(۶-۳).

ایمنی‌زایی، مرحله مقدماتی در تمامی این روش‌ها می‌باشد که به شیوه‌های مختلفی انجام می‌شود. یکی از این شیوه‌ها، ایمنی‌زایی در آزمایشگاه(*In vitro* immunization, IVI) می‌باشد. در این روش، سلول‌های ایمنی از سلول‌های خون محیطی جداسازی می‌شوند و در آزمایشگاه به وسیله آنتی‌ژن مورد نظر تحریک می‌شوند. در نتیجه لنفوسیت‌های B تولیدکننده آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن القا می‌شوند. سپس سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی با سلول‌های میلومایی فیوژ می‌شوند تا هیبریدوما شکل بگیرد. طی این فرآیند، سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی نامیرا شده و به صورت مداوم آنتی‌بادی ترشح می‌کنند. روش مبتنی بر IVI ، برای تولید انواع زیادی از آنتی‌بادی‌ها از جمله آنتی‌بادی‌هایی که برای ایمیونیزاسیون در *in vivo* دچار مشکل هستند، پتانسیل زیادی را نشان داده است. عدم نیاز به تزریق آنتی‌ژن به حیوانات، یکی دیگر از مزایای این روش می‌باشد. بی‌نیاز شدن از ایجاد حیوان خانه و هم‌چنین حذف فرآیندهای پیچیده انسانی کردن یا کایمریزاسیون از مزایای این روش می‌باشد(۷).

روش ایمیونیزاسیون در آزمایشگاه، به طور معمول مدت کوتاهی(در حدود پنج روز) در مقایسه با چندین هفته فرآیند ایمیونیزاسیون در موش زمان می‌برد. هم‌چنین این روش مقادیر ایمونوژن بسیار کمی لازم دارد، به طور معمول کمتر از یک میکروگرم آنتی‌ژن کفایت می‌کند. علاوه بر موارد ذکر شده، این روش در مقایسه با روش ایمیونیزاسیون *in vivo* تکرارپذیری بالاتری دارد و هم‌چنین دستیابی به آنتی‌بادی از جنس IgM به واسطه این روش آسان‌تر از روش *in vivo* می‌باشد. در روش استفاده از لنفوسیت‌های B فرد آلوایمیونیزه شده و سپس نامیرا کردن آن نیز محدودیت‌هایی از جمله در دسترس نبودن این افراد برای نمونه‌گیری وجود دارد. هم‌چنین این روش برای تمامی گروه‌های خونی قابل استفاده نمی‌باشد و تنها برای آنتی‌ژن‌هایی قابل استفاده است که قبلاً در افراد ایجاد ایمنی‌زایی کرده‌اند و لنفوسیت‌های B این افراد در پاسخ به آن آنتی‌ژن تحریک شده‌اند(۸).

همان طور که گفته شد یکی از کاربردهای آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در بخش تشخیص می‌باشد که از جمله مهم‌ترین آن‌ها تعیین گروه‌های خونی است. امروزه به منظور تعیین گروه‌های خونی مختلف از آنتی‌بادی‌های اختصاصی در بانک خون استفاده می‌شود(۱۰، ۹).

بیماران مبتلا به انواع هموگلوبینوپاتی به خصوص بیماران تالاسمی، نیازمند دریافت خون و فرآورده‌های مشتق از آن هستند. این امر به طور معمول باعث شکل‌گیری آنتی‌بادی‌های آلوایمیون در این بیماران می‌گردد. به دلیل حضور این آلوآنتی‌بادی‌ها در بدن بیمار شانس پیدا کردن خون سازگار برای تزریق‌های آینده کاهش پیدا می‌کند. یکی از راه‌کارهای جلوگیری از این امر، تشخیص دقیق گروه‌های خونی پیش از تزریق خون و فرآورده‌های مشتق از خون می‌باشد(۱۲، ۱۱).

آنتی‌ژن‌های سیستم گروه خونی Kell بعد از آنتی‌ژن‌های گروه خونی ABO و Rh، ایمنی‌زایی بیشتری در بین آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی دارند. تشکیل آنتی‌بادی‌های این سیستم گروه خونی در بدن، می‌تواند منجر به کم خونی همولیتیک شدید نوزادی و ایجاد واکنش همولیتیک تزریق خون گردد(۱۳). آنتی‌بادی‌ها بر علیه آنتی‌ژن‌های گروه خونی Kell در مبتلایان به تالاسمی شایع می‌باشد، از این جهت تعیین گروه خونی Kell از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد(۱۵، ۱۴).

این مطالعه به منظور شناخت فاکتورهای مختلف و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

عوامل دخیل و مؤثر در فرآیند ایمیونیزاسیون لنفوسیت‌های B در آزمایشگاه و هم‌چنین بهینه‌سازی این روش به عنوان مرحله مقدماتی در ایجاد آنتی‌بادی برای تشخیص آنتی‌ژن سیستم گروه خونی Kell انجام شد.

مواد و روش‌ها

مطالعه از نوع تجربی بود. در این مطالعه از دو کیسه خون کامل فاقد آنتی‌ژن Kell جهت جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و دو کیسه گلبول قرمز فشرده حاوی آنتی‌ژن Kell، جهت جداسازی آنتی‌ژن Kell استفاده شد. تمام کیسه‌های خون از پایگاه انتقال خون استان تهران (مرکز وصال) و به پیوست رضایت نامه‌ای که از اهداکنندگان جهت انجام مطالعه‌های پژوهشی اخذ شده است، تهیه شدند. فقدان یا حضور آنتی‌ژن Kell در این کیسه‌ها به وسیله آزمایش‌های سرولوژی با کمک آنتی‌سرم‌های اختصاصی Anti-K در آزمایشگاه سرولوژی پایگاه انتقال خون تهران تأیید شد.

جداسازی و تخلیص آنتی‌ژن Kell:

از روش شبح سلولی به منظور محلول‌سازی آنتی‌ژن‌های Kell متصل به غشای گلبول‌های قرمز استفاده شد. در این روش، پس از سانتریفیوژ گلبول قرمز $Kell^+$ در دور ۶۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه و دور ریختن پلاسما، هم حجم خون باقی‌مانده، بافر فسفات سالین(PBS) افزوده و مجدداً سانتریفیوژ شد. بعد از حذف بافر PBS و افزودن مجدد بافر، طی چند روز سلول‌ها چند مرتبه فریز و ذوب شدند که منجر به آزادسازی هموگلوبین از گلبول‌های قرمز و ایجاد شبح سلولی شد. در نهایت پس از حذف هموگلوبین، ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی ۱۵۰ میلی مولار NaCl ، ۲۵ میلی‌مولار تریس، ۱۰ میلی‌مولار ضد انعقاد EDTA ، ۲ میلی‌مولار PMSF و ۱ درصد Nanident P40 (NP40)، به هر لوله فالکون اضافه شد و ۲ تا ۳ ساعت روی روتاتور قرار گرفت و پس از آن در دور ۴۴۰۰rpm سانتریفیوژ شد. سپس به منظور تغییر محیط، سوپ رویی به غشای دیالیز منتقل شد و غشا در بشر حاوی بافر PBS یک شب گذاشته شد. روز بعد محلول داخل غشای دیالیز جمع‌آوری و ذخیره شد.

به منظور تهیه ستون کروماتوگرافی ژل سفارز B ۴ دارای گروه‌های فعال سیانوژن برماید آماده‌سازی شد. در ادامه آنتی‌بادی Anti-Kell به گروه‌های فعال ژل متصل و به ستون اضافه شد. بعد از جداسازی اتصالات سست به وسیله گلایسین ۰/۲ مولار، با افزودن دی‌اتانول آمین ۰/۰۵ مولار جایگاه‌های خالی اشغال شد. نمونه حاوی آنتی‌ژن Kell رقیق شده با PBS هم حجم از ستون عبور داده شد. با چندین مرتبه شستشوی ستون با PBS ، اجزای متصل نشده یا اتصالات سست و غیر اختصاصی خارج شدند.

سپس جداسازی آنتی‌ژن با افزودن گلایسین صورت گرفت: قبل از شروع جداسازی، به هر لوله ۵۰ میکرولیتر بافرتریس با غلظت ۲ مولار و pH برابر ۸ ، به منظور خنثی‌سازی pH اسیدی گلایسین، اضافه گردید. جذب نوری در طول موج ۲۸۰ نانومتر خوانده شد. در انتها، آنتی‌ژن تخلیص شده توسط ستون تغلیظ با منفذهایی کوچکتر از ۵۰۰۰ دالتون تغلیظ گردید.

تعیین غلظت آنتی‌ژن Kell و تأیید ویژگی آن:

از روش برادفورد به منظور تعیین غلظت آنتی‌ژن استفاده شد. غلظت‌های استاندارد BSA تهیه شد. ۲۰۰ میکرولیتر محلول برادفورد به ۱۰ میکرولیتر از محلول‌های استاندارد و هم‌چنین ۱۰ میکرولیتر از نمونه آنتی‌ژن افزوده شد. پس از تغییر رنگ محلول‌ها، جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر توسط دستگاه نانودراپ قرائت شد. به منظور تایید ویژگی آنتی‌ژن Kell ، پلیت‌های کوت شده با این آنتی‌ژن آماده‌سازی شد. به این منظور به تعدادی از چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن Kell تغلیظ شده با غلظت ۱۰۰۰–۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و به تعدادی دیگر میزان ۵۰ میکرولیتر آلبومین گاوی به عنوان چاهک کنترل منفی افزوده شد. بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در یخچال، ۱۰۰ میکرولیتر محلول آلبومین گاوی به منظور بلاک کردن جایگاه‌های خالی به هر چاهک اضافه شد. بعد از یک هفته نگهداری در یخچال چاهک‌ها تخلیه، در معرض هوا کاملاً خشک و برای الایزا آماده شدند.

میزان ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌بادی‌های Anti-Kell AEK4

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

(آلمان، ایمونودیاگنوستیکا) و Anti-Kell MS56 (آلمان، ایمونودیاگنوستیکا) به چاهک‌ها افزوده شد، پس از ۴۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و انجام ۳ مرتبه شست و شو با بافر PBS-Tween به هر چاهک، ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه(ایران، ابن‌سینا) افزوده شد. پس از ۴۰ دقیقه انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شست‌وشو، میزان ۵۰ میکرولیتر از محلول کروموژن تترامتیل بنزیدین(TMB) افزوده شد. بعد از مدت ۲۰ دقیقه، ۳۰ میکرولیتر از محلول متوقف‌کننده به هر چاهک اضافه و با دستگاه الایزا ریدر میزان جذب در طول موج ۴۵۰ نانومتر خوانده شد.

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی:

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با روش گرادیان دانسیته انجام گرفت. ۵ میلی‌لیتر خون کامل فاقد آنتی‌ژن Kell ، ۵ میلی‌لیتر بافر فسفات و ۵ میلی‌لیتر فایکول(ایران، بهار افشان) افزوده شد. لوله فایکول به مدت ۲۰ دقیقه با ۵۰۰g سانتریفیوژ شد. ابر سلولی ایجاد شده جداسازی شد. به منظور حذف اثر سمی فایکول، سلول‌های جداشده سه مرتبه با بافر فسفات به ترتیب در دور g ۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه، g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه و g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و شسته شدند. میزان ۱۰ میکرولیتر از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با ۱۰ میکرولیتر رنگ تریپان‌بلو مخلوط شد. در ادامه ۱۰ میکرولیتر از محلول نهایی برداشته و روی لام نئوبار قرار داده شد و تعداد سلول‌های تک هسته‌ای شمارش شد.

کشت سلولی:

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی جدا شده از مرحله قبلی به وسیله محیط کشت RPMI به حجم ۲ میلی‌لیتر رسید. سپس ال ـ لوسیل ال ـ لوسین متیل استر به منظور حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی به محلول افزوده و ۴۰ دقیقه زیر هود انکوبه شد. سلول‌ها ۳ مرتبه در دور g ۴۰۰ و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و شسته شدند. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در محیط کشت RPMI حاوی ۱۰درصد FBS ، ۱ درصد ال-گلوتامین و ۱ درصد مخلوط آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین با عوامل مورد بررسی در مطالعه مواجه شدند. این عوامل شامل: آنتی‌ژن Kell محلول استریل(غلظت ۱۰۰۰-۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر)، گلبول قرمز $Kell^+$ تهیه شده در مراحل قبل(در حجم ۲۰ میکرولیتر) و هم‌چنین عوامل تقویت‌کننده تحریک ایمنی شامل سیتوکاین‌های اینترلوکین ۴ و اینترفرون گاما(غلظت ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر)، MLC (در حجم ۱۰ میکرولیتر) و CpG الیگودئوکسی نوکلئوتید(۳-۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) می‌باشند. پلیت کشت داده شده در انکوباتور CO_2 دار، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ تا ۱۱ روز انکوبه شد.

به منظور بررسی تأثیر به کارگیری ال-لوسیل ال-لوسین متیل استر در حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی و هم‌چنین انتخاب غلظت مناسب‌تر از این ماده برای کشت در مراحل بعدی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مجاورت دو غلظت مختلف از این ماده و در شرایط کشت مختلف کشت داده شدند. تعداد سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در این مرحله، ۱۵۶۰۰۰۰ سلول در هر یک میلی‌لیتر شمارش شد. این سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مجاورت ۲۰ میکرولیتر LLME (غلظت ۰/۲۵ میلی مولار) و هم‌چنین در مجاورت ۲۰۰ میکرولیتر LLME (غلظت ۲/۵ میلی مولار) انکوبه شدند. سلول‌های مجاور شده با هر دو غلظت LLME ، در شرایط کشت مختلف به صورت دوپلیکیت کشت داده شدند. پس از ۷ روز انکوباسیون، میزان ۵۰ میکرولیتر از سوپ رویی محیط کشت برداشته شد و به پلیت‌های کوت شده با آنتی‌هیومن گلوبولین برای انجام آزمایش الایزا افزوده شد.

به منظور بررسی تأثیر به کارگیری CpG ODN به عنوان ادجوانت در میزان تحریک ایمنی‌زایی در محیط کشت، در تعدادی از چاهک‌های پلیت کشت سلولی، فاکتورهای محرک مختلف افزوده شد. هم‌زمان مشابه این شرایط در چاهک‌های دیگر تکرار شد با این تفاوت که به هر کدام از این چاهک‌ها مقدار ۱ میکروگرم CpG ODN افزوده شد. مطابق با دستورالعمل گفته شده، بعد از انکوباسیون ۷ روزه بر روی سوپ رویی محیط، آزمایش الایزا انجام شد. چاهک‌های کنترل منفی و مثبت به منظور تأیید نتایج این

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

کشت در نظر گرفته شدند. سرم حاوی IgG با غلظت ۱۱۰ و ۲۱۸ نانوگرم در میلی‌لیتر به چاهک‌های فاقد کوت آنتی‌هیومن گلوبولین به عنوان چاهک کنترل منفی افزوده شد.

بررسی و تشخیص تولید آنتی‌بادی:

به منظور تشخیص تولید یا عدم تولید آنتی‌بادی، پلیت‌های کوت شده با آنتی‌هیومن گلوبولین آماده‌سازی شد. به این منظور در مرحله کوتینگ، ۵۰ میکرولیتر از آنتی‌هیومن گلوبولین در غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر به تعدادی از چاهک‌ها و ۵۰ میکرولیتر محلول آلبومین گاوی به تعدادی دیگر به عنوان کنترل منفی افزوده شد. در مرحله بلاکینگ بعد از گذشت ۲۴ ساعت، چاهک‌ها تخلیه و به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر آلبومین افزوده شد. بعد از انکوبه شدن ۱۱-۷ روزه هر مرحله کشت سلولی، سوپ رویی سلول‌ها، از نظر تولید آنتی‌بادی بررسی شد. بدین منظور پس از انجام مراحل الایزا جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با روش حساس الایزا بررسی شد.

تأیید اختصاصیت آنتی‌بادی:

بدین منظور میزان ۵۰ میکرولیتر از از سوپ رویی چاهک‌های کشت بعد از گذشت ۱۱-۷ روز از انجام ایمیونیزاسیون، برداشت و در پلیت‌های کوت‌شده با آنتی‌ژن Kell افزوده شد. بعد از ۴۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با انجام سه مرحله شست و شو با بافر PBS-Tween، مولکول‌های متصل نشده تخلیه و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول کنژوگه Anti-human HRP به هر چاهک اضافه و به مدت ۴۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. بعد از انجام سه مرحله شست‌وشو با بافر فسفات، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای تترامتیل بنزیدین افزوده شد و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه و افزودن ۳۰ میکرولیتر محلول متوقف کننده، خوانش جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر صورت گرفت و نتیجه ارزیابی شد.

نرم‌افزار آماری و آزمون‌های آماری:

مقادیر جذب نوری به دست آمده از نتایج آزمایش الایزا در دفعات مختلف کاری، در جداول گردآوری شدند. سپس میزان میانگین و انحراف معیار با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel محاسبه شدند. به منظور بررسی تکرارپذیری روش الایزا، ضریب تغییرات(Coefficient of variation, CV) محاسبه گردید.

یافته‌ها

تعیین غلظت آنتی‌ژن Kell تخلیص شده با استفاده از روش برادفورد:

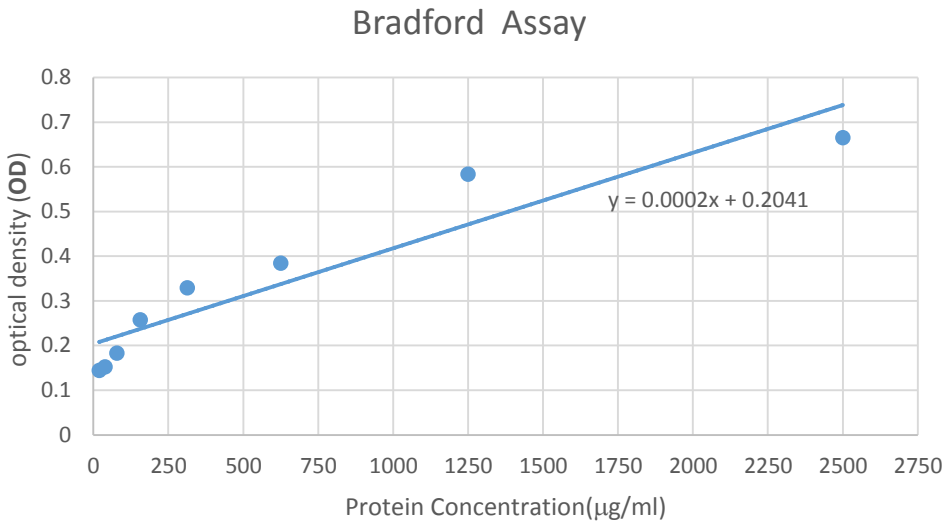
با استفاده از اطلاعات به دست آمده از دستگاه نانودراپ، منحنی استاندارد بر اساس میزان جذب نوری و غلظت رسم شد. بر روی محور افقی، غلظت BSA و بر روی محور عمودی، جذب نوری در طول موج ۵۹۵ نانومتر نمایش داده شد. با استفاده از اطلاعات جدول، شیب خط و در نتیجه معادله خط به دست آمد(شکل ۱).

با استفاده از جذب نوری نمونه‌های مجهول در طول موج ۵۹۵ نانومتر و معادله خط به دست آمده، غلظت نمونه مجهول(نمونه حاوی آنتی‌ژن Kell) در محدوده ۱۰۰۰-۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر محاسبه شد(جدول ۱).

جدول ۱: تهیه غلظت‌های استاندارد و تعیین غلظت آنتی‌ژن Kell بر اساس جذب نوری

چاهک	A	B	C	D	E	F	G	H	مجهول
غلظت (µg/mL)	۲۵۰۰	۱۲۵۰	۶۲۵	۳۱۲/۵	۱۵۶/۲۵	۷۸/۱۲۵	۳۹/۰۶۲	۱۹/۵۳۱	
جذب نوری	۰/۶۶۵	۰/۵۸۳	۰/۳۸۴	۰/۳۲۹	۰/۲۵۷	۰/۱۸۳	۰/۱۵۲	۰/۱۴۴	۰/۱۹۰

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]



شکل ۱: منحنی استاندارد آزمایش برادفورد

تأیید ویژگی آنتی‌ژن Kell:

با توجه به اختلاف جذب نوری در چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن Kell در مقایسه با چاهک‌های کنترل منفی حاوی آلبومین، ویژگی آنتی‌ژن Kell اثبات گردید(۰/۶۸۰ =OD در مقایسه با ۰/۳۰ =OD). با استفاده از نتایج جذب نوری برای دو چاهک مربوط به Anti-Kell AEK4، میانگین جذب نوری و انحراف معیار ۰/۶۴۷ ± ۰/۰۵ و دو چاهک مربوط به Anti-Kell MS56 ، میانگین جذب نوری و انحراف معیار ۰/۰۱ ± ۰/۶۰۳ محاسبه شد. سپس با استفاده از میانگین و انحراف معیار ضریب تغییرات محاسبه شد(جدول ۲). میزان ضریب تغییرات محاسبه شده نشانگر تکرارپذیری آزمایش می‌باشد.

جدول۲: میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات جذب نوری Anti-Kell در حضور آنتی‌ژن Kell

	انحراف معیار ± میانگین	ضریب تغییرات
Anti-Kell AEK4	۰/۶۴۷ ± ۰/۰۵	۷/۲۱
Anti-Kell MS56	۰/۶۰۳ ± ۰/۰۱	۱/۵۲

بررسی و تشخیص میزان تولید آنتی‌بادی به دنبال انجام ایمونیزاسیون در محیط کشت:

داده‌های حاصل از بررسی تأثیر به کارگیری ال-لوسیل ال-لوسین متیل استر و تعیین غلظت مناسب از این ماده در جدول گردآوری شد(جدول ۳). جذب نوری در چاهک‌های کوت شده با آلبومین به عنوان کنترل منفی ۰/۰۷۵ و ۰/۰۸۳ خوانده شد. جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای چاهک‌های دارای غلظت ۰/۲۵ میلی مولار LLME و غلظت ۲/۵ میلی‌مولار LLME با شرایط کاملاً یکسان مقایسه شدند. جذب نوری بالاتر در چاهک‌های حاوی غلظت ۰/۲۵ میلی‌مولار LLME در شرایط مشابه مؤثرتر بودن این غلظت از ماده را در حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی نشان داد. به نظر می‌رسد که LLME در غلظت‌های بالا باعث ایجاد سمیت و از بین بردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی می‌شود.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر CpG ODN در جدول گردآوری شد(جدول ۴). جذب نوری در طول موج ۴۵۰ نانومتر برای این چاهک‌های کنترل منفی به ترتیب ۰/۱۱۰ و ۰/۱۷۲ و برای چاهک‌های کنترل مثبت به ترتیب ۰/۵۶۳ و ۰/۷۲۵ خوانده شد. جذب نوری برای چاهک‌های دارای CpG ODN و فاقد CpG ODN با شرایط کاملاً یکسان مقایسه شد. جذب نوری بالاتر در چاهک‌های حاوی CpG ODN در شرایط مشابه نشان‌دهنده افزایش میزان ایمنی‌زایی در این چاهک‌ها و مؤثر بودن CpG ODN به عنوان ادجوانت می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

جدول ۳: مقایسه جذب نوری در غلظت‌های مختلف LLME و شرایط مختلف کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

شرایط کشت مختلف	غلظت ۰/۲۵ میلی مولار LLME	غلظت ۲/۵ میلی مولار LLME
۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL IL4 + ۱۰ µI LFNγ	۲/۰۲۷	۱/۴۰۹
	۱/۹۰۹	۱/۲۹۹
۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL MLC	۲/۰۲۷	۱/۴۲۸
	۲/۰۷۷	۱/۳۸۳
۳۰ µL Kell Antigen + ۱۵ µL IL4	۲/۱۳۴	۱/۲۴۹
	۲/۰۰۷	۱/۲۶۶
۲۰ µL $Kell^+$ RBC + ۱۰ µL MLC	۱/۹۹۶	۱/۵۶۷
	۱/۹۵۸	۱/۳۸۸

در مراحل بعدی، مجدداً سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی تحت شرایط ذکر شده در جدول ۵، کشت داده شدند. با استفاده از نتایج جذب نوری به دست آمده از آزمایش الایزا، برای چاهک‌های دوبلیکیت با شرایط یکسان میانگین و انحراف معیار محاسبه شد و با توجه به این دو برای هر کدام از شرایط ضریب تغییرات که بیانگر

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

تکرارپذیری این آزمایش است محاسبه گردید(جدول ۵). مطلوب‌ترین شرایط کشت به منظور ایجاد ایمنی‌زایی و تولید آنتی‌بادی اختصاصی Anti-Kell، به کارگیری آنتی‌ژن Kell در غلظت ۱۰۰۰–۵۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر و میزان ۱۰ میکروگرم از MLC (دارای بیشترین میانگین جذب نوری و کمترین ضریب تغییرات) می‌باشد.

علاوه بر آن استفاده از آنتی‌ژن Kell در غلظت ۱۰۰۰–۵۰۰ نانوگرم به همراه ۱۵ میکرولیتر IL4 با غلظت ۹/۵ پیکوگرم در میلی‌لیتر نیز نتایج قابل قبولی را در برداشت.

تأیید اختصاصیت آنتی‌بادی:

داده‌های حاصل از انجام آزمایش الایزا در جدول طبقه‌بندی شد(جدول ۶). با توجه به اختلاف جذب نوری در چاهک‌های حاوی آنتی‌ژن Kell در مقایسه با چاهک‌های کنترل منفی حاوی آلبومین، اختصاصیت آنتی‌بادی ضد Kell اثبات گردید.

جدول ۴: مقایسه جذب نوری در شرایط مختلف کشت سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی

شرایط کشت	فاقد CpG ODN	حاوی CpG ODN
۱۰ µL MLC + ۵ µL Ag + ۶ µI PBMC	۰/۵۱۹	۰/۶۴۵
۱۰ µL MLC + ۱۰ µL Ag + ۶ µL PBMC	۰/۵۳۳	۰/۷۸۹
۱۰ µL MLC + ۵ µL Ag + ۱۸ µL PBMC	۰/۶۴۳	۰/۷۵۶
۱۰ µL MLC + ۵ µL Ag + ۱۸ µL PBMC	۰/۶۳۳	۰/۷۱۹

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

جدول ۵: میانگین، انحراف معیار و ضریب تغییرات جذب نور در شرایط کشت مطلوب

	شرایط مختلف کشت	انحراف معیار ± میانگین	CV
۰/۲۵ mM LLME	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL IL4 + ۱۰ µL IFNγ	۰/۵۱۹	۴/۲۳
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL MLC	۰/۰۸ ± ۱/۹۶۸	۱/۷۲
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۵ µL IL4	۰/۰۹ ± ۲/۰۷۰۵	۴/۳۳
	۲۰ µL Kell + RBC + ۱۰ µL MLC	۰/۰۲ ± ۱/۹۷۷	۱/۳۵
۲/۵ mM LLME	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL IL4 + ۱۰ µL IFNγ	۱/۳۵۴ ± ۰/۰۸	۵/۷۴
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL MLC	۱/۴۰۵۵ ± ۰/۰۳	۲/۲۶
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۵ µL IL4	۱/۲۵۷۵ ± ۰/۰۱	۰/۹۵
	۲۰ µL Kell + RBC + ۱۰ µL MLC	۱/۴۷۷۵ ± ۰/۱۲	۸/۵۶

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

جدول ۶: جذب نوری سوپ رویی چاهک‌ها در مواجهه با آنتی‌ژن Kell و تائید اختصاصیت آنتی‌بادی

	شرایط مختلف کشت	با آنتی‌ژن Kell	با آلبومین
۰/۲۵ mM LLME	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL IL4 + ۱۰ µL IFNγ	۰/۴۶۹	۰/۱۵۹
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL MLC	۰/۴۹۰	۰/۱۳۵
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۵ µL IL4	۰/۵۱۷	۰/۱۳۰
	۲۰ µL Kell + RBC + ۱۰ µL MLC	۰/۴۶۲	۰/۱۰۶
۲/۵ mM LLME	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۵ µL IL4	۰/۴۵۳	۰/۱۱۵
	۳۰ µL Kell Antigen + ۱۰ µL MLC	۰/۴۶۰	۰/۱۰۸
	۲۰ µL Kell + RBC + ۱۵ µL IL4	۰/۴۶۲	۰/۰۹۵
	۲۰ µL Kell + RBC + ۱۰ µL MLC	۰/۴۴۳	۰/۱۰۸

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

بحث

دانش ما در زمینه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال طی چند دهه گذشته به طور قابل توجهی بهبود یافته است. محققان در این عرصه برای مرحله ایمنی‌زایی که از مراحل مقدماتی در فرآیند تولید ایمنی‌زایی آنتی‌بادی‌های مونوکلونال می‌باشد، ارزش و اهمیت زیادی قائل هستند. ایمنی‌زایی تا امروزه به شیوه‌های گوناگونی انجام شده است. با وجود پیشرفت‌هایی که در ایمنی‌زایی به روش *in vivo* صورت گرفت، محققان دریافتند که ایمنی‌زایی در محیط *in vitro* بسیار کارآمدتر خواهد بود(۱۶). بررسی مطالعه‌های گذشته نشان داده است که ایمنی‌زایی در *in vitro* نیز به روش‌های گوناگونی و با استفاده از دستورالعمل‌های مختلف صورت گرفته است(۱۷).

این مطالعه بر روی کشت سلول‌های تک هسته‌ای که از خون محیطی افراد فاقد آنتی‌ژن Kell استخراج شده بود، پایه‌ریزی شد. در این پژوهش سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از روش گرادیان غلظتی و با استفاده از محلول فایکول جداسازی شدند. طبق یافته‌های به دست آمده از مطالعه‌های گذشته، زیرگروه خاصی از سلول‌های جداسازی شده به روش گرادیان غلظتی، با مکانیسم‌های ویژه‌ای منجر به مهار پاسخ‌های ایمنی در محیط کشت و در نتیجه کاهش ایمنی‌زایی می‌گردند. این سلول‌های مهارکننده شامل مونوسیت‌ها و لنفوسیت‌های گرانولار بزرگ (LGL)، سلول‌های کشنده طبیعی (NK cell) و سلول‌های مهارکننده، می‌باشند(۱۸).

پیش‌تر کارل در مطالعه خود صراحتاً نشان داد که مجاور کردن سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی با ال-لوسیل ال-لوسین متیل استر(LLME) منجر به حذف کامل این سلول‌های مهارکننده می‌گردد. ایشان در نتایج خود عنوان کردند که درصد سلول‌های بیان کننده مارکرهای سطحی Mo 2 (مارکر اختصاصی مونوسیت) و مارکرهای Leu 7 و Leu 11 (مارکرهای اختصاصی سلول‌های کشنده طبیعی) به ترتیب به ۰/۲ ، ۰/۵ و کمتر از ۰/۱ درصد کاهش یافتند(۱۹).

هم‌چنین تی‌ال در مطالعه‌های خود نشان داد که سلول‌های T سیتوتوکسیک و زیرگروه‌هایی از سلول‌های T $CD8^+$ که بر روی سلول‌های B ترشح‌کننده آنتی‌بادی تحریک شده با میتوژن اختصاصی، اثر مهاری دارند، با استفاده از این ماده حذف می‌شوند. هم‌چنین این مطالعه‌ها بیان کرد که به کار بردن LLME هیچ اثر منفی بر روی سلول‌های B و سلول‌های(T helper) +T CD4 ندارد(۲۰).

مشابه با پژوهش انجام شده، ژو فانگ نیز در روش خود از LLME استفاده کرد(۲۱).

شین ای ماتسوموتو در پژوهش خود همانند این مطالعه، قبل از تحریک کردن سلول‌ها با آنتی‌ژن‌های مورد نظر، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی را با LLME مواجه کرد(۲۲، ۷).

بنابراین با توجه به این مطالعه‌ها، در پژوهش کنونی نیز از LLME به منظور حذف سلول‌های مهارکننده ایمنی، استفاده شد. طبق نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد استفاده از غلظت‌های بالا از این ماده، باعث ایجاد سمیت و کاهش پاسخ ایمنی می‌شود.

به منظور افزایش تحریک ایمنی لنفوسیت‌های B با آنتی‌ژن، وجود ادجوانت ضروری می‌باشد. ادجوانت‌ها عمدتاً از پاتوژن‌ها مشتق می‌شوند و اغلب بیان‌کننده الگوهای مولکولی مرتبط با پاتوژن(Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMP) می‌باشند. انواعی از آن‌ها شامل: پلی ساکارید باکتریایی(LPS) ، CpG DNA ، مورامیل دی پپتید (MDP) و... هستند(۲۵-۲۳).

وی جیانگ و همکاران طی مطالعه‌های خود دریافتند که در شرایط طبیعی فیزیولوژیک سلول‌های B naïve پاسخ ایمونولوژیک ضعیفی دارند در حالی که با وجود ادجوانت CpG ODN ، مارکرهای CD80 ، CD40 و HLA-DR بر سطح سلول‌های B naïve افزایش بیان داشته که متعاقباً باعث فعال‌سازی هرچه بیشتر سلول‌های T می‌شود. این اثر در نهایت منجر به پاسخ ایمونولوژیک به مراتب قوی‌تری خواهد شد(۲۶). با توجه به نتایج مطالعه‌های پیشین در این مطالعه به منظور فعال‌سازی قوی‌تر سلول‌های B و تحریک تولید آنتی‌بادی، از ادجوانت CpG ODN استفاده گردید.

در مطالعه یوشیکو ماتسودا نیز مشابه با مطالعه کنونی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مجاورت با ادجوانت CpG ODN کشت داده شدند(۱۷).

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

در مطالعه‌های شین ای ماتسو موتو ابتدا از مورامیل دی‌پپتید(MDP) به عنوان ادجوانت در محیط کشت استفاده شد. نتایج نشان داد که مورامیل دی‌پپتید منجربه تحریک تکثیر غیر اختصاصی سلول‌های B برای تولید آنتی‌بادی می‌شود. بنابراین در ادامه از ادجوانت CpG ODN استفاده کردند که موجب تکثیر اختصاصی سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی اختصاصی شد. این مطالعه بر این باور بود که استفاده از ترکیب سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی و آنتی‌ژن مناسب در کنار ادجوانت قوی CpG ODN ، منجر به بهینه‌سازی دستورالعمل IVI می‌شود و سلول‌های B اختصاصی آنتی‌ژن با افینیتی بالا تولید و گسترش می‌یابند(۷).

نتیجه مطالعه نشان داد که با ایجاد شرایط کشت یکسان، در تعدادی از چاهک‌ها که CpG ODN به محیط کشت افزوده شده بود، نسبت به چاهک‌هایی که فاقد CpG ODN بودند، جذب نوری بالاتری در طول موج ۴۵۰ نانومتر نشان داده شد که به معنی تولید بیشتر آنتی‌بادی اختصاصی در این چاهک‌ها می‌باشد.

به منظور تأمین سیتوکاین‌های مورد نیاز جهت تحریک سلول‌های B موجود در مطالعه، از کشت مخلوط لنفوسیتی (Mix Lymphocyte Culture,MLC) استفاده شد. دوروتئافیش باچر با بررسی الگوی سیتوکاینی MLC ، دریافت که میزان سیتوکاین‌های IL2 ، IL4 ، IL6 ، IL10 ، IFNγ و TNFα افزایش معناداری داشت. با توجه به این مسأله که این سیتوکاین‌ها در رشد و تمایز سلول‌های B و تولید آنتی‌بادی نقش به سزایی دارند، به منظور دستیابی به سیتوکاین‌های مؤثر در رشد و تمایز سلول‌های ایمنی، لنفوسیت‌های ۲ فرد مختلف در محیط کشت مجاور شدند و بعد از ۲۴ ساعت انکوبه، سوپ رویی سلول‌ها به عنوان MLC استفاده شد. بر اساس نتایج به دست آمده از کشت سلول‌های تک هسته‌ای در مجاورت این مخلوط سیتوکاینی، شرایط مناسبی برای رشد و تمایز سلول‌های B فراهم شد. همان طور که در یافته‌ها مشاهده شد، بالاترین جذب نوری مربوط به چاهک حاوی MLC به همراه آنتی‌ژن Kell می‌باشد. این حالت به عنوان یکی از شرایط بهینه در روش IVI پیشنهاد می‌شود(۲۷).

نتایج حاصل از به کارگیری MLC در محیط کشت به منظور افزایش تکثیر سلول‌های B در مطالعه کنونی هم راستا با نتایج حاصل از استفاده از MLC در مطالعه میلانی بود. بنابراین می‌توان MLC را به عنوان یکی از ترکیبات تحریک‌کننده مؤثر در ایمنی‌زایی سلول‌های B برشمرد(۲۸).

همانند بررسی‌هایی که آکیرا ایچی کاوا در مورد تأثیر IL4 و IL2 بر روی ایمیونیزاسیون به روش IVI انجام داد، در این مطالعه نیز از IL4 استفاده شد که نتایج مشابهی با مطالعه‌های ایشان داشت. افزودن IL4 به محیط کشت موجب افزایش ایمنی‌زایی برعلیه آنتی‌ژن Kell شد(۲۹).

نتیجه‌گیری

با توجه به مزیت‌های روش ایمنی‌زایی در محیط کشت (*in vitro* Immunization) در مقایسه با بدن حیوان(*in vivo* Immunization) و با در نظر گرفتن نتایج حاصل از مطالعه انجام شده در مورد بررسی شرایط مؤثر بر ایمنی‌زایی در محیط کشت علیه آنتی‌ژن Kell، به نظر می‌رسد انجام ایمنی‌زایی در محیط کشت علیه آنتی‌ژن Kell امکان‌پذیر می‌باشد و می‌توان با کنترل و به کارگیری عوامل مختلف در محیط کشت، شرایط را به منظور ایجاد ایمنی‌زایی در محیط کشت بهینه‌سازی کرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی و طب انتقال خون در مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1399.007 می‌باشد. بودجه این مطالعه توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در آزمایشگاه آنتی‌بادی مونوکلونال انجام شده است.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

References:

1- Liu JKH. The history of monoclonal antibody development-Progress, remaining challenges and future innovations. Ann Med Surg 2014; 3(4): 113-6.
2- Nelson AL, Dhimolea E, Reichert JM. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. Nat Rev Drug Discov 2010; 9(10): 767–74.
3- Zafiropoulos A, Andersson E, Krambovitis E, Borrebaeck CAK. Induction of antigen-specific isotype switching by *in vitro* immunization of human naive B lymphocytes. J Immunol Methods 1997; 200(1-2): 181-90.
4- Wijkhuisen A, Savatier A, Cordeiro N, Léonetti M. Production of antigen-specific human IgGs by *in vitro* immunization. BMC Biotechnol 2016; 16(1): 1-9.
5- Wootla B, Denic A, Rodriguez M. Polyclonal and Monoclonal Antibodies in Clinic. Hum Monoclon Antibodies Methods Protoc 2014; 1060: 79-110.
6- Sadeghalvad M, Rezaei N. Introduction on Monoclonal Antibodies. IntechOpen; 2021. p. 6.
7- Matsumoto S ei, Yamashita M, Katakura Y, Aiba Y, Tomimatsu K, Kabayama S, *et al*. A rapid and efficient strategy to generate antigen-specific human monoclonal antibody by *in vitro* immunization and the phage display method. J Immunol Methods 2008; 332(1–2): 2-9.
8- Borrebaeck CA. Development of *in vitro* immunization in murine and human hybridoma technology. J Pharm Biomed Anal 1987; 5(8): 783-92.
9- Voak D. Monoclonal antibodies in blood group serology. Transfus Sci 1989; 10(1): 5-13.
10- Beck ML. Monoclonal antibodies as blood grouping reagents. Immunohematology 1999; 15(1): 10-4.
11- Dorgalaleh A, Gholami MS, Shokuhiyan M, Valikhani M, Moghaddam ES, Naderi M. Alloimmunization against Rh and Kell blood groups antigens is the main obstacle for blood transfusion in transfusion dependent thalassemia patients in Iran. Int J Case Reports Images 2017; 8(5): 358.
12- Chou ST, Liem RI, Thompson AA. Challenges of alloimmunization in patients with haemoglobinopathies. Br J Haematol 2012; 159(4): 394-404.
13- Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood groups systems. Indian J Anaesth 2014; 58(5): 524–8.
14- Sarihi R, Amirizadeh N, Oodi A. Study of Kell blood group genotype in alloimmiunized thalassemia patients. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2020; 16(4): 259-69. [Article in Farsi]
15- Lee S, Russo D, Redman CM. The Kell blood group system: Kell and XK membrane proteins. Semin Hematol 2000; 37(2): 113-21.
16- Harada G, Matsumoto SE, Yamashita M, Fujii K, Shirahata S, Katakura Y. *In vitro* immunization of Epstein-Barr virus-immortalized B cells augments antigen-specific antibody production. Cytotechnology 2013; 65(6): 979–83.
17- Matsuda Y, Imamura R, Takahara S. Evaluation of antigen-specific IgM and IgG production during an *in vitro* peripheral blood mononuclear cell culture assay. Front Immunol 2017; 8: 794.
18- Tamura T, Tomimatsu K, Katakura Y, Yamashita M, Matsumoto SE, Aiba Y, *et al*. Anti-peptide antibody production elicited by *in vitro* immunization of human peripheral blood mononuclear cells. Biosci Biotechnol Biochem 2007; 71(12): 2871–5.
19- Borrebaeek CAK, Danielsson L, Möller SA. Human monoclonal antibodies produced from L-leucine methyl ester-treated and *in vitro* immunized peripheral blood lymphocytes. Biochem Biophys Res Commun 1987; 148(3): 941–6.
20- Thiele DL, Lipsky PE. Mechanism of L-leucyl-L-leucine methyl ester-mediated killing of cytotoxic lymphocytes: Dependence on a lysosomal thiol protease, dipeptidyl peptidase I, that is enriched in these cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1990; 87(1): 83-7.
21- Fang X, Tong Y, Tian H, Ning H, Gao X, Yao W. Rapid de novo generation of antigen specific human B cells with expression of Blimp-1 and AID by *in vitro* immunization. Exp Cell Res 2017; 352(1): 53-62.
22- Matsumoto SE, Yamashita M, Katakura Y, Noguchi E, Aiba Y, Ichikawa A, *et al*. *In vitro* immunization can elicit the expansion of diverse repertoire of B cells from peripheral blood mononuclear cells. Cytotechnology 2006; 52(3): 227–33.
23- Kumar A. 8-Adjuvants. In: Kumar ABT-VL. Visceral Leishmaniasis: Therapeutics and Vaccines(Developments in Immunology). Philadelphia: Academic Press; 2021. p. 83-7.
24- Fabrício Marçal do Nascimento L, Dias de Moura L, Luis Souza dos Santos A, C Vallur A, do Socorro Pires e Cruz M. Chapter 2-Vaccine as immunotherapy for leishmaniasis. In: Formiga FR, Inamuddin, Severino PBT-A of N for NTD. Philadelphia: Academic Press; 2021. p. 29-46.
25- Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. Front Immunol 2013; 4: 114.
26- Jiang W, Lederman MM, Harding CV, Rodriguez B, Mohner RJ, Sieg SF. TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function. Eur J Immunol 2007; 37(8): 2205–13.
27- Fischbacher D, Merle M, Liepert A, Grabrucker C, Kroell T, Kremser A, *et al*. Cell Communication & Adhesion Cytokine Release Patterns in Mixed Lymphocyte Culture (MLC) of T-Cells with Dendritic Cells (DC) Generated from AML Blasts Contribute to Predict anti-Leukaemic T-Cell Reactions and Patients ' Response to Immunotherapy. Cell Commun Adhes 2015; 22(2-6): 49-65.
28- Milani S, Yari F. Alloimmune lymphocytes proliferation in presence of Mixed Lymphocyte Culture and cyclosporine. Sci J Iran Blood Transfus Organ 2021; 18(2): 97-104. [Article in Farsi]
29- Ichikawa A, Katakura Y, Teruya K, Hashizume S, Shirshata S. *In vitro* immunization of human peripheral blood lymphocytes: Establishment of B cell lines secreting IgM specific for cholera toxin B subunit from lymphocytes stimulated with IL-2 and IL-4. Cytotechnology 1999; 31(1-2): 131-9.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (2): 108-121

Original Article

Evaluation of effective factors during an *in Vitro* immunization against Kell blood group antigen

Tobeyani F.[1], Milani S.[1], Yari F.[1]

[1]Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

in-vitro immunization is one of the common methods of immunization as a preliminary step in the production of Monoclonal Antibodies. In this method, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are isolated and incubated in culture medium with necessary factors for immunization. Antigen-specific B lymphocytes proliferate and differentiate into cells that secrete specific antibodies. In the current study, we aimed to identify various factors and contributing elements on B cell In-vitro immunization process for the generation of antibody against Kell blood group antigen.

Materials and Methods

In this experimental study, Kell antigen was purified from $Kell^+$ whole blood. Peripheral blood mononuclear cells were isolated using a density gradient approach from $Kell^-$ whole blood bag. After exposure to L-Leucyl-L-leucine methyl ester (LLME), they were incubated with other required factors for immunization, including antigen (500-1000 ng/ml), adjuvant (5-20 µg/ml), and cytokines (9.5 pg/ml). After 7-11 days, cells supernatant was evaluated using a sensitive method, ELISA, for antibody production.

Results

It was observed that the most desirable culture condition for immunization and further production of specific anti-Kell antibody from mononuclear cells was 0.25 mM concentration of LLME employing 500-1000 ng of Kell antigens and 10 microliter MLC. In the mentioned condition, the optical density was read at 450 nm as 2.052 ± 0.03, which was the representative of production of specific anti-Kell antibody.

Conclusions

Based on the study, immunization in culture medium against Kell antigen can be done. By employing different factors, the production of anti-Kell producing cells in culture condition can be optimized.

Key words: Immunization, Antibody, Kell Blood-group System

Received: 17 Jan 2022
Accepted: 13 Mar 2022

Correspondence: Yari F., PhD of Immunology. Professor of Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 82052237; Fax: (+9821) 88601555
E-mail: *f.yari@ibto.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2024-05-13]