Original Article

Compairing the Immune Response Induced in Peripheral Blood Mononuclear Cells by RhD$^+$ Red Blood Cells and their Membrane Extract in Culture Medium

Faezeh Kheiri Ardahaei[1], Fatemeh Yari[1] , Behnaz Amo Hossein

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

Received: 2025/11/13
Accepted: 2026/01/07

http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.22.4.297

Citation:
Kheiri Ardahaei F, Yari F, Amo Hossein B. Compairing the Immune Response Induced in Peripheral Blood Mononuclear Cells by RhD$^+$ Red Blood Cells and their Membrane Extract in Culture Medium. J Iran Blood Transfus. 2025: 22 (4): 297-304

Correspondence: Yari F., 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
E-mail: *f.yari@tmi.ac.ir*

ABSTRACT

Background and Objectives

The Rh blood group system is one of the most significant and complex antigenic systems of blood group. The production of specific antibodies against RhD is of great importance for diagnostic and therapeutic applications. This study aims to evaluate the immune response generated in peipheral blood mononuclear cells (PBMCs) by red blood cells containing the RhD antigen and their membrane extracts in a cell culture medium.

Materials and Methods

In this experimental study, PBMCs were isolated from two whole blood units with O- blood type using a density gradient method and Ficoll reagent. After a 40-minute exposure to L-leucine methyl ester (2.5 mM) and subsequent washing, the cells were exposed to red blood cells containing the RhD antigen or their membrane extract in a culture medium. Their ability to induce the production of specific antibodies was assessed using the ELISA method.

Results

Following immunization of PBMCs with O$^+$ red blood cells or their membrane extract, antibody production was quantitatively assessed using ELISA method. The mean concentration of total antibodies was 159.3±51.19 ng/mL in response to membrane extract (n=4) and 136.5±38.9 ng/mL following stimulation with O$^+$ RBC (n=2). In addition, the concentration of RhD-specific antibodies was measured as 38.17±10.58 ng/mL in response to membrane extract and 18.75±2.95 ng/mL in response to O$^+$ RBC cells. The data indicate that both antigenic forms are capable of inducing an immune response. Wilcoxon method showed that the differences between two groups of antigens in both evaluated total antibodies and RhD-specific antibodies were not significant.

Conclusions

Based on the findings of this study, it seems that the membrane extract of RBC plays a more effective role in the immunogenicity against the RhD antigen in compare to O$^+$ RBC cells but the difference were not significant. Based on the data, the use of both membrane extracts and the whole red blood cells could be helpful in the context of immunization strategies in culture conditions.

Key words: *In vitro*, Immunizaltion, Antibody Response, Red Blood Cells

Copyright © 2025 Journal of Iranian Blood Transfusion, Published by Blood Transfusion Research Center.
This work is licensed under a Creative Common Attribution-Non Commercial 4.0 International license.

فصلنامه پژوهشی خون
دوره ۲۲ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۴ (۳۰۴-۲۹۷)

مقاله پژوهشی

مقایسه القای پاسخ ایمنی در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی توسط گلبول‌های قرمز واجد آنتی‌ژن RhD و عصاره غشایی حاصل از آن سلول‌ها در محیط کشت سلولی

فائزه خیری اردهایی[۱]، فاطمه یاری[۲]، بهناز عموحسین[۳]

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی آزمایشگاهی و علوم انتقال خون ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۲- PhD ایمونولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۳- کارشناس علوم آزمایشگاهی ـ مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۲
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۷

http://dx.doi.org/10.66224/bloodj.22.4.297

Citation:
Kheiri Ardahaei F, Yari F, Amo Hossein B. Compairing the Immune Response Induced in Peripheral Blood Mononuclear Cells by RhD+ Red Blood Cells and their Membrane Extract in Culture Medium. J Iran Blood Transfus. 2025: 22 (4): 297-304

نویسنده مسئول:
دکتر فاطمه یاری. استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
E-mail: *f.yari@tmi.ac.ir*

کد اخلاق:
IR.TMI.REC.1403.004

چکیده

سابقه و هدف

سیستم گروه خونی Rh یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین سیستم‌های آنتی‌ژنی پس از ABO است. تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد RhD برای کاربردهای تشخیصی و درمانی اهمیت بالایی دارد. هدف از این مطالعه، ارزیابی پاسخ ایمنی ایجاد شده در سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به وسیله گلبول‌های قرمز واجد آنتی‌ژن RhD و عصاره غشایی آن‌ها در محیط کشت سلولی بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) از ۲ کیسه خون کامل با گروه خونی O منفی به روش گرادیان چگالی و با استفاده از معرف فایکول جداسازی شدند. سپس به منظورحذف سلول‌های مهارکننده ایمنی، سوسپانسیون سلولی حاصله به مدت ۴۰ دقیقه با لوسین متیل استر (۲/۵ میلی‌مولار) مواجه شده و پس از شستشو، در معرض گلبول‌های قرمز واجد آنتی‌ژن RhD و عصاره غشایی آن‌ها در محیط کشت قرار گرفته و توانایی آن‌ها در القای تولید آنتی‌بادی توتال و اختصاصی با استفاده از آزمون ELISA ارزیابی شد. با توجه به محدود بودن تعداد تکرارهای آزمایش، از روش ویلکاکسون به عنوان روش آماری غیر پارامتریک استفاده شد.

یافته‌ها

پس از ایمن‌سازی سلول‌های PBMCs با گلبول قرمز O^+ و عصاره غشایی آن‌ها، میزان تولید آنتی‌بادی با روش کمی ELISA تعیین شد. میانگین غلظت توتال آنتی‌بادی در مواجهه با عصاره غشایی ۵۱/۱۹ ± ۱۵۹/۳ نانوگرم در میلی‌لیتر (n=۴) و در مواجهه با گلبول قرمز کامل ۳۸/۹ ± ۱۳۶/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر (n=۲) ارزیابی شد. هم‌چنین، غلظت آنتی‌بادی اختصاصی علیه RhD در حضور عصاره غشایی ۱۰/۵۸ ± ۳۸/۱۷ و در حضور گلبول قرمز کامل ۲/۹۵ ± ۱۸/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر اندازه‌گیری شد. بر اساس داده‌ها، هر دو فرم آنتی‌ژن قادر به القای پاسخ ایمنی هستند. آزمون ویلکاکسون نشان داد که تفاوت بین دو گروه از آنتی‌ژن‌ها در هر دو نوع ارزیابی آنتی‌بادی کل و آنتی‌بادی‌های اختصاصی RhD معنادار نمی‌باشد.

نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های مطالعه، به نظر می‌رسد که آنتی‌ژن غشایی گلبول قرمز نسبت به سلول کامل بهتر بتواند در القای پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن RhD در محیط کشت مؤثر باشد، ولی تفاوت آماری این دو معنادار نبوده و بر این اساس، استفاده از عصاره غشایی گلبول قرمز و سلول کامل هر دو می‌توانند در تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آنتی‌ژن RhD در شرایط کشت سلولی مد نظر قرار گیرند.

کلمات کلیدی: محیط کشت، ایمنی‌زایی، پاسخ آنتی‌بادی، سلول‌های قرمز خون

مقدمه

سیستم گروه خونی Rh یکی از مهم‌ترین و پیچیده‌ترین سیستم‌های آنتی‌ژنی در طب انتقال خون است که پس از سیستم ABO بیشترین اهمیت بالینی را دارد (۱). در میان آنتی‌ژن‌های این سیستم، آنتی‌ژن RhD به دلیل ایمونوژنیسیته بالا دارای اهمیت ویژه‌ای می‌باشد (۲). این آنتی‌ژن یک پروتئین غشایی با لوپ‌های خارج سلولی قابل دسترس برای سیستم ایمنی است (۳). حتی مقادیر اندک گلبول قرمز RhD مثبت می‌توانند پاسخ ایمنی شدیدی در افراد RhD منفی ایجاد کنند، که در شرایط تزریق خون ناسازگار یا بارداری منجر به تولید آنتی‌بادی‌های آلوایمیون علیه RhD می‌شود (۴). تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی ضد RhD در تشخیص و انتقال خون اهمیت دارد و هم‌چنین در تولید فرآورده‌های درمانی مانند ایمونوگلوبولین ضد D نقش حیاتی ایفا می‌کند (۶-۴). جهت تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی، معمولاً دو رویکرد اصلی وجود دارد: ایمنی‌زایی در حیوانات (*in-vivo* immunization) و ایمنی‌زایی آزمایشگاهی (*in-vitro* immunization) (۷). ایمنی‌زایی در حیوانات می‌تواند پاسخ طبیعی با میل ترکیبی بالا و کلاس‌های متنوع آنتی‌بادی ایجاد کند، اما معایبی مانند هزینه بالا، زمان‌بر بودن و مسائل اخلاقی دارد (۸). در روش ایمنی‌زایی *in vitro* ، سلول‌های تک هسته‌ای یا لنفوسیت‌های B و T، در حضور آنتی‌ژن در شرایط کنترل شده، کشت داده می‌شوند (۹). کنترل دقیق شرایط آزمایش، کوتاه‌تر بودن و عدم وجود سختی کار با حیوانات از مزایای این نوع ایمنی‌زایی می‌باشد (۱۰)، اما برای تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی IgG نیازمند بهینه‌سازی شرایط کشت است (۱۱). در تولید آنتی‌بادی‌های اختصاصی، نوع آنتی‌ژن، نقش تعیین کننده‌ای در شدت و اختصاصیت پاسخ ایمنی ایفا می‌کند (۱۲). گلبول‌های قرمز کامل RhD مثبت، که آنتی‌ژن RhD را به صورت طبیعی ارائه می‌کنند، می‌توانند پاسخ ایمنی قوی و پایدار مشابه شرایط *in vivo* ایجاد کنند، اما دسترسی اپی‌توپ‌ها و کنترل دقیق دوز در شرایط *in vitro* محدود است، در حالی که عصاره غشایی آسان‌تر قابل استفاده است و توانایی القای پاسخ چند اپی‌توپی دارد (۱۴، ۱۳)، هر چند احتمال القای پاسخ‌های غیر اختصاصی وجود دارد (۱۵). با توجه به اهمیت بالینی آنتی‌ژن RhD و نقش کلیدی آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه آن، شناسایی شکل آنتی‌ژنی مؤثر برای القای پاسخ ایمنی در شرایط آزمایشگاهی اهمیت فراوانی دارد. در این مطالعه، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) در شرایط کشت آزمایشگاهی با عصاره غشایی دارای آنتی‌ژن D و گلبول قرمز O مثبت در چاهک‌های جداگانه، تحریک شدند. سپس به منظور سنجش توانایی این اشکال آنتی‌ژنی در القای تولید آنتی‌بادی اختصاصی، سوپرناتانت حاصل از کشت سلول‌ها، با روش الایزا مورد سنجش قرار گرفتند. هدف نهایی پژوهش، ارزیابی پتانسیل ایمنی‌زایی عصاره غشایی دارای آنتی‌ژن D و گلبول قرمز O^+ در القای پاسخ ایمنی اختصاصی و شناسایی رویکرد بهینه برای ایمنی‌زایی *in vitro* علیه این آنتی‌ژن بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون کامل:

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) از ۲ کیسه خون کامل O منفی با استفاده از روش استاندارد گرادیان چگالی فایکول (بهار افشان، ایران) جدا شدند (۱۷، ۱۶). سلول‌ها پس از شستشو با بافر فسفات (PBS) برای کشت سلولی آماده شدند. به منظور حذف سلول‌های سرکوبگر ایمنی، سوسپانسیون سلولی با ال لوسین متیل استر (مرک، آلمان) با غلظت ۲/۵ میلی‌مولار تیمار گردیده و به مدت ۴۰ دقیقه در شرایط انکوباسیون نگهداری شد. در پایان سلول‌ها سه بار با PBS شستشو داده شدند (هر ۵ دقیقه با دور g۴۰۰). در نهایت، رسوب سلولی هموژن گردید و حجم آن با محیط کشت RPMI (بایوسرا، فرانسه) حاوی ۱۰ ٪ FBS (گرینر، آلمان) به ۴ میلی‌لیتر رسانده شد.

آماده‌سازی آنتی‌ژن‌ها:

عصاره آنتی‌ژن D با لیز سلول‌های RhD مثبت و استخراج پروتئین‌های غشایی با استفاده از روش‌های استاندارد تهیه شد. برای دستیابی به عصاره غشایی محلول واجد RhD جهت ایمونیزاسیون در محیط کشت، ۳ کیسه گلبول قرمز متراکم از پایگاه انتقال خون تهران تهیه شد. گلبول‌های قرمز با انجام سانتریفوژ از سایر سلول‌های خونی جدا شده و با بافر محلول‌سازی یا solubilize واجد تریس، Nonidet P-40 و EDTA مواجه شدند. در ضمن از مهار کننده پروتئازی PMSF نیز در بافر مورد نظر استفاده شد:
25 mM Tris-HCL, 150 mM NaCL, 10 mM EDTA, 1.0% NP-40, pH 7.5 and 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride

پروتئین‌های غشایی محلول‌سازی شده و با انجام سانتریفوژ از سایر اجزا سلولی جدا شدند. سوپرناتانت پس از

جمع‌آوری، دیالیز شد تا بافر محلول‌سازی از پیرامون پروتئین‌ها خارج شده و با PBS جایگزین گردد. به این منظور، از کیسه دیالیز استفاده شد. گلبول‌های قرمز RhD مثبت از خون اهدایی RhD مثبت تهیه و پس از شستشو با PBS در شرایط استریل، مورد استفاده قرار گرفت.

ایمونیزاسیون سلولی در محیط کشت:

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، پس از شمارش در هر چاهک به تعداد ۳×۱۰^{۵} سلول توزیع شدند و به طور جداگانه با گلبول‌های قرمز و عصاره غشایی آن‌ها تحریک شدند: ۱۰ میکرولیتر عصاره آنتی‌ژن RhD حاوی ۱µg پروتئین و ۳ میکرولیتر گلبول قرمز O^{+} استفاده شد. برای تقویت پاسخ ایمنی، ۱۵ میکرولیتر اینترلوکین-۴ (ابکم، انگلستان) با غلظت ۱۹ pg/mL و ۳۰ میکرولیتر اینترفرون گاما (ابکم، انگلستان) با غلظت ۶/۹ pg/mL به محیط کشت اضافه گردیدند. پس از پایان مواجهه سلولی، پلیت‌های کشت سلولی به درون انکوباتور CO_2 دار منتقل شدند.

سنجش تولید آنتی‌بادی با روش ELISA:

پس از یک هفته انکوباسیون، سوپرناتانت کشت سلولی جمع‌آوری و برای سنجش تولید آنتی‌بادی مورد استفاده قرار گرفت. از پلیت‌های پوشش داده شده با آنتی‌هیومن گلوبولین (AHG) (ابکم، انگلستان) جهت سنجش توتال آنتی‌بادی و از پلیت پوشش داده شده با پپتید ویژه RhD (کپنهاک، دانمارک) برای سنجش آنتی‌بادی‌های اختصاصی استفاده شد. مقادیر آنتی‌بادی ایجاد شده، با به کارگیری استانداردهای IgG انسانی بر حسب ng/mL تعیین گردید. برای آماده‌سازی پلیت الایزای AHG، محلول AHG با غلظت نهایی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس، به هر چاهک از پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا، به جز چاهک‌های انتهایی هر ردیف، مقدار ۵۰ میکرولیتر از این محلول افزوده شد. چاهک انتهایی هر ستون پلیت الایزا، تنها ۵۰ میکرولیتر بافر PBS اضافه شد تا به عنوان کنترل منفی مورد استفاده قرار گیرد. سپس، پلیت‌های پوشش داده شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای آماده‌سازی پلیت پوشش داده شده با پپتید RhD، به منظور سنجش آنتی‌بادی‌های اختصاصی، ابتدا پپتید با غلظت اولیه ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به میزان ۴۰ بار رقیق شده تا به پپتید با غلظت ۲/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر دست یافته شود. سپس به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا به استثناء چاهک‌های انتهایی هر ردیف به میزان ۵۰ میکرولیتر اضافه شد و به چاهک‌های انتهایی هر ردیف هم به عنوان چاهک کنترل منفی، ۵۰ میکرولیتر PBS اضافه شد. سپس پلیت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. پس از اتمام مرحله پوشش‌دهی، به منظور بلوکه کردن مناطق خالی هر چاهک و جلوگیری از نتایج کاذب از سرم آلبومین گاوی ۲٪ (مدیتال، ایران) استفاده شد. بدین منظور، به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول بلوکه کننده افزوده شد.

شیوه اجرای ELISA:

به منظور اجرای آزمون الایزا، ۵۰ میکرولیتراز سوپ رویی هر چاهک کشت به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای الایزا افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. در هنگام اجرای آزمون الایزای کمی، علاوه بر سوپرناتانت کشت سلولی، ۵۰ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد تهیه شده نیز استفاده شد. لازم به ذکر است که سوپ رویی چاهک‌های پلیت کشت سلولی و استانداردهای تهیه شده به صورت دوتایی (duplicate) مورد آزمایش قرار گرفتند. پس از پایان انکوباسیون، محلول هر چاهک تخلیه شد و پلیت‌ها به طور متوالی سه بار با محلول شستشو دهنده (washing buffer) (آدالتیس، ایتالیا) شستشو داده شدند. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول کونژوگه آنتی‌هیومن گلوبولین-HRP (سیناژن، ایران) در رقت بهینه به چاهک‌ها افزوده شد و پلیت‌ها به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از اتمام انکوباسیون و تکرار شست و شو، ۵۰ میکرولیتر محلول سوبسترای TMB (زیمنس، آلمان) به چاهک ها اضافه شد و انکوباسیون به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی صورت پذیرفت. در نهایت ۲۵ میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (stop solution) (اینویتروژن، آمریکا) به چاهک‌ها اضافه گردید و قرائت جذب نوری (OD) چاهک‌ها با دستگاه الایزا ریدر TECAN در طول موج ۴۵۰ نانومتر انجام گرفت.

نرم‌افزارهای آماری و آزمون‌های آماری:

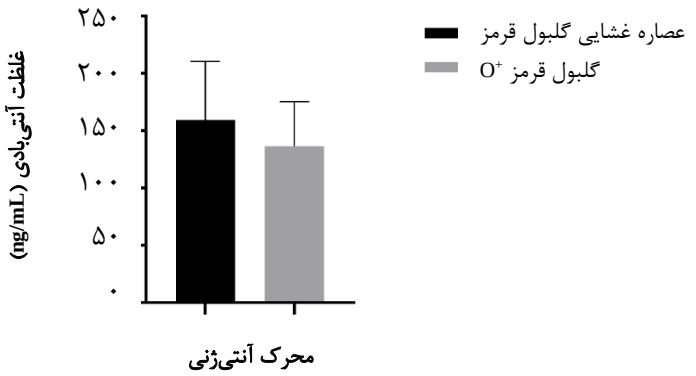
برای تعیین غلظت آنتی‌بادی‌های تولید شده از الایزا کمی استفاده شد. داده‌های حاصل با نرم‌افزار ۲۰۱۶ Microsoft Excel تجزیه و تحلیل گردید و میانگین ± انحراف معیار (Mean ± SD) مقادیر مربوط به هر گروه

تیماری براساس نتایج تکرار آزمایش محاسبه شد. بـــا توجه به محدود بـودن تعداد تکرارهای آزمایش، روش ویلکاکسون به عنوان روش آماری غیر پارامتریک استفاده شد.

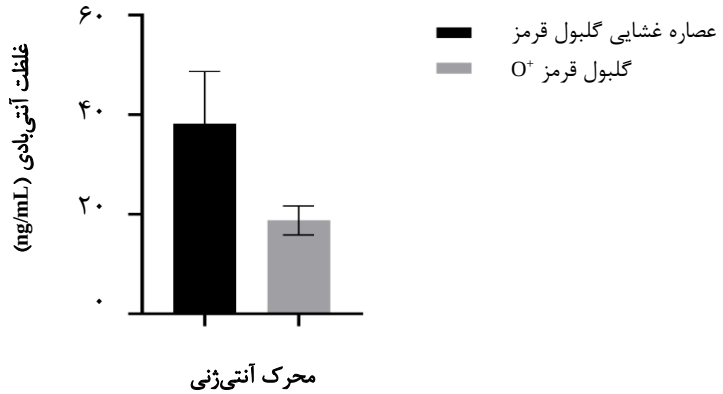
یافته‌ها

بررسی سطح پاسخ ایمنی تولید شده بر علیه آنتی‌ژن RhD در محیط کشت:

پس از ایمن‌سازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بـــا گلبول‌های قرمز واجد آنتی‌ژن RhD و عصاره غشایی آن‌ها، غلظت آنتی‌بادی تولید شـده در سـوپرناتانت کشـت سـلولی با روش الایزا به صـورت کمی تعیین گردید. غلظت آنتی‌بادی تولید شـده برای توتال آنتی‌بادی (پلیت پوشـش داده شده با AHG) و آنتی‌بادی اختصاصی علیه RhD (پلیت پوشش داده شـده بـا پپتید) بـه شـرح زیـر می‌باشد: برای سلول‌های تحریک شده با عصاره غشایـی، توتـال آنتی‌بـادی ۵۱/۱۹ ±۱۵۹/۳ نانوگرم در میلی‌لیتر و آنتی‌بادی اختصاصی ۱۰/۵۸ ± ۳۸/۱۷ نـانوگرم در میلی‌لیتر (n=۴) انـدازه‌گیری شد و برای تحریک با گلبول قرمز کـــامل، توتال آنتی‌بادی ۳۸/۹ ± ۱۳۶/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر و آنتی‌بادی اختصـاصی ۲/۹۵ ± ۱۸/۷۵ نانوگرم در میلی‌لیتر (n=۲) می‌باشد. مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار، حاصل از تکرار آزمایش برای هر گروه تیمارشـده محاسـبه شـد. نتایج نشـان داد که بین گروه‌های مختلف تیماری در سطح تولید آنتی‌بـــادی تفاوت وجود دارد هر چند تفاوت‌ها معنادار نمی‌باشند. روش ویلکاکسـون نشـان داد که تفاوت بین دو گروه از آنتی‌ژن‌ها در هر دو نوع ارزیـابی آنتی‌بـادی کـل و آنتی‌بـادی‌هـای اختصـاصـی RhD معنادار نمی‌باشـد. نمایش گرافیکی داده‌ها به صورت نمودار میله‌ای آمده است (نمودارهای ۱ و ۲).



نمودار ۱: مقایسه غلظت آنتی‌بادی تولیدی کل برحسب نانوگرم در میلی‌لیتر توسط سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMCs) پس از تحریک با گلبول قرمز O^+ (n=۲) و عصاره غشایی گلبول‌های قرمز واجد آنتی‌ژن D (n=۴). میزان آنتی‌بادی در سوپ کشت با روش ELISA بر روی پلیت پوشش داده شده با AHG اندازه‌گیری شده است. تفاوت آنتی‌بادی‌های تولیدی معنادار نمی‌باشد.



نمودار۲: مقایسه غلظت آنتی‌بادی اختصاصی ضد RhD برحسب نانوگرم بر میلی‌لیتر در سوپ کشت حاصل از تحریک ایمنی با گلبول قرمز O مثبت (n=۲) و عصاره غشایی گلبول‌های قرمز واجد آنتی‌ژن D (n=۴). روش ELISA با به کارگیری پلیت پوشش داده شده با پپتید RhD، نشان‌دهنده میزان بیشتری از تشکیل آنتی‌بادی اختصاصی در عصاره غشایی گلبول قرمز در مقایسه با گلبول قرمز می‌باشد. تفاوت آنتی‌بادی‌های تولیدی معنادار نمی‌باشد.

بحث

روش‌های متعددی برای تولید آنتی‌بادی وجود دارد، اما موفقیت تمامی آن‌ها وابسته به القای یک ایمنی‌زایی مؤثر و اختصاصی است (۱۸). بر این اساس، توسعه رویکردهای جایگزین مبتنی بر ایمنی‌زایی آزمایشگاهی (*in vitro* immunization) می‌تواند راهکاری کارآمد و کنترل‌پذیر برای تولید آنتی‌بادی‌های تشخیصی و درمانی علیه آنتی‌ژن‌های خونی به شمار آید (۱۹). در این راستا، انتخاب فرم مناسب آنتی‌ژن برای تحریک سلول‌های ایمنی نقش کلیدی ایفا می‌کند، زیرا ویژگی‌های ساختاری و اپی‌توپی آنتی‌ژن، تعیین کننده شدت و اختصاصیت پاسخ هومورال است (۱۲). در مطالعه حاضر، دو فرم آنتی‌ژنی شامل گلبول قرمز O مثبت و عصاره غشایی گلبول قرمز واجد آنتی‌ژن D برای ارزیابی کارآیی ایمنی‌زایی مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد که عصاره غشایی گلبول قرمز واجد آنتی‌ژن RhD، توانایی ایمنی‌زایی بالاتری نسبت به گلبول قرمز کامل دارد. این یافته‌ها با مشاهدات مطالعه‌های پیشین هم‌خوانی دارد، به طوری که در مطالعه هندریکسون و همکاران نیز ایمنی‌زایی نسبتاً پایین گلبول قرمز گزارش شده است (۲۰). با این حال باید توجه داشت که تفاوت در شدت پاسخ ایمنی گزارش شده میان مطالعه‌ها می‌تواند ناشی از تفاوت در طراحی آزمایش، شرایط کشت سلولی، نحوه ارائه آنتی‌ژن و روش‌های سنجش پاسخ ایمنی باشد. در گلبول قرمز، پروتئین RhD به صورت طبیعی در کمپلکس غشایی و در میان سایر پروتئین‌های ساختاری قرار دارد و بسیاری از اپی‌توپ‌های آن در دسترس مستقیم سلول‌های ایمنی نیستند (۲۰). با این وجود، گلبول قرمز مزیت مهمی هم‌چون ارائه آنتی‌ژن RhD در ساختار طبیعی غشایی خود را دارد و از این نظر نزدیک‌ترین حالت به شرایط فیزیولوژیک *in vivo* محسوب می‌شود، اما به علت وجود محدودیت‌هایی نظیر تراکم نسبتاً کم آنتی‌ژن، دسترس‌پذیری پائین برخی از اپی‌توپ‌ها و فقدان پردازش مؤثر آنتی‌ژن در شرایط کشت سلولی می‌تواند موجب کاهش توان ایمنی‌زایی آن در محیط *in vitro* شود (۲۱). در مقابل، فرآیند استخراج غشایی در تهیه عصاره، منجر به آزادسازی آنتی‌ژن و افزایش دسترس‌پذیری اپی‌توپ‌های سطحی می‌شود. عصاره غشایی واجد آنتی‌ژن D به دلیل حضور آنتی‌ژن‌های سطحی در حالت محلول، افزایش غلظت مؤثر آنتی‌ژن و تسهیل تعامل با سلول‌های ارائه دهنده آنتی‌ژن، قادر به القای پاسخ ایمنی قوی‌تری است (۲۲).

این مشاهدات با نتایج استیگس و همکاران هم‌خوانی دارد که نشان می‌دهند انتخاب فرم آنتی‌ژن و شیوه آماده‌سازی آن، نقش کلیدی در شدت و اختصاصیت پاسخ هومورال دارد. علاوه بر این، وجود سایر اجزای غشایی مانند گلیکوپروتئین‌ها و فسفولیپیدها در عصاره غشایی می‌تواند به عنوان ادجوانت‌های طبیعی عمل کرده و به تحریک قوی‌تر پاسخ ایمنی کمک کنند، هر چند امکان القای پاسخ‌های غیر اختصاصی ناشی از حضور این اجزا نیز باید مد نظر قرار گیرد (۲۳). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگر چه گلبول قرمز کامل از نظر فیزیولوژیک نزدیک‌ترین فرم به آنتی‌ژن طبیعی است، اما عصاره غشایی از نظر شدت تحریک ایمنی و کارآمدی در ایمنی‌زایی آزمایشگاهی عملکرد بهتری دارد. در ارزیابی پاسخ اختصاصی علیه آنتی‌ژن RhD، علی‌رغم آن که پلیت ELISA با یک پپتید که نماینده یک اپی‌توپ خاص از پروتئین RhD پوشش داده شده بود، هر دو فرم آنتی‌ژنی توانستند پاسخ آنتی‌بادی اختصاصی قابل شناسایی ایجاد کنند. این موضوع نشان می‌دهد که در شرایط ایمنی‌زایی آزمایشگاهی، اپی‌توپ‌های ایمنی‌زای کلیدی RhD به میزان کافی در دسترس سلول‌های ایمنی قرار گرفته و حتی در حضور طیف وسیع اپی‌توپ‌ها، پاسخ اختصاصی علیه اپی‌توپ پپتیدی هدف نیز القا می‌شود.

استفاده از ELISA پپتیدی در این مطالعه در مقایسه با روش های مبتنی بر آگلوتیناسیون یا فلوسیتومتری در سایر مطالعه‌ها، نیز می‌تواند در تبیین تفاوت نتایج گزارش شده نقش داشته باشد. علاوه بر این، تحقیقات در زمینه ارائه آنتی‌ژن و بهینه سازی ادجوانت‌ها نشان می‌دهد که فرم و نحوه تحویل آنتی‌ژن می‌تواند پاسخ هومورال را تقویت کند، که مرتبط با یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد (۲۴).

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه آزمایشگاهی، مواجهه سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با عصاره غشایی گلبول قرمز که واجد آنتی‌ژن D بود، در شرایط کشت سلولی، منجر به القای پاسخ هومورال قابل تشخیص با آزمون الایزا شد که از نظر شدت، نسبت به پاسخ ایجاد شده توسط گلبول‌های قرمز کامل O^+ تا حدودی قوی‌تر بود، هر چند تفاوت‌ها معنادار نبودند. با توجه به محدودیت تعداد تکرارهای آزمایش، انجام مطالعه‌های تکمیلی با حجم نمونه بیشتر به منظور تائید آماری این یافته‌ها ضروری است.

حمایت مالی

این پروژه با حمایت مالی مؤسسه عالی آموزشی و پژوهش طب انتقال خون انجام شده است.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه با کد اخلاق IR.TMI.REC.1403.004 انجام شد و مصوب کمیته اخلاق مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ایران می‌باشد.

عدم تعارض منافع

نویسندگان اظهار می‌دارند که هیچ گونه تعارض منافعی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

نقش نویسندگان

فائزه خیری: انجام کار پژوهش، نوشتن مقاله

دکتر فاطمه یاری: طراحی مطالعه، نظارت بر انجام مطالعه، همکاری در نگارش مقاله

بهناز عموحسین: همکاری در انجام کار پژوهش

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت آموزشی و پژوهشی مؤسسه، به جهت حمایت مالی و معنوی تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000; 95(2): 375-87. [DOI:10.1182/blood.V95.2.375] [PMID]
2- Huang CH, Liu PZ, Cheng JG. Molecular biology and genetics of the Rh blood group system. Semin Hematol 2000; 37(2): 150-65. [DOI:10.1016/S0037-1963(00)90040-4] [PMID]
3- Flegel WA. The genetics of the Rhesus blood group system. Blood Transfus 2007; 5(2): 50-7.
4- Wagner FF, Flegel WA. Review: the molecular basis of the Rh blood group phenotypes. Immunohematology 2004; 20(1): 23-36. [DOI:10.21307/immunohematology-2019-419] []
5- Xie X, Fu Q, Bao Z, Zhang Y, Zhou D. Clinical value of different anti-D immunoglobulin strategies for preventing Rh hemolytic disease of the fetus and newborn: A network meta-analysis. PLoS One 2020; 15(3): e0230073. [DOI:10.1371/journal.pone.0230073] [PMID] []
6- Nadarajan VS. Serological analysis of Rh antigens: how far can we go? Annals of Blood 2023; 8. [DOI:10.21037/aob-23-30]
7- Kim HY, Stojadinovic A, Izadjoo MJ. Immunization, hybridoma generation, and selection for monoclonal antibody production. Methods Mol Biol 2014; 1131: 33-45. [DOI:10.1007/978-1-62703-992-5_3] [PMID]
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. [DOI:10.1093/ilar.46.3.269] [PMID]
9- Tomimatsu K, Shirahata S. Antigen-specific in vitro immunization: a source for human monoclonal antibodies. Methods Mol Biol 2014; 1060: 297-307. [DOI:10.1007/978-1-62703-586-6_15] [PMID]
10- Kato M, Yan H, Tsuji NM, Chiba T, Hanyu Y. A method for inducing antigen-specific IgG production by in vitro immunization. J Immunol Methods 2012; 386(1-2): 60-9. [DOI:10.1016/j.jim.2012.08.019] [PMID]
11- Wijkhuisen A, Savatier A, Cordeiro N, Léonetti M. Production of antigen-specific human IgGs by in vitro immunization. BMC Biotechnol 2016; 16: 22. [DOI:10.1186/s12896-016-0253-1] [PMID] []
12- Kheiri Ardahaei F, Yari F. Effective Factors in Creating Immunization Against a Desired Antigen in the Culture Medium. J Iran Blood Transfus 2024; 21(4): 330-41. [Article in Farsi] [DOI:10.61186/bloodj.21.4.333]
13- Howe JG, Stack G. Relationship between immunogenicity and protein structure at amino acid substitution sites of blood group antigens. Blood 2025; 146(4): 504-17. [DOI:10.1182/blood.2024025071] [PMID]
14- Hendrickson JE, Tormey CA, Shaz BH. Red blood cell alloimmunization mitigation strategies. Transfus Med Rev 2014; 28(3): 137-44. [DOI:10.1016/j.tmrv.2014.04.008] [PMID]
15- de Almeida R, Nakamura CN, de Lima Fontes M, Deffune E, Felisbino SL, Kaneno R, et al. Enhanced immunization techniques to obtain highly specific monoclonal antibodies. MAbs 2018; 10(1): 46-54. [DOI:10.1080/19420862.2017.1331804] [PMID] []
16- Kanof ME, Smith PD, Zola H. Isolation of whole mononuclear cells from peripheral blood and cord blood. Curr Protoc Immunol 2001; Chapter 7: 7.1.1-7.1.8.
17- Dargahi T, Yari F, Rezaei N. The source of HLA molecules on platelets: Does platelets adsorb soluble HLA molecules from their environment? Iran J Ped Hematol Oncol 2019; 9(4): 236-43. [DOI:10.18502/ijpho.v9i4.1572]
18- KÖHler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256(5517): 495-7. [DOI:10.1038/256495a0] [PMID] []

19- Borrebaeck CA. Development of in vitro immunization in murine and human hybridoma technology. J Pharm Biomed Anal 1987; 5(8): 783-92. [DOI:10.1016/0731-7085(87)80096-1] [PMID]
20- Steeghs L, Kuipers B, Hamstra HJ, Kersten G, van Alphen L, van der Ley P. Immunogenicity of outer membrane proteins in a lipopolysaccharide-deficient mutant of Neisseria meningitidis: influence of adjuvants on the immune response. Infect Immun 1999; 67(10): 4988-93. [DOI:10.1128/IAI.67.10.4988-4993.1999] [PMID] []
21- Stack G, Tormey CA. Estimating the immunogenicity of blood group antigens: a modified calculation that corrects for transfusion xposures. Br J Haematol 2016; 175(1): 154-60. [DOI:10.1111/bjh.14175] [PMID]
22- Zimmermann M, Rose N, Lindner JM, Kim H, Gonçalves AR, Callegari I, et al. Antigen Extraction and B Cell Activation Enable Identification of Rare Membrane Antigen Specific Human B Cells. Front Immunol 2019; 10: 829. [DOI:10.3389/fimmu.2019.00829] [PMID] []
23- Hendrickson JE, Tormey CA. Understanding red blood cell alloimmunization triggers. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 2016; 2016(1): 446-51. [DOI:10.1182/asheducation-2016.1.446] [PMID] []
24- Burnet Institute. Methods of Delivery to Antigen-Presenting Cells: Development of New and Improved Vaccines. Molecular Pharmaceutics 2007; 4(1): 1-3. [DOI:10.1021/mp060102h] [PMID]