خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۹ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۱ (۲۶۹-۲۵۷)

مقاله پژوهشی

عوامل مؤثر در بهینگی ایمونیزاسیون جهت دستیابی به آنتی بادی علیه آنتی‌ژن RhD در محیط کشت

مهران امروانی[۱]، فاطمه یاری[۲]، سعیده میلانی[۳]، بهناز عموحسین[۴]

چکیده

سابقه و هدف

آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhD در طب انتقال خون و بالین از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. لذا در این مطالعه به بررسی عوامل مؤثر در بهینگی ایمونیزاسیون جهت دستیابی به لنفوسیت ایمونیزه شده تولیدکننده آنتی‌بادی پرداخته شده تا در محیط آزمایشگاهی به آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhD دست یافته شود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، لنفوسیت‌های خون محیطی به روش فایکول از کیسه‌های خون کامل O منفی جداسازی شدند. سپس این لنفوسیت‌ها با الولوسین متیل استر تیمار شده و در پلیت کشت سلولی با آنتی‌ژن محلول و ذره‌ای RhD ، اینترفرون گاما، اینترلوکین۴ و CpGODN به مدت یک هفته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مواجه شدند. پس از این مدت انکوباسیون به منظور ارزیابی تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌ها بر روی سوپرناتانت حاصل از محیط کشت مواجه سلولی با روش الایزا انجام شد.

یافته‌ها

استفاده از اینترفرون گاما، ترکیب آن با اینترلوکین-۴ و CpGODN به عنوان عوامل بهینه‌کننده جهت تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌های جدا شده به روش فایکول در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی شناخته شدند(به ترتیب با تولید آنتی‌بادی با غلظت‌های ۳۶/۸۳۱ ± ۷۵/۸۵۱ ، ۳۱/۲۹۳ ± ۸۲/۱۹۵ و۲۴/۸۱۴ ± ۶۶/۱۳۴ نانوگرم در میلی‌لیتر در ۱۰ مواجه صورت گرفته).

نتیجه‌گیری

استفاده از عوامل بهینه کننده ایمونیزاسیون نقش مؤثری بر تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhD در محیط آزمایشگاهی دارند.

کلمات کلیدی: **ایمنی‌زایی، تکنیک درون آزمایشگاهی، آنتی‌بادی‌ها**

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۵/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

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- 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
۳- PhD زیست فناوری پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

مقدمه

سیستم گروه خونی Rh یکی از پلی‌مورفیک‌ترین و ایمونوژن‌ترین سیستم‌های شناخته شده خونی در انسان است که بعد از سیستم گروه خونی ABO ، یک سیستم خونی حائز اهمیت بالینی در طب انتقال خون به شمار می‌رود. عوارض بالینی می‌تواند به دلیل تخریب گلبول‌های قرمز خون پس از تعامل یک آلوآنتی‌بادی با گلبول قرمز که حاوی آنتی‌ژن مربوطه است، به وجود آید و سبب ایجاد یک واکنش همولیتیک پس از تزریق خون (HTR) شود و به همین دلیل شناسایی آنتی‌ژن RhD از اهمیت ویژه‌ای در سرولوژی گروه‌های خونی برخوردار است(۳-۱). آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن D سیستم Rh هم در طب انتقال خون در جهت بررسی نوع Rh سلول‌های خونی(تایپینگ سیستم Rh) و هم در بالین به عنوان یک عامل پروفیلاکتیک در جلوگیری از حساس‌سازی مادر Rh منفی که در معرض خون Rh مثبت جنینی قرار گرفته است به منظور جلوگیری از ایجاد بیماری همولیتیک جنین و نوزاد(HDFN) مورد استفاده قرار می‌گیرد(۵، ۴).

جهت تولید آنتی‌بادی مونوکلونال علیه آنتی‌ژن D سیستم Rh ، یکی از مراحل اساسی آن ایمونیزاسیون لنفوسیت‌های B به منظور تولید آنتی‌بادی می‌باشد(۶).

ایمونیزاسیون به روش‌های مختلفی انجام می‌شود. یکی از این روش‌ها، ایمونیزاسیون در حیوانات آزمایشگاهی است که نیاز به تزریق آنتی‌ژن D به حیوان آزمایشگاهی دارد لذا نیازمند طراحی یک حیوان خانه مجهز می‌باشد. علاوه بر تهیه یک حیوان خانه مجهز، یکی از مشکلات و دشواری‌های این روش رعایت اصول و ضوابط اخلاقی کار با حیوانات است که استفاده از این روش جهت ایمونیزاسیون را دشوار می‌سازد(۸، ۷).

از طرف دیگر در ایمونیزاسیون حیوانات آزمایشگاهی خصوصاً موش، به خوبی نسبت به آنتی‌ژن D پاسخ ایمنی ایجاد نمی‌شود و در صورت تولید آنتی‌بادی از این نوع ایمونیزاسیون، آنتی‌بادی مونوکلونال موشی ایجاد می شود که در هنگام استفاده از آن در بالین(به منظور تولید آمپول روگام جهت جلوگیری از حساس شدن مادر Rh منفی و ایجاد HDFN) از بازده درمانی آن می‌کاهد و منجر به بروز پاسخ ایمنی در بدن فرد و ایجاد آنتی‌بادی بر علیه آنتی‌بادی مونوکلونال موشی می‌شود(۱۰، ۹). آنتی‌D را می‌توان از افراد هایپرایمیون، کسانی که در طول بارداری ایمونیزه شده‌اند، افرادی که تزریق خون نا سازگار داشته‌اند و یا ایمونیزاسیون افراد داوطلب تهیه نمود. اما این روش‌ها برای به دست آوردن غلظت مناسب آنتی‌D نیاز به تزریق دوزهای تقویت‌کننده به اهداکنندگان دارد که همراه با ایجاد خطراتی برای اهداکنندگان از جمله آلوایمونیزه شدن نسبت به سایر گروه‌های خونی می‌باشد. به علاوه جداسازی آگلوتینین آنتی D از کلاس IgM که در ارزیابی های سیستم Rh (خصوصا Rh تایپینگ) اهمیت دارد نیز به ندرت از افراد ایمیون با تیتر بالای آنتی‌D به دست می‌آید(۱۱، ۴).

لذا یکی از مناسب‌ترین شیوه‌ها جهت ایمونیزاسیون لنفوسیت‌های B برای تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhD ، روش ایمونیزاسیون آزمایشگاهی(*In Vitro* Immunization = IVI) می‌باشد(۱۲). یکی از عوامل مؤثر در بهینه‌سازی ایمونیزاسیون آزمایشگاهی در جهت تولید آنتی‌بادی مونوکلونال، استفاده از ال ـ لوسیل ال ـ لوسین متیل استر(LLME) می‌باشد که سبب از بین بردن و حذف جمعیت سلولی غنی از لیزوزوم می‌شود. این سلول‌ها عبارتند از: مونوسیت، لنفوسیت‌های گرانولار بزرگ، سلول‌های $TCD8^+$ (سلول‌های T سیتوتوکسیک) و سلول‌های NK . با حذف این سلول‌ها که عمدتاً سبب مهار پاسخ‌های ایمنی می‌شود، تنها لنفوسیت‌های B و T باقی می‌مانند که میانکنش آن‌ها در محیط آزمایشگاهی منجر به افزایش در تکثیر لنفوسیت B و تولید آنتی‌بادی می‌شود.

IL2 و یا IFN-γ نیز نقش مؤثری در تحریک تکثیر لنفوسیت‌های B و القای تولید آنتی‌بادی به عنوان سیگنال دوم فعال‌سازی لنفوسیت‌های B دارند و از

اینرو می‌توان از محصولات نوترکیب موارد فوق‌الذکر، در بهبود ایمونیزاسیون آزمایشگاهی بهره جست(۱۴، ۱۳). بنابراین با توجه به اهمیت آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن D سیستم Rh در طب انتقال خون و بالین، در این مطالعه شناخت فاکتورهای مختلف و عوامل دخیل در فرآیند ایمونیزاسیون سلول‌های B جهت دستیابی به آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhD در محیط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

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

تهیه آنتی‌ژن ذره‌ای RhD و تایید آن:

ابتدا ۲ میلی‌لیتر از خون موجود در کیسه گلبول قرمز متراکم شده O مثبت را از طریق کورد آن وارد لوله فالکون ۱۵میلی‌لیتری کرده و سپس با فسفات بافر سالین(PBS)(سیگما، آمریکا) حجم آن به ۱۲ میلی‌لیتر رسانده شد. جهت حذف آنتی‌بادی‌های ضد گروه خونی A و B (Anti-A و Anti-B) که می‌توانند در الایزا مداخله کنند، چهار مرحله محلول فوق مورد شست و شو قرار گرفت. جهت شست و شو با PBS از دور سانتریفوژ ۵۰۰ g به مدت ۵ دقیقه در مرحله اول و در مراحل بعدی از دور سانتریفوژ ۴۰۰ g به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. در هر مرحله از شست و شو پس از خارج کردن سوپرناتانت رویی محلول، مجدداً رسوب سلولی موجود در لوله فالکون را با PBS به حجم ۱۲ میلی‌لیتر رسانده و سانتریفوژ انجام شد. پس از پایان مراحل شست و شو گلبول قرمز O مثبت با PBS در غلظت مناسب تهیه شد تا آنتی‌ژن ذره‌ای جهت مواجه سلولی تهیه شود.

جداسازی و تخلیص آنتی‌ژن RhD از سطح RBC ها و تایید آن جهت تهیه آنتی‌ژن محلول:

از روش شبح سلولی به منظور محلول‌سازی آنتی‌ژن‌های RhD متصل به غشای گلبول قرمز استفاده شد. در این روش، پس از سانتریفوژ گلبول‌های قرمز D مثبت در دور ۶۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه و دور ریختن پلاسما، هم حجم خون باقی‌مانده، بافر PBS افزوده و مجدداً سانتریفوژ انجام شد. بعد از حذف بافرPBS 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 (Phenyl Methyl Sulfonyl Fluride) و ۱ درصد Nonidet P-40 به هر لوله فالکون اضافه شد و ۲ تا ۳ ساعت روی روتاتور قرار گرفت و پس از آن در دور RPM ۴۴۰۰ سانتریفوژ 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 4B دارای گروه فعال سیانوژن بروماید آماده‌سازی شد. در ادامه آنتی‌بادی Anti-D 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 D رقیق شده با PBS

هم حجم از ستون عبور داده شد. با چندین مرتبه شست و شوی 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 بافر تریس 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. ویژگی آنتی‌ژن خالص شده با روش الایزا و به کارگیری آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن D (ایمونو-دیاگنوستیکا، آلمان) تائید شد.

جداسازی لنفوسیت به روش فایکول از کیسه خون و تهیه سوسپانسیون سلولی:

جهت جداسازی لنفوسیت‌ها به روش فایکول در سه لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری به ترتیب ۲۵ ، ۲۵ و ۱۰ میلی‌لیتر خون کامل O منفی با ۲۵ ، ۲۵ و ۱۰ میلی‌لیتر محلول PBS مخلوط شدند. سپس در ۴ لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ، ۱۵ میلی‌لیتر فایکول(بهار افشان، ایران) ریخته و به هر لوله ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط خون کامل O منفی و PBS اضافه گردید. نهایتاً لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری حاوی فایکول و مخلوط PBS و خون کامل به مدت ۲۰ دقیقه در دور g ۶۰۰ سانتریفوژ شد. پس از پایان سانتریفوژ، هاله ابری شکل بین گلبول‌های قرمز(RBC) و پلاسما که حاوی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) است و بافی‌کوت نامیده می‌شود جداسازی شده و به ۴ لوله فالکون ۵۰ میلی‌لیتری انتقال یافت. به دلیل سمیت فایکول برای سلول‌ها، لوله‌های حاوی سلول سه بار با محلول PBS شست و شو شدند. به منظور شست و شو سلول‌ها با PBS در مرتبه اول از دور سانتریفوژ g ۵۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه و در مرتبه دوم و سوم از دور سانتریفوژ g ۴۰۰ به مدت ۵ دقیقه استفاده شد. پس از پایان مراحل شست و شو و دور ریختن سوپرناتانت رویی، اقدام به هموژن‌سازی سلول‌ها نموده و سپس رسوب سلولی (Pellet) تشکیل شده در انتهای لوله‌های فالکون را با یکدیگر در یک لوله فالکون ۱۵ میلی‌لیتری ادغام کرده و حجم لوله با محیط RPMI (بیوآیدیا، آمریکا) حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی(۱۰٪ FBS) (مدیتال، ایران) به ۴ میلی‌لیتر رسانده می‌شود. سپس ۴۰ میکرو لیتر ال لوسیل ال لوسین متیل استر(LLME) (مرک، آلمان) ۲/۵ میلی‌مولار به سوسپانسیون سلولی اضافه شده و به مدت ۴۰ دقیقه این ماده با سلول‌ها انکوبه شد. پس از پایان مدت زمان انکوباسیون جهت حذف LIME ، سوسپانسیون سلولی سه بار با محلول PBS به مدت ۵ دقیقه در دور g ۴۰۰ شست و شو داده شد. پس از پایان مراحل شست و شو، رسوب سلولی(Pellet) هموژن شده و مجدداً با محیط RPMI حاوی ۱۰٪ FBS به حجم ۴ میلی‌لیتر رسانده شد.

شمارش سلولی سوسپانسیون جهت توزیع سلول‌ها در پلیت کشت سلولی:

جهت شمارش سلولی به منظور تعیین تعداد سلول‌های موجود در هر چاهک پلیت کشت سلولی از لام نئوبار استفاده شد. بدین منظور ۱۰ میکرولیتر از محلول RPMI حاوی ۱۰٪ FBS و بافی‌کوت (سوسپانسیون سلولی) با ۱۰ میکرولیتر اسید استیک ۲٪ (آلمان، مرک) به منظور حذف RBC موجود در نمونه ترکیب شد. در نهایت نیز از یک رنگ حیاتی به نام تریپان بلو(سیگما، آمریکا) جهت شمارش گلبول‌های سفید(WBC) استفاده گشت. این رنگ جذب سلول‌های مرده شده و سلول‌های زنده شفاف باقی می‌مانند.

مواجه سلولی:

پس از شمارش سلول‌های موجود در سوسپانسیون، با توجه به سلول‌های شمارش شده و متناسب با ورود ۱۵۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از

پلیت کشت سلولی، سلول‌های موجود در سوسپانسیون در پلیت کشت سلولی توزیع شده و آن‌ها با ۱۰ تا ۴۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RhD با غلظت اولیه $۱۵،۵۰۰۰۰۰۰\frac{Cell}{mL}$ تا ۴۰ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RhD با غلظت اولیه $\frac{\mu gr}{mL}$ ۷۰ ، ۱۰ میکرولیتر اینترلوکین۴ (IL-4)(ابکم، انگلستان) با غلظت اولیه $\frac{pgr}{mL}$ ۱۹، ۱۰ میکرولیتر اینترفرون گاما(IFN-γ) (ابکم، انگلستان) $\frac{pgr}{mL}$۱۰۰۰، ۱تا ۳ میکرولیتر CpGODN (نوواس، آمریکا) با غلظت اولیه $\frac{\mu gr}{mL}$ ۲۰۰ مواجه شدند. پس از پایان مواجه سلولی، پلیت کشت سلولی به درون انکوباتور CO_2 دار منتقل گردید.

سنجش الایزا :

پس از مواجه لنفوسیت‌های موجود در سوسپانسیون سلولی با آنتی‌ژن ذره‌ای و محلول RhD، IL-4 ، IFN-γ و CpGODN، سپس انکوباسیون به منظور بررسی تولید آنتی‌بادی، آزمایش الایزا انجام شد. آزمایش الایزا بر روی پلیت کوت شده با آنتی‌هیومن گلوبولین(AHG) انجام گردید. از این پلیت جهت غربالگری تولید آنتی‌بادی توسط لنفوسیت‌های تحریک شده با عوامل بهینه‌کننده استفاده شد.

کوت‌کردن پلیت الایزا با AHG:

AHG (ابکم، انگلستان) با غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به مقدار ۲۰۰X رقیق شده تا به AHG با غلظت ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دست یافته شود. سپس به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا به استثناء چاهک‌های انتهایی هر ردیف(Strip) میزان ۵۰ میکرولیتر از AHG به مقدار ۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. در هر Strip از پلیت الایزا چاهک انتهایی به عنوان چاهک کوت نشده (non-coated) خالی گذاشته شده و با ۵۰ میکرولیتر محلول PBS پر گردید . این چاهک‌های non-coated در انتهای هر Strip به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته می‌شود. پلیت کوت شده از AHG پوشانیده شده و در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد.

بلوکه‌کردن پلیت الایزا کوت شده با AHG:

پس از ۲۴ ساعت از انکوبه کردن پلیت الایزا جهت کوت شدن آنتی‌هیومن گلوبولین، به منظور بلوکه کردن مناطق خالی انتهای هر چاهک و برای جلوگیری از نتایج کاذب از سرم آلبومین گاوی ۲٪ (BSA ۲٪) (مدیتال، ایران) به عنوان بلاکر استفاده شد.

شیوه اجرای الایزا :

۵۰ میکرولیتر از سوپ رویی پلیت کشت سلولی پس از مواجه، به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا افزوده شده و سپس به مدت۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در این مرحله علاوه بر افزودن ۵۰ میکرولیتر سوپ رویی پلیت کشت سلولی، ۵۰ میکرولیتر سرم حاوی IgG با غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل‌های مثبت نیز به چاهک‌ها اضافه شد.

هم‌چنین در هنگام اجرای آزمایش الایزای کمی نیز به چاهک‌ها۵۰ میکرولیتر نمونه‌های استاندارد حاوی آنتی‌بادیIgG با غلظت ۰/۲ ، ۲ ، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر اضافه شد. لازم به ذکر است که چاهک‌های non-coated در پلیت الایزا به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شده و سوپ رویی پلیت کشت قرار گرفته در این چاهک‌ها به صورت دوتایی (duplicate) مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از انکوباسیون، خروج محتویات پلیت الایزا، سه بار شست و شو با محلول شست و شو دهنده (Washing Buffer 20X)(آدالتیس، ایتالیا) انجام پذیرفت. پس از سه مرحله شست و شو ، ۵۰ میکرولیتر از محلول کونژوگه رقیق شده به چاهک‌های الایزا افزوده شده و به مدت۴۰ دقیقه پلیت حاوی محلول کونژوگه(ابن‌سینا، ایران) در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از

پایان انکوباسیون پلیت الایزا با محلول کونژوگه، مجدداً سه بار چاهک‌ها با محلول شستشو دهنده شست و شو داده شد. سپس ، ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترای حاوی TMB (سیمنس، آلمان) به چاهک‌ها اضافه شده و انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در محیط تاریک انجام شد. ۲۵ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده(Stop Solution)(اینویتروژن، آمریکا) به چاهک‌ها افزوده شده و سپس قرائت OD چاهک‌ها توسط دستگاه الایزا ریدر تکان TECAN در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام پذیرفت.

نرم‌افزار آماری و آزمون‌های آماری:

جهت تعیین غلظت آنتی‌بادی از الایزای کمی استفاده شد و با استفاده از نرم‌افزار Microsoft Office Excel میانگین و انحراف معیار آنتی‌بادی تولیدی حاصل از دفعات مختلف کاری بررسی شد. جهت بررسی بهینگی عوامل بهبود دهنده ایمونیزاسیون نیز از نرم‌افزارSPSS نسخه ۲۶ استفاده شده و از آنالیز آماری ANOVA جهت دستیابی به بهینه کننده‌ترین عامل استفاده گشت.

یافته‌ها

اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌ژنی در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی:

برای بررسی غلظت های مختلف آنتی‌ژنی در القای ایمونیزاسیون آزمایشگاهی از ۱۰ ، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RhD با غلظت اولیه $۵۰۰۰۰۰۰\frac{Cell}{mL}$ و ۱۵ ، ۳۰ و ۴۰ میکرولیتر از آنتی‌ژن محلول RhD با غلظت اولیه $۷۰\frac{\mu gr}{mL}$ استفاده شد. بدین منظور در پلیت کشت سلولی، لنفوسیت‌های جدا شده به روش فایکول با غلظت‌های ذکر شده مواجه گشته و یک هفته پس از انکوباسیون جهت ارزیابی ایمونیزاسیون و تولید آنتی‌بادی آزمایش الایزا انجام شد. نتایج الایزا به صورت OD در جدول گزارش گردید(جدول ۱). لازم به ذکر ا ست که این آزمایش‌ها در دو ران کاری انجام شده و هر ران تنها یک بار انجام شده است. بدین صورت که یک ران کاری مرتبط با آنتی‌ژن محلول و ران بعدی مربوط به آنتی‌ژن ذره‌ای می‌باشد.

اثر اینترلوکین ۴ (IL-4)، اینترفرون گاما(IFN-γ) و CPGODN در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی:

به منظور ارزیابی اثر IL-4 ، IFN-γ وCPGODN در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی در یکی از پلیت‌های کشت سلولی حاصل از مواجه با آنتی‌ژن‌های محلول و ذره‌ای RhD میزان ۱۰ میکرولیتر IL-4 با غلظت اولیه $۱۹\frac{pgr}{mL}$، ۱۰ میکرولیتر IFN-γ با غلظت اولیه $۱۰۰۰\frac{pgr}{mL}$ و ۲۰ میکرولیتر از ترکیب IL-4 و IFN-γ به چاهک‌های پلیت کشت سلولی افزوده شد. در پلیت دیگر نیز به لنفوسیت‌ها که با آنتی‌ژن محلول و ذره‌ای RhD مواجه شده بودند میزان ۲۵ میکرولیتر IFN-γ با غلظت اولیه $۱۰۰۰\frac{pgr}{mL}$ و ۳ میکرولیتر CpGODN با غلظت اولیه $۲۰۰\frac{\mu gr}{mL}$ اضافه گردید.

جدول ۱: ارزیابی اثر غلظت‌های مختلف آنتی‌ژن RhD در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی به روش الایزای کیفی

نوع آنتی‌ژن	آنتی‌ژن ذره‌ای RhD			آنتی‌ژن محلول RhD		
غلظت آنتی‌ژن	۱۰ میکرولیتر (۵۰۰۰۰ سلول)	۲۰ میکرولیتر (۱۰۰۰۰۰ سلول)	۴۰ میکرولیتر (۲۰۰۰۰۰ سلول)	۱۵ میکرولیتر (۱/۰۵ میکروگرم)	۳۰ میکرولیتر (۲/۱ میکروگرم)	۴۰ میکرولیتر (۲/۸ میکروگرم)
OD پس از مواجه سلولی	۰/۱۴۶	۰/۲۵۳	۰/۵۷۳	۰/۵۳۳	۰/۷۳۲	۰/۹۴۱
OD کنترل منفی	۰/۰۸۳	۰/۰۸۵	۰/۰۸۷	۰/۱۰۹	۰/۰۹۸	۰/۱۰۵
OD کنترل مثبت ($IgG۱۰۰\frac{ngr}{mL}$)	۱/۴۸۶	۱/۴۸۶	۱/۴۸۶	۱/۲۲۴	۱/۲۲۴	۱/۲۲۴

جدول ۲: غلظت آنتی‌بادی ناشی از تحریک لنفوسیت‌ها با IL-4 و IFN-γ در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی به روش الایزای کمی*

۱۵ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RHD (۱/۰۵ میکروگرم) + ۱۰ میکرولیتر IFN-γ (۱۰ پیکوگرم) + ۱۰ میکرولیتر IL-4 (۰/۱۹ پیکوگرم)	۱۵ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RHD (۱/۰۵ میکروگرم) + ۱۰ میکرولیتر IL-4 (۰/۱۹ پیکوگرم)	۱۵ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RHD (۱/۰۵ میکروگرم) + ۱۰ میکرولیتر IFN-γ (۱۰ پیکوگرم)	۱۵ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RHD (۱/۰۵ میکروگرم)	
۵۶/۷۰۱	۴۲/۱۰۱	۵۶/۸۶۱	۱۰/۹۱۲	
۷۳/۲۹۴	۴۵/۸۳۲	۷۴/۰۹۲	۲۲/۷۵۳	
۱۰۵/۰۵۰	۵۵/۱۱۵	۱۰۲/۶۶۰	۲۷/۷۳۴	
۱۲۱/۷۲۵	۷۰/۹۹۷	۱۲۰/۱۳۵	۲۹/۷۱۰	
۱۳۰/۱۳۲	۷۵/۶۷۱	۱۳۱/۲۴۶	۳۱/۹۳۴	
۹۷/۳۷۴ ± ۲۸/۱۳۵	۵۷/۹۴۲ ± ۱۳/۳۳۵	۹۶/۹۹۰ ± ۲۱/۵۲۳	۲۴/۵۱۲ ± ۷/۴۲۴	میانگین ± SD
۲۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RHD (۱۰۰۰۰۰ سلول) + ۱۰ میکرولیتر IFN-γ (۱۰ پیکوگرم) + ۱۰ میکرولیتر IL-4 (۰/۱۹ پیکوگرم)	**۲۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RHD (۱۰۰۰۰۰ سلول) + ۱۰ میکرولیتر IL-4 (۰/۱۹ پیکوگرم)**	**۲۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ایRHD (۱۰۰۰۰۰ سلول) + ۱۰ میکرولیتر IFN-γ (۱۰ پیکوگرم)**	**۲۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RHD (۱۰۰۰۰۰ سلول)**	
۴۰/۳۵۱	۲۳/۱۲۵	۲۷/۶۵۱	۰/۲۶۵	
۴۱/۳۸۲	۲۵/۸۲۰	۲۹/۲۴۳	۰/۵۱۲	
۷۷/۳۴۶	۲۷/۴۹۳	۳۹/۹۵۲	۲۱/۴۶۰	
۷۸/۰۶۲	۳۴/۷۹۲	۸۷/۵۸۴	۲۱/۹۳۱	
۹۷/۹۰۱	۴۰/۱۹۴	۸۹/۱۷۲	۲۳/۹۲۵	
۶۷/۰۰۶ ± ۲۲/۵۰۱	۳۰/۲۸۲ ± ۶/۲۲۰	۵۴/۷۱۲ ± ۲۷/۸۲۳	۱۳/۶۱۲ ± ۱۰/۸۱۲	میانگین ± SD

*غلظت‌ها بر حسب $\frac{ngr}{mL}$ می‌باشند(هر ردیف از جدول مربوط به یک آزمایش است).

جدول ۳: غلظت آنتی‌بادی ناشی از تحریک لنفوسیت‌ها با CPGODN و IFN-γ در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی به روش الایزای کمی*

۳۰ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RHD (۲/۱ میکروگرم) + ۳ میکرولیتر CPGODN (۳ میکروگرم) + ۲۵ میکرولیتر IFN-γ (۲۵ پیکوگرم)	۳۰ میکرولیتر آنتی‌ژن محلول RHD (۲/۱ میکروگرم) + ۳ میکرولیتر CPGODN (۳ میکروگرم)	
۶۹/۸۸۱	۳۷/۳۳۱	
۷۰/۵۱۲	۴۳/۶۰۰	
۷۷/۹۰۱	۶۹/۱۶۵	
۸۱/۷۱۳	۷۶/۸۶۶	
۱۲۴/۱۰۵	۷۸/۳۷۲	
۸۴/۸۲۵ ± ۲۰/۱۱۰	۶۱/۰۶۶ ± ۱۷/۲۲۵	میانگین ± SD
۴۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RHD (۲۰۰۰۰۰ سلول) + ۳ میکرولیتر CPGODN (۳ میکروگرم) + ۲۵ میکرولیتر IFN-γ (۲۵ پیکوگرم)	**۴۰ میکرولیتر آنتی‌ژن ذره‌ای RHD (۲۰۰۰۰۰ سلول) + ۳ میکرولیتر CPGODN (۳ میکروگرم)**	
۳۳/۴۴۲	۲۵/۲۷۱	
۴۲/۴۹۰	۳۴/۱۶۵	
۴۷/۴۹۱	۴۸/۶۸۰	
۵۶/۲۳۵	۵۳/۷۶۲	
۶۰/۵۹۲	۵۵/۱۱۲	
۴۸/۰۴۳ ± ۹/۶۴۲	۴۳/۳۹۰ ± ۱۱/۷۲۳	میانگین ± SD

*غلظت‌ها بر حسب $\frac{ngr}{mL}$ می‌باشند(هر ردیف از جدول مربوط به یک آزمایش است).

جدول ۴: مقایسه اثر مواد کمک تحریکی شامل IFN-γ ، IL-4 ، CPGODN و ترکیب آن‌ها به منظور تحریک لنفوسیت‌ها در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی جهت تولید آنتی‌بادی*

مواد کمک تحریکی	تعداد نمونه	میانگین	انحراف معیار	کمینه	بیشینه	p-value
IFN-γ	۱۰	۷۵/۸۵۱	۳۶/۸۳۱	۲۷/۶۵۱	۱۳۱/۲۴۱	
IL-4	۱۰	۴۴/۱۱۲	۱۸/۲۵۲	۲۳/۱۲۰	۷۵/۶۷۵	
IFN-γ+IL-4	۱۰	۸۲/۱۹۵	۳۱/۲۹۳	۴۰/۳۵۵	۱۳۰/۱۳۳	۰/۰۱۴
CPGODN	۱۰	۵۲/۲۳۳	۱۸/۱۰۳	۲۵/۲۷۰	۷۸/۳۷۴	
CPGODN+IFN-γ	۱۰	۶۶/۱۳۴	۲۴/۸۱۴	۳۳/۴۴۲	۱۲۱/۱۰۱	
مجموع	۵۰	۶۴/۱۰۴	۲۹/۴۹۰	۲۳/۱۲۵	۱۳۲/۲۴۰	

*واحدهای گزارش شده بر حسب $\frac{ngr}{mL}$ می باشند.

متعاقباً یک هفته پس از انکوباسیون سلول‌های مواجه شده با آنتی‌ژن RhD ، IL-4 ، IFN-γ و CPGODN برای بررسی وضعیت ایمونیزاسیون و تولید آنتی‌بادی از آزمایش الایزا استفاده شد و نتایج به صورت OD گزارش گردید. سپس جهت تعیین غلظت آنتی‌بادی تولیدی حاصل از تحریک لنفوسیت‌ها با عوامل بهینه‌کننده ایمونیزاسیون از آزمایش الایزای کمی استفاده شد.

در آزمایش الایزای کمی از نمونه‌های استاندارد حاوی آنتی‌بادی IgG با غلظت‌های ۰/۲ ، ۲ ، ۱۰ و ۱۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر ($\frac{\text{ngr}}{\text{mL}}$) استفاده شده و پس از رسم نمودار غلظت – جذب نوری اقدام به تعیین

غلظت آنتی‌بادی موجود در سوپرناتانت حاصل از تحریک لنفوسیت‌ها با عوامل بهینه‌کننده ایمونیزاسیون گردید. بدین منظور جذب نوری نمونه‌های استاندارد(که به ترتیب غلظت برابر است با : ۰/۱۹۸ ، ۰/۳۰۱ ، ۰/۴۰۷ و ۱/۵۱۵) استفاده شد. نتایج این غلظت‌ها گزارش شدند(جداول ۲ و ۳). در نهایت برای مقایسه اثر IL-4 ، IFN-γ ، CPGODN و ترکیب IFN-γ با IL-4 و CPGODN به منظور تحریک لنفوسیت‌ها جهت تولید آنتی‌بادی در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی، از تجزیه و تحلیل آماری ANOVA استفاده شد. نتایج این تجزیه و تحلیل نشان داد میان میانگین تولید آنتی‌بادی توسط مواد تحریکی ذکر شده (شامل IL-4 ، IFN-γ ، CPGODN و ترکیب IFN-γ با IL-4 و CPGODN) اختلاف معناداری وجود دارد (p=۰/۰۱۴). به ترتیب ترکیب IFN-γ با IL-4 و ترکیب IFN-γ با CPGODN ، CPGODN با IL-4 دارای بیشترین اثرگذاری در تحریک لنفوسیت‌ها جهت تولید آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhD در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی می‌باشند(به ترتیب با تولید آنتی‌بادی به غلظت ۳۱/۲۹۳ ± ۸۲/۱۹۵ ، ۳۶/۸۳۱ ± ۷۵/۸۵۱، ۲۴/۸۱۴ ± ۶۶/۱۳۴، ۱۸/۱۰۳ ± ۵۲/۲۳۳ و ۱۸/۲۵۲ ± ۴۴/۱۱۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر) (جدول ۴).

بحث

امروزه آنتی‌بادی مونوکلونال در زمینه‌های مختلف هم‌چون تحقیقات، تشخیص و درمان مورد توجه هستند. بنابراین دستیابی به آنتی‌بادی اختصاصی برای آنتی‌ژن مورد نظر با میل ترکیبی بالا به منظور رسیدن به این اهداف، ضروری می‌باشد. یکی از این آنتی‌بادی‌های مونوکلونال که در علم ایمونوهماتولوژی و طب انتقال خون بسیار حائز اهمیت است و در تایپینگ سیستم Rh مورد استفاده قرار می‌گیرد، آنتی‌D می‌باشد. آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی ضد آنتی‌ژن D سیستم Rh علاوه بر طب انتقال خون، در بالین نیز حائز اهمیت می‌باشد به دلیل این که از این آنتی‌بادی در جهت تولید آمپول روگام به منظور جلوگیری از حساس‌سازی مادرRh منفی که دارای جنین Rh مثبت است، استفاده می‌شود. یکی از مراحل تولید آنتی‌بادی مونوکلونال، ایمونیزاسیون لنفوسیت‌ها می‌باشد. لذا موفقیت در تولید آنتی‌بادی مونوکلونال وابسته به بهینگی در مرحله ایمونیزاسیون لنفوسیت‌ها می‌باشد.

لنفوسیت‌های جدا شده به روش فایکول از کیسه‌های خون، لنفوسیت‌های بکری(Naïve Lymphocyte) هستند که تاکنون با آنتی‌ژن برخورد نکرده‌اند. طبق فرضیه دو سیگنالی(Two Signal Hypothesis) جهت تحریک لنفوسیت‌های بکر و افزایش قدرت تکثیر و تمایز آن‌ها، نیاز به دو سیگنال می‌باشد که سیگنال اول توسط آنتی‌ژن و سیگنال دوم توسط مواد کمک تحریکی(Co-Stimulatory Factor) القا می‌شود. از آن جایی که افزایش قدرت تکثیر و تمایز لنفوسیت‌های بکر با بهبود ایمونیزاسیون همراه می‌باشد، لذا جهت بهینگی و بهبود در ایمونیزاسیون لنفوسیت‌های بکر، آنتی‌ژن و مواد کمک تحریکی نقش به سزایی ایفا می‌کنند.

بنابراین در این مطالعه با بهره‌گیری از این فرضیه و با استفاده از آنتی‌ژن و مواد کمک تحریکی بررسی‌هایی صورت گرفته تا به آنتی‌بادی در محیط آزمایشگاهی دست یافته شود. از جمله مهم‌ترین مواد کمک تحریکی می‌توان به اینترلوکین ۴ (IL-4) و اینترفرون گاما(IFN-γ) اشاره کرد که نقش مهمی در بهبود و بهینگی ایمونیزاسیون ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داده‌اند که استفاده از IFN-γ ، IL-4 و ترکیبی از این دو ماده در همراهی با آنتی‌ژن می‌توانند در بهبود ایمونیزاسیون آزمایشگاهی مؤثر باشند. در مطالعه‌های ونجر و همکاران و ایچیم و همکاران نتایج مشابهی به دست آمده و یافته‌ها به ترتیب بیانگر نقش بهینه‌کننده IL-4 و IFN-γ در ایمونیزاسیون می‌باشند (۱۶، ۱۵). هم‌چنین در مطالعه حاضر نتایج نشان داده‌اند که

استفاده از ترکیب IL-4 و IFN-γ می‌توانند اثر سینرژیسمی(هم‌افزایی) در تحریک تولید آنتی‌بادی از لنفوسیت‌های B از طریق القای سلول‌های T کمکی نوع یک(Th1) داشته باشند و متعاقباً منجر به بهبود در ایمونیزاسیون آزمایشگاهی شوند. به گونه‌ای که در مطالعه کی‌گان و همکاران نیز این اثر سینرژیسمی ترکیبات IL4 وIFN-γ در تحریک لنفوسیت‌ها جهت تولید آنتی‌بادی و القای ایمونیزاسیون مشاهده شده است(۱۷).

به علاوه سیتوزین فسفوگوانین اولیگودئوکسی نوکلئوتید(CPG ODN) نیز می‌تواند به عنوان یک ماده محرک در القای ایمونیزاسیون آزمایشگاهی مؤثر واقع گردد.CPG ODN یک آگونیست رسپتور شبه Toll (Toll Like Receptor 9 = TLR9) می‌باشد که این رسپتور در درون سلول‌هایB نقش مهمی در افزایش انتقال سیگنال کمپلکس رسپتور B (B Cell Receptor = BCR) ایفا می‌کند لذا ماده CPG ODN با اتصال به این رسپتور می‌تواند در همراهی با آنتی‌ژن منجر به افزایش میزان سیگنالینگ مؤثر در تکثیر لنفوسیت‌ها شده و از این طریق در بهبود ایمونیزاسیون مؤثر باشد. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان‌دهنده نقشCPG ODN در بهبود و بهینگی ایمونیزاسیون می‌باشد. در مطالعه ژانگ و همکاران نیز یافته‌ها حاکی از این مطلب بودند که به کارگیری CPG ODN نقش مؤثری در افزایش ایمونیزاسیون ایفا می‌کند که این یافته‌ها با نتایج مطالعه ما مشابه بوده است(۱۸).

علاوه بر مواد محرک، آنتی‌ژن نیز در بهینگی ایمونیزاسیون آزمایشگاهی دخیل می‌باشد. از جمله مهم‌ترین پارامترهای مرتبط با آنتی‌ژن در بهبود و بهینگی ایمونیزاسیون می‌توان به غلظت و اشکال آنتی‌ژنی اشاره کرد. افزایش غلظت آنتی‌ژن از آن جایی که با افزایش سیگنال اول طبق فرضیه دو سیگنالی در تحریک لنفوسیت‌ها همراهی دارد لذا در بهبود و بهینگی ایمونیزاسیون دخیل است. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داده‌اند که با افزایش غلظت آنتی‌ژن، ایمونیزاسیون آزمایشگاهی افزایش می‌یابد. در مطالعه‌های اسپرنجر و همکاران و هم‌چنین بونن‌فنت و همکاران نتایج مشابه گزارش شده است و یافته‌ها بیانگر این مطلب می‌باشند که به ترتیب با افزایش غلظت آنتی‌ژن به میزان ۷ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر ایمونیزاسیون نیز افزایش می‌یابد و به عبارت دیگر افزایش غلظت آنتی‌ژن یک عامل بهینه‌کننده در ایمونیزاسیون می‌باشد(۲۰، ۱۹). از طرفی از آن جایی که آنتی‌ژن RhD یک ایمونوژن قوی است، لذا غلظت‌های بالای این آنتی‌ژن می‌تواند در بهینگی ایمونیزاسیون آزمایشگاهی و تولید آنتی‌بادی به تنهایی مؤثر باشد. طبق دستورالعمل‌های سازمان غذا و داروی آمریکا(FDA = Food and Drug Administration)، آنتی‌D مجوز استفاده در واحد بانک خون را دارد که به صورت ممزوج(Blend) تهیه شده باشد. آنتی‌D ممزوج حاوی ترکیبی از آنتی‌بادی IgM و IgG است. لذا با استفاده از غلظت‌های مناسب آنتی‌ژن RhD در هنگام مواجه لنفوسیت‌های B بکر با این آنتی‌ژن در اولین برخورد می‌توان آنتی‌بادی از کلاس IgM تولید نمود و در همراهی آنتی‌ژن RhD و IFN-γ که خود در بهینگی ایمونیزاسیون مؤثر بوده است می‌توان کلاس آنتی‌بادی را تغییر داد و آنتی‌بادی از کلاس IgG تهیه کرد و بدین ترتیب یک آنتی‌D ممزوج ایجاد نمود. پارامتر دیگر مرتبط با آنتی‌ژن در بهینگی ایمونیزاسیون، اشکال آنتی‌ژنی می‌باشد. آنتی‌ژن RhD یک آنتی‌ژن پروتئینی است و از نظر ساختمان فضایی دارای ساختار سوم و چهارم می‌باشد.

به گونه‌ای که آنتی‌ژن RhD تخلیص شده از سطح RBC دارای ساختمان فضایی اول ولی آنتی‌ژن ذره‌ای RhD موجود در سطح RBC دارای ساختمان سوم و چهارم است. طبق مطالعه‌های انجام شده، ساختار سوم و چهارم پروتئین‌ها به دلیل اپی‌توپ فضایی نسبت به ساختار اول آن‌ها که دارای اپی‌توپ خطی است، ایمونوژن‌تر می‌باشند اما در مطالعه حاضر آنتی‌ژن تخلیص شده از سطح(RBC آنتی‌ژن محلول) RhD توانسته است در بهبود ایمونیزاسیون

آزمایشگاهی مؤثر واقع گردد که علت آن خلوص آنتی‌ژنی می‌با شد. به گونه‌ای که در مطالعه‌های بارو سو و همکاران و هم‌چنین چن و همکـــاران، خلـــوص آنتی‌ژنی به عنوان یک عامل مهم در بهبود ایمونیزاســـیون گزارش شـــده است(۲۲، ۲۱).

نتیجه‌گیری

اســتفاده از اینترفــرون گامــا(IFN-γ)، ترکیــب آن بــا اینترلـــــوکین۴ (IL-4) وCpGODN بـــــه عنـــــوان بهینه‌کننـــده‌ترین عوامـــل جهـــت تولیـــد آنتی‌بـــادی از لنفوســـیت‌های جـــدا شـــده بـــه روش فـــایکول در ایمونیزاســیون آزمایشــگاهی شــناخته شــد. بررســی اثــر مخلــوط ســیتوکاین‌های مختلــف نیــاز بــه مطالعــه‌های بعدی دارد.

تشکر و قدردانی

ایـــن مقالـــه حاصـــل پایان‌نامـــه دانشـــجویی دوره کارشناســی ارشــد رشــته همــاتولوژی و طــب انتقــال خــون در مؤسســه عــالی آموزشــی و پژوهشــی طــب انتقــال خــون بــا کــد اخــلاق IR.TMI.REC.1400.008 می‌باشــد. بودجــه ایــن مطالعــه توســط مؤسســه عــالی آموزشی و پژوهشــی طــب انتقــال خــون تــأمین گردیــده و همــه مراحــل علمــی پــروژه در آزمایشــگاه آنتی‌بــادی مونوکلونال انجام شده است.

References:

1- Vege S, Westhoff CM. Rh and RhAG Blood Group Systems. In: Transfusion Medicine and Hemostasis. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 149-55.
2- Thornton NM, Grimsley SP. Clinical significance of antibodies to antigens in the ABO, MNS, P1PK, Rh, Lutheran, Kell, Lewis, Duffy, Kidd, Diego, Yt, and Xg blood group systems. Immunohematology 2019; 35(3): 95-101.
3- Panch SR, Montemayor-Garcia C, Klein HG. Hemolytic transfusion reactions. N Engl J Med 2019; 381(2): 150-62.
4- Thompson K, Melamed M, Eagle K, Gorick B, Gibson T, Holburn A, *et al*. Production of human monoclonal IgG and IgM antibodies with anti-D (rhesus) specificity using heterohybridomas. Immunology 1986; 58(1): 157-60.
5- Marks L. Monoclonal antibodies and the transformation of blood typing. MAbs 2014; 6(6): 1362-7.
6- Kim H-Y, Stojadinovic A, Izadjoo MJ. Immunization, hybridoma generation, and selection for monoclonal antibody production. Methods Mol Biol 2014; 1131: 33-45.
7- Matsumoto SE, 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- Leenaars M, Hendriksen CF. Critical steps in the production of polyclonal and monoclonal antibodies: evaluation and recommendations. ILAR J 2005; 46(3): 269-79.
9- Scott M, Voak D. Monoclonal antibodies to Rh D--development and uses. Vox Sang 2000; 78: 79-82.
10- Schroff RW, Foon KA, Beatty SM, Oldham RK, Morgan Jr AC. Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. Cancer Res 1985; 45(2): 879-85.
11- Bron D, Feinberg MB, Teng N, Kaplan HS. Production of human monoclonal IgG antibodies against Rhesus (D) antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 1984; 81(10): 3214-7.
12- Yamashita M, Katakura Y, Shim SY, Matsumoto SE, Tamura T, Morihara K, *et al*. Different individual immune responses elicited by in vitro immunization. Cytotechnology 2002; 40(1): 161-5.
13- Zhang B, Yuan C, Song X, Xu L, Yan R, Shah MAA, *et al*. Optimization of immunization procedure for Eimeria tenella DNA vaccine pVAX1-pEtK2-IL-2 and its stability. Acta Parasitol 2019; 64(4): 745-52.
14- Xu T, Qi Y, Pan Y, Li S, Chen H, Li J, *et al*. Screening of immune adjuvant and optimization of immunization protocol of glycoprotein D2 subunit vaccine against herpes simplex virus type 2. Chinese Journal of Biologicals 2018; 31(7): 689-94.
15- Wagner B, Perkins G, Babasyan S, Freer H, Keggan A, Goodman LB, *et al*. Neonatal immunization with a single IL-4/antigen dose induces increased antibody responses after challenge infection with equine herpesvirus type 1 (EHV-1) at weanling age. PLoS One 2017; 12(1): e0169072.
16- Wagner SC, Ichim TE, Bogin V, Min W-P, Silva F, Patel AN, *et al*. Induction and characterization of anti-tumor endothelium immunity elicited by ValloVax therapeutic cancer vaccine. Oncotarget 2017; 8(17): 28595.
17- Keegan AD, Leonard WJ, Zhu J. Recent advances in

understanding the role of IL-4 signaling. Fac Rev 2021; 10: 71.
18- Zhang X, Zhao T, Zeng T, Wu N, Xiao Y, Liu S, *et al*. Intramuscular primary immunization by nucleic acid vaccine pcDNA/Gpd-IL-2 and enhanced immunization with mucosal adjuvant CpG-ODN and Gpd-IL-2 recombinant protein effectively induced strong mucosal immune responses and immune protective effects against Treponema pallidum skin infection. Exp Ther Med 2018; 15(3): 2533-40.
19- Sprenger KG, Louveau JE, Murugan PM, Chakraborty AK. Optimizing immunization protocols to elicit broadly neutralizing antibodies. Proc Natl Acad Sci USA 2020; 117(33): 20077-87.
20- Bonenfant C, Dimier-Poisson I, Velge-Roussel F, Buzoni-Gatel D, Del Giudice G, Rappuoli R, *et al*. Intranasal immunization with SAG1 and nontoxic mutant heat-labile enterotoxins protects mice against Toxoplasma gondii. Infect Immun 2001; 69(3): 1605-12.
21- Barroso L, Abhyankar M, Noor Z, Read K, Pedersen K, White R, *et al*. Expression, purification, and evaluation of recombinant LecA as a candidate for an amebic colitis vaccine. Vaccine 2014; 32(10): 1218-24.
22- Chen X, Sheng Z, Qiu S, Yang H, Jia J, Wang J, *et al*. Purification, characterization and in vitro and in vivo immune enhancement of polysaccharides from mulberry leaves. PLoS One 2019; 14(1): e0208611.

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (4): 257-269

Original Article

Evaluation of effective factors in the optimization of immunization to achieve antibodies against RhD antigen in culture medium

Amrovani M.[1], Yari F.[1], Milani S.[1], Amoohossein B.[1]

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

Abstract

Background and Objectives

Antibody against RhD antigen is important in blood transfusion and clinical medicine. Therefore, in this study, the effective factors in the optimization of in vitro immunization to achieve immunized lymphocytes that produce antibodies were evaluated to obtain antibodies against RhD antigen in the culture medium.

Materials and Methods

In an experimental study peripheral blood mononuclear cells were isolated from O-Negative whole blood bags using the Ficoll method. These cells were treated with L-leucyl-L-leucine methyl ester (LLME) and were exposed to soluble and particulate RhD antigen, interferon-gamma (IFN-γ), interleukin-4 (IL-4) and CpGODN in a culture plate at 37°C for one week. After this period of incubation, in order to evaluate the production of antibodies from lymphocytes on the supernatant obtained from the culture medium, ELISA assay was performed.

Results

The use of IFN-γ, IFN-γ + IL-4 and IFN-γ + CpGODN was identified as the most optimal factors for the production of antibodies in an in vitro immunization (by producing antibodies with concentrations of 75.851 ± 36.831, 82.195 ± 31.293, and 66.134 ± 24.814 $\frac{\text{ngr}}{\text{ml}}$ in 10 exposures).

Conclusions

The use of immunization optimization agents, has an effective role in the production of antibodies against RhD antigen in the *in vitro* culture.

Key words: Immunization, *In Vitro* Techniques, Antibodies

Received: 6 Aug 2022
Accepted: 6 Sep 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*