خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۸ شماره ۲ تابستان ۱۴۰۰ (۱۰۴-۹۷)

مقاله پژوهشی

تکثیر سلول‌های لنفوسیتی آلوایمن در حضور کشت مخلوط لنفوسیتی و سیکلوسپورین

سعیده میلانی[۱]، فاطمه یاری[۲]

چکیده

سابقه و هدف

کشت لنفوسیتی مخلوط (MLC) جهت مطالعه میانکنش بین جمعیت‌های لنفوسیتی و ترکیبات ناشی از این میانکنش‌ها به کار می‌رود. تکثیر لنفوسیت‌ها در محیط MLC، به علت ترشح سیتوکاین‌ها در این محیط افزایش می‌یابد. سیکلوسپورین A به عنوان مهارکننده سیستم ایمنی به کار می‌رود. تزریق مکرر خون، باعث آلوایمیونیزاسیون لنفوسیت‌های B می‌گردد. یکی از روش‌های تولید آنتی‌بادی، نامیراسازی لنفوسیت‌های B می‌باشد. سیتوکاین‌ها با افزایش تکثیر لنفوسیت B به نامیراسازی کمک می‌کنند. با توجه به نقش MLC در تولید سیتوکاین، هدف این مطالعه، تولید MLC و بررسی آن در تکثیر سلول‌های آلوایمن در حضور و عدم حضور سیکلوسپورین بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، لنفوسیت‌های خون محیطی دو فرد که یکی حاوی آنتی‌ژن RhD و دیگری فاقد آن بود با روش فایکول جداسازی و جهت تولید MLC در معرض هم قرار گرفتند. اثرMLC تولیدی و سیکلوسپورین بر تکثیر لنفوسیت‌های آلوایمن با میکروسکوپ و رنگ‌آمیزی تریپان‌بلو بررسی شد و نتایج با نرم‌افزار prism و مقایسه میانگین‌ها با آزمون t-test جفت شده بررسی گردید($p< ۰/۰۵$).

یافته‌ها

MLC و سیکلوسپورین باعث افزایش تکثیر لنفوسیت‌ها با میانگین و انحراف معیار ۱۹۷۹۸۹/۸ ± ۴۴۰۰۰۰ در مقایسه با کنترل ۸۴۸۵۲/۸ ± ۱۶۰۰۰۰ گردیدند.

نتیجه گیری

MLC و سیکلوسپورین به تکثیر سلول‌های لنفوسیتی کمک می‌کنند. با تأیید آزمایش‌های تکمیلی، MLC و سیکلوسپورین می‌توانند در تکثیر لنفوسیت‌های B به عنوان یکی از گروه‌های سلولی لنفوسیتی، جهت تولید آنتی‌بادی مؤثر واقع گردند.

کلمات کلیدی: سیکلوسپورینA ، کشت مخلوط لنفوسیتی، انتقال خون

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۲/۲۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/ ۰۳/۰۹

۱- مؤلف مسئول: PhD بیوتکنولوژی پزشکی ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ صندوق پستی: ۱۱۵۷-۱۴۶۶۵
۲- PhD ایمونولوژی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

مقدمه

کشت لنفوسیت مخلوط(MLC ؛ Mixed Lymphocyte Cultures) روشی است که جهت مطالعه میانکنش‌های سلول ـ سلول بین زیر گروه‌های لنفوسیتی و تولید ترکیبات ناشی از این میانکنش‌ها به کار می‌رود. جهت انجام آزمایش MLC ، دو روش مورد استفاده قرار می‌گیرد. روش اول، روش یک طرفه یا ONE WAY و روش دوم دو طرفه یا TWO WAY نام دارد که در نوع اول تنها یکی از دو گروه لنفوسیتی قادر به تکثیر هستند و در حالت دوم هر دو گروه لنفوسیت تکثیر می‌یابند(۱). MLC دو طرفه اولین بار توسط بین و همکارانش معرفی شد و چندی بعد برای اندازه‌گیری سازگاری بافتی بین دو فرد مختلف مورد استفاده قرار گرفت(۲). استفاده از واکنش‌های MLC امکان انجام مطالعه‌های دقیق‌تر در مورد پاسخ‌های ایمنی در برابر سلول‌های آلوژنیک را امکان‌پذیر می‌سازد(۳).

سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی حاوی سلول‌های ایمنی از جمله لنفوسیت‌های B و T می‌باشند. یکی از راه‌های تهیه لنفوسیت‌های B ، استفاده از خون محیطی است. تولید آنتی‌بادی در لنفوسیت‌های B نیازمند تکثیر طولانی مدت این سلول‌ها می‌باشد. مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که تکثیر لنفوسیت‌های B در محیط MLC به علت فعال‌شدن لنفوسیت‌های T کمکی در این محیط و اثر آن‌ها بر لنفوسیت‌های B ، افزایش می‌یابد(۵، ۴). سیتوکاین‌های مختلفی هم‌چون اینترلوکین ۲، ۴، ۶، ۱۰ و اینترفرون گاما بر اثر فعال شدن لنفوسیت‌های T ناشی از تحریک سلول‌های کوچک تک هسته‌ای ایجاد می‌شوند که می‌توانند در تکثیر لنفوسیت‌های B اثرگذار باشند(۶).

سیکلوسپورین A متابولیت قارچی است که بر روی سیستم ایمنی موثر بوده و می‌تواند به عنوان عامل مهار کننده سیستم ایمنی به کار رود. این ترکیب با جلوگیری از رونویسی برخی از ژن‌های سیتوکاینی، می‌تواند فعالیت سلول T لنفوسیتی را مهار کند(۷). سیکلوسپورین می‌تواند به طور مستقیم سلول‌های B انسانی را با مکانیسمی مشابه عملکرد آن در لنفوسیت‌های T مهار کرده و از ورود سلول به چرخه سلولی جلوگیری کند(۸). از طرف دیگر سیکلوسپورین قادر به مهار آپوپتوز ناشی از فعال شدن لنفوسیت‌ها می‌باشد(۹).

زمانی که سلول‌های لنفوسیتی در معرض آنتی‌ژن بیگانه قرار می‌گیرند، تکثیر لنفوسیت‌های B و متعاقب آن تولید آنتی‌بادی ضد عامل تحریک‌کننده آغاز می‌گردد. در این فرآیند لنفوسیت‌های T کمکی، به لنفوسیت‌های B کمک می‌کنند(۱۰). لنفوسیت‌های ایمن شده قادر به تولید آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن مربوطه می‌باشند(۱۱). آلوایمونیزاسیون ناشی از انتقال خون به علت دریافت مکرر خون حاوی آنتی‌ژن‌های گلبول قرمز بیگانه که در سطح گلبول‌های قرمز فرد گیرنده وجود ندارند، ایجاد می‌گردد (۱۳، ۱۲). این فرآیند باعث تحریک لنفوسیت‌های B فرد گیرنده می‌شود(۱۴). این لنفوسیت‌ها بعدها می‌توانند به عنوان منبعی جهت تولید آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن تحریکی مورد استفاده قرار بگیرند. از آن‌جایی که طول عمر این لنفوسیت‌ها کم است، در مرحله بعد بایستی این سلول‌ها نامیرا گردند تا امکان تولید مداوم آنتی‌بادی در آن‌ها فراهم باشد. در کنار عوامل نامیرا کننده، حضور ترکیباتی که بتوانند به افزایش تکثیر سلول‌های لنفوسیتی کمک کنند بسیار ضروری است(۱۷-۱۵). مطالعه‌ها نشان داده‌اند که سیتوکاین‌ها می‌توانند سبب افزایش فعالیت تکثیری و افزایش میزان آنتی‌بادی تولیدی توسط لنفوسیت‌های B نامیرا گردند. این سیتوکاین‌ها می‌توانند طی واکنش MLC ایجاد شوند(۱۸). بر این اساس، هدف اول این مطالعه، تولید MLC به عنوان منبع سیتوکاین، طی واکنش دو مرحله ای با در معرض قرار دادن گلبول‌های قرمز خون فرد حاوی آنتی‌ژن RhD با لنفوسیت‌های خون محیطی فاقد این آنتی‌ژن بود. از طرف دیگر استفاده از ترکیباتی که منجر به تکثیر جمعیت سلول‌های خون محیطی می‌شود، می‌تواند در رشد و تکثیر لنفوسیت‌های B به عنوان یکی از گروه‌های سلولی حاضر در این جمعیت نیز مؤثر باشد. در نتیجه، هدف بعدی این مطالعه، بررسی اثرات کلی MLC تولیدی بر تکثیر جمعیت سلول‌های لنفوسیتی نمونه خون دارای پاسخ آلوایمنی با بررسی میکروسکوپی و روش رنگ‌آمیزی سلولی با تریپان‌بلو بود. اثر داروی سرکوب‌کننده سیستم ایمنی سیکلوسپورین نیز بر تکثیر لنفوسیت‌ها در حضور و یا عدم حضور MLC مورد مطالعه

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه لنفوسیت‌های خون محیطی:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود؛ دو عدد کیسه خون کامل که یکی از آن‌ها حاوی آنتی‌ژن RhD (RhD مثبت) و دیگری فاقد آن (RhD منفی) بود از اهداکنندگانی که به پایگاه انتقال خون وصال تهران مراجعه کرده بودند و فرم رضایت‌نامه کتبی جهت انجام مطالعه بر روی نمونه‌های اهدایی را پر کرده بودند، دریافت گردید. لنفوسیت‌های خون محیطی نمونه‌ها به کمک فایکول(ایران، بهار افشان) و با استفاده از سانتریفیوژ شیب گرادیان جداسازی گردید. به طور خلاصه ۳ میلی‌لیتر نمونه خون RhD مثبت و ۳ میلی‌لیتر نمونه خون RhD منفی در لوله‌های هپارینه مجزا جمع‌آوری شدند. هر لوله خون به نسبت ۱: ۲ با نمک بافر فسفات استریل(PBS) رقیق و در لوله کاملاً مخلوط گردید و نمونه‌ها در g ×۴۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. لنفوسیت‌های هر دو نمونه دو بار با PBS در g ۱۰۰x به مدت ۱۰ دقیقه شستشو داده شدند. بعد از شستن سلول‌ها، سلول‌ها در حجم مناسب PBS مجدداً معلق وتعداد سلول‌ها در هر دو نمونه با لام نئوبار شمارش گردیدند.

تهیه MLC:

پس از شمارش سلولی، تعداد مساوی لنفوسیت به میزان $۰/۴ \times ۱۰^{۶}$ از هر دو گروه به داخل حفره‌های چاهک ۲۴ تایی منتقل گردید و پس از رساندن حجم پلیت‌ها به ۱ میلی‌لیتر به وسیله محیط RPMI (بیوراد، ایران) حاوی ۱۰٪ آلبومین سرم گاوی، پلیت‌ها به انکوباتور دارای ۵٪ CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل گردیدند.

پس از یک هفته، سوپرناتانت رویی سلول‌ها با سمپلر کشیده شده و پس از انتقال به فالکن‌های ۱۵ میلی‌لیتر، نمونه‌ها در دور 1900 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سوپ رویی مجدداً برداشته شد و پس از فیلتر کردن در داخل میکروتیوب منتقل و تا زمان استفاده در داخل فریزر قرار داده شد.

بررسی اثر MLC بر تکثیر سلولی:

دو عدد کیسه خون کامل از دو بیمار تالاسمی مراجعه‌کننده به مرکز درمان تالاسمی که در پرونده آن‌ها فرم مربوط به رضایت‌نامه آگاهانه جهت انجام پژوهش بر روی نمونه‌های خون موجود در این مرکز وجود داشت، دریافت گردید. سوابق بیمار نشان می‌داد که در سرم وی آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن RhE مشاهده شده و پاسخ آلوایمنی در بدن وی ایجاد گردیده است. لنفوسیت‌های موجود در خون بیمار با روش فایکول مطابق با مراحل موجود در مرحله ۱ روش کار جداسازی گردید. پس از شمارش سلولی با رنگ‌آمیزی تریپان بلو، تعداد 40000 سلول در حجم ۵۰ میکرولیتر در داخل هر یک از حفره‌های پلیت ۹۶ حفره اضافه گردید.

تمامی مراحل کار به صورت تکرار سه تایی انجام شد. به سه چاهک اول هر ردیف، MLC و سیکلوسپورین (کانادا، کایمن) به طور هم‌زمان، به ۳ چاهک بعدی فقط MLC ، به سه چاهک فقط سیکلوسپورین و به ۳ چاهک آخر به عنوان کنترل چیزی اضافه نشد. حجم MLC مورد استفاده ۵۰ میکرولیتر و سیکلوسپورین ng/mL ۱۰۰ بود(۱۹، ۱). در نهایت حجم همه چاهک‌ها با محیط RPMI ۱۰٪ به ۲۰۰ میکرولیتر رسید و سلول‌ها به انکوباتور منتقل شدند(جدول ۱).

جدول ۱: تعداد سلول‌های لنفوسیتی و ترکیب چاهک‌ها جهت تیمار با MLC و سیکلوسپورین

گروه	چاهک	تعداد سلول‌های لنفوسیتی آلوایمن	MLC	Cyclosporine A
۱	۱-۳	۴×۱۰^{۴}	+	+
۲	۴-۶	۴×۱۰^{۴}	−	+
۳	۷-۹	۴×۱۰^{۴}	+	−
۴	۱۰-۱۲	۴×۱۰^{۴}	−	−

بررسی میکروسکوپی چاهک‌ها به مدت یک هفته با میکروسکوپ معکوس انجام گردید(شکل ۱). هم‌چنین زمانی که تراکم سلول‌ها در چاهک‌ها به بالاتر از ۷۰٪

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

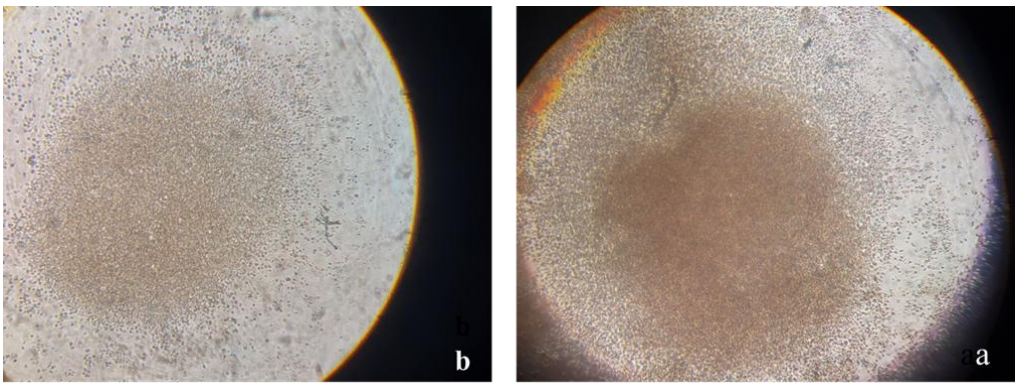
رسید، سلول‌ها جهت بررسی میزان تکثیر با رنگ‌آمیزی سلولی تریپان‌بلو و با استفاده از لام نئوبار شمارش شدند.

آنالیز آماری:

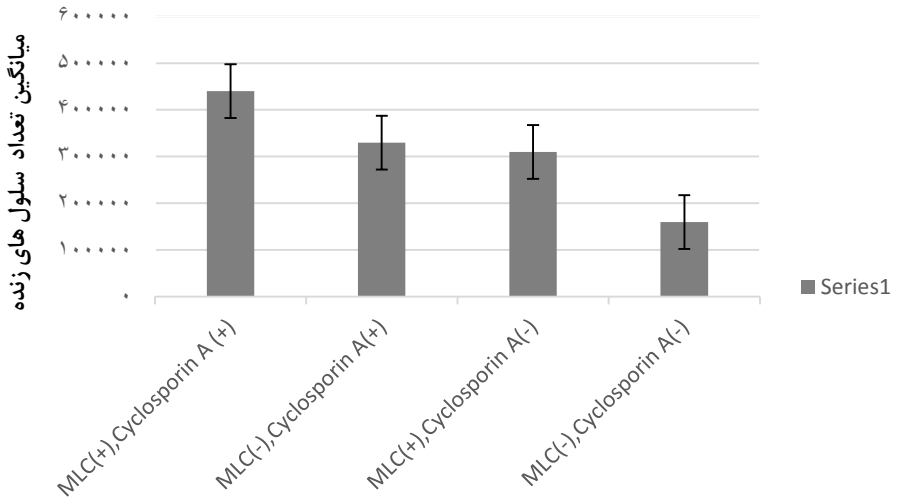
برای تحلیل داده‌های حاصل از تکثیر سلول‌های لنفوسیتی، میانگین و انحراف معیار بین گروه‌های دریافت‌کننده MLC و یا سیکلوسیورین و گروه کنترل با برنامه اکسل محاسبه شد. مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism8 و انجام تست t جفت شده انجام گردید. سطح معناداری ۰/۰۵ >p در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

با شمارش سلولی، میانگین تعداد سلول‌های زنده در گروه ۱ (دریافت‌کننده MLC و سیکلوسپورین) به ۴۴۰۰۰۰ سلول، در گروه ۲ (دریافت‌کننده سیکلوسپورین) ۳۰۰۰۰۰، گروه ۳ دریافت‌کننده(MLC) ۳۱۰۰۰۰ و در گروه آخر (بدون MLC و سیکلوسپورین) ۱۶۰۰۰۰ سلول بود(جدول ۲ و نمودار ۱). هر چند اختلاف میانگین‌ها بین گروه‌های دریافت‌کننده MLC و یا سیکلوسپورین و کنترل به لحاظ آماری معنادار نبود. تصاویر گروه ۲ و ۳ به علت مشابهت کلی توده سلولی با گروه ۱، ارائه نشده‌اند.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپی سلول‌های تیمار شده با MLC و سیکلوسپورین. شکل a توده سلول‌های دریافت‌کننده MLC و سیکلوسپورین (گروه ۱) و شکل b سلول‌های گروه کنترل(گروه ۴) که هیچ یک از این دو تیمار را دریافت نکرده‌اند را نشان می‌دهد.



نمودار ۱: نمودار میانگین تعداد سلول‌های زنده در گروه‌های مختلف دریافت‌کننده MLC و سیکلوسپورین، نشان‌دهنده تأثیر توأم MLC و سیکلوسپورین A در تکثیر بیشتر لنفوسیت‌های به دست آمده از خون محیطی می‌باشد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

جدول ۲: میانگین و انحراف معیار حاصل از رشد سلول‌های لنفوسیتی پس از تیمار با MLC و سیکلوسپورین

گروه	MLC	Cyclosporine A	میانگین رشد سلول	انحراف معیار
۱	+	+	۴۴۰۰۰۰	± ۱۹۷۹۸۹/۸
۲	–	+	۳۰۰۰۰۰	± ۱۱۳۱۳۷/۰
۳	+	–	۳۱۰۰۰۰	± ۱۵۵۵۶۳/۴
۴	–	–	۱۶۰۰۰۰	± ۸۴۸۵۲/۸

بحث

عمده‌ترین یافته این مطالعه، افزایش تکثیر و زنده‌ماندن سلول‌های لنفوسیتی افراد آلوایمن بعد از در معرض قرار گرفتن با MLC بود. این یافته با مطالعه‌های قبلی انجام شده که در آن تعداد سلول‌های زنده لنفوسیتی بعد از در معرض قرار گرفتن با MLC افزایش پیدا کرده بود مطابقت دارد (۲۰، ۱۹). از طرف دیگر با وجودی که از سیکلوسپورین به عنوان ترکیب مؤثر در مهار سیستم ایمنی یاد می‌شود، در مطالعه ما حضور سیکلوسپورین باعث افزایش تکثیر و زنده‌ماندن لنفوسیت‌های خون محیطی در مقایسه با گروه کنترل گردید. شاید یکی از دلایل آن، تداخل سیکلوسپورین با لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک باشد که طی فرآیند آلوایمیونیزاسیون و تحریک لنفوسیت‌ها ضد آنتی‌ژن بیگانه ایجاد می‌گردد(۲۱). در مقابل، این امر باعث فعال شدن و تکثیر لنفوسیت‌های T کمکی $CD4^+$ می‌گردد که در نهایت به تکثیر لنفوسیت‌های B و تمایز آن‌ها به پلاسما سل‌ها می‌انجامد(۲۲). دلیل دیگر می‌تواند اثر مهارکنندگی سیکلوسپورین بر روی فرآیند آپوپتوز باشد که منجر به افزایش تعداد لنفوسیت‌ها می‌شود(۲۳). اثر بازدارنگی سیکلوسپورین بر روی آپوپتوز در حضور MLC در برخی مطالعه‌ها اثبات شده است. لنفوسیت‌های $CD8^+$ سیتوتوکسیک باعث مهار تکثیر لنفوسیت‌های B آلوایمن و سوق دادن آن‌ها به سمت آپوپتوز در محیط *In vitro* می‌گردند در نتیجه مهار آن‌ها می‌تواند به افزایش ماندگاری و تکثیر لنفوسیت‌های B کمک کند(۲۴). یکی از راه‌های تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، افزایش تکثیر و القای نامیرایی در لنفوسیت‌های محیطی تحریک شده با آنتی‌ژن بیگانه، در محیط *In vitro* می‌باشد. در سال ۲۰۰۳، پاشا و همکاران از لنفوسیت‌های خون محیطی خانمی که در دوران بارداری علیه آنتی‌ژن‌های Rh D و Rh C ایمیونیزه شده بود، استفاده کرده و با استفاده از روش EBV Transformation ، موفق به تولید آنتی‌بادی علیه این آنتی‌ژن‌ها شدند(۲۵). مشابه این کار در سال ۲۰۰۹ با استفاده از لنفوسیت‌های افراد دارای Anti-D انجام شد که منجر به تولید آنتی‌بادی Anti-D گردید(۲۶). بر طبق مطالعه‌های انجام شده، لنفوسیت‌های B آلوایمن شده به عنوان سلول‌های تولیدکننده آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن تحریکی، نیاز به نامیرا شدن با عوامل نامیرا کننده جهت تولید مداوم آنتی‌بادی دارند. لذا استفاده از ترکیبات ادجوانتی هم‌چون انواع سیتوکاین‌ها با هدف کمک به تکثیر لنفوسیت‌های B و افزایش کارآیی ترانسفورماسیون همواره توصیه می‌گردد(۲۸، ۲۷). در این مطالعه اثر MLC به عنوان ترکیب حاوی سیتوکاین‌ها و ادجوانت‌های مختلف بر میزان تکثیر سلول‌های لنفوسیتی خون محیطی نمونه‌های آلو ایمن شده به لحاظ بررسی میکروسکوپی و محاسبه زنده‌مانی سلول‌ها پس از تیمار با رنگ‌آمیزی حیاتی و استفاده از رنگ تریپان‌بلو بررسی گردید.

نتیجه مطالعه نشان داد که MLC و سیکلوسپورین در افزایش تکثیر و ماندگاری لنفوسیت‌های خون محیطی مؤثر هستند. در این مطالعه افزایش تکثیر سلولی در سلول‌هایی که تحت تیمار MLC و سیکلوسپورین به طور هم‌زمان بودند، از گروهی که فقط تیمار MLC یا فقط سیکلوسپورین دریافت کرده بودند بالاتر بود. به نظر می‌رسد استفاده از سیکلوسپورین به علت مهار اثر لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک بتواند به تکثیر لنفوسیت‌های B آلوآنتی‌ژن و لنفوسیت‌های T CD4+ کمک کند. این اثر بخشی بایستی با آزمایش‌های ایمونولوژی و سرولوژی اختصاصی، مورد بررسی‌های بیشتر قرار بگیرد.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

نتیجه‌گیری

MLC و سیکلوسپورین به تکثیر سلول‌های لنفوسیتی کمک می‌نماید. با توجه به قابلیت استفاده از لنفوسیت‌های B آلو ایمن به عنوان منبعی جهت تولید آنتی‌بادی، بررسی اثر MLC بر میزان تولید آنتی‌بادی در این سلول‌ها در مقایسه با نمونه کنترل، با آزمایش سرولوژیکی الایزا به عنوان مرحله تکمیلی توصیه می‌گردد. به علت شرایط تولید آسان MLC و سهولت دسترسی به آن، در صورت تأیید این ترکیب با آزمایش‌های تکمیلی بر روی نمونه‌های بیشتر و دفعات بالاتر و هم‌چنین تعیین این که چقدر از جمعیت سلولی تکثیر شده لنفوسیت‌های B بوده‌اند، پتانسیل MLC و همین طور سیکلوسپورین به عنوان ترکیبات کمک‌کننده در تکثیر و هم‌چنین ایجاد شرایط مستعد جهت نامیرایی بعدی لنفوسیت‌های B وتولید آنتی‌بادی در آن‌ها بیشتر آشکار خواهد شد. این مطالعه حاصل بخشی از نتایج مربوط به طرح تحقیقاتی مصوب مؤسسه آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون، با کد اخلاق IR.TMI.REC.1399.016 می‌باشد.

References:

1- Pissas G, Eleftheriadis T. Assessment of Humoral Alloimmunity in Mixed Lymphocyte Reaction. Bio Protoc 2019; 9(2): e3139.
2- Bodmer W. Ruggero Ceppellini: A Perspective on His Contributions to Genetics and Immunology. Front Immunol 2019; 10: 1280.
3- Eleftheriadis T, Pissas G, Sounidaki M, Antoniadi G, Antoniadis N, Liakopoulos V, *et al*. Uric acid increases cellular and humoral alloimmunity in primary human peripheral blood mononuclear cells. Nephrology (Carlton). 2018; 23(7): 610-5.
4- Murphy WJ. Raising the spectra of T-cell profiling. Blood 2008; 112(8): 3008-9.
5- Revenfeld ALS, Bæk R, Jørgensen MM, Varming K, Stensballe A. Induction of a Regulatory Phenotype in CD3+ CD4+ HLA-DR+ T Cells after Allogeneic Mixed Lymphocyte Culture; Indications of Both Contact-Dependent and -Independent Activation. Int J Mol Sci 2017; 18(7): 1603.
6- Fischbacher D, Merle M, Liepert A, Grabrucker C, Kroell T, Kremser A, *et al*. 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.
7- Pino-Lagos K, Michea P, Sauma D, Alba A, Morales J, Bono MR, *et al*. Cyclosporin A-treated dendritic cells may affect the outcome of organ transplantation by decreasing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. Biol Res 2010; 43(3): 333-7.
8- Hilchey SP, Palshikar MG, Emo JA, Li D, Garigen J, Wang J, *et al*. Cyclosporine a directly affects human and mouse b cell migration *in vitro* by disrupting a hIF-1 αdependent, o2 sensing, molecular switch. BMC Immunol 2020; 21(1): 13.
9- Donjerković D, Scott DW. Activation-induced cell death in B lymphocytes. Cell Res 2000; 10(3): 179-92.
10- Schleker T, Jacobsen EM, Mayer B, Strauss G, Debatin KM, Posovszky C. Preserved *in vitro* immunoreactivity in children receiving long-term immunosuppressive therapy due to inflammatory bowel disease or autoimmune hepatitis. Mol Cell Pediatr 2018; 5(1): 1.
11- 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.
12- Hamilton JR, Westhoff CM, Kell K. Kidd Blood Group Systems in Transfusion Medicine and Hemostasis. Philadelphia: Elsevier; 2019. p. 157-61.
13- Chonat S, Arthur CM, Zerra PE, Maier CL, Jajosky RP, Yee MEM, *et al*. Challenges in preventing and treating hemolytic complications associated with red blood cell transfusion. Transfus Clin Biol 2019; 26(2): 130-4.
14- Pandey H, Das SS, Chaudhary R. Red cell alloimmunization in transfused patients: A silent epidemic revisited. Asian J Transfus Sci 2014; 8(2): 75-7.
15- Amoli MM, Carthy D, Platt H, Ollier WE. EBV Immortalization of human B lymphocytes separated from small volumes of cryo-preserved whole blood. Int J Epidemiol 2008; 37 Suppl 1: i41-5.
16- Weng NP. Telomere and adaptive immunity. Mech Ageing Dev 2008; 129(1-2): 60-6.
17- Lemskaya NA. A modified protocol for highly efficient EBV-mediated immortalization of human B lymphocytes from small volumes of peripheral blood serum. Egyptian Journal of Medical Human Genetics 2018; 19(3): 221-3.
18- Ali AI, Badran YR, Hassuneh MR, Sanber KS, Ismail SI. Effect of Interleukins on Antibody Production by Epstein-Barr Virus Transformed B Cells. Monoclon Antib Immunodiagn Immunother 2015; 34(3): 162-8.
19- Sato T, Deiwick A, Raddatz G, Koyama K, Schlitt HJ. Interactions of allogeneic human mononuclear cells in the two-way mixed leucocyte culture (MLC): influence of cell numbers, subpopulations and cyclosporin. Clin Exp Immuno 1999; 115(2): 301-8.
20- Fan Y, Naglich JG, Koenitzer JD, Ribeiro H, Lippy J, Blum J, *et al*. Miniaturized High-Throughput Multiparameter Flow Cytometry Assays Measuring *In*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

Vitro Human Dendritic Cell Maturation and T-Cell Activation in Mixed Lymphocyte Reactions. SLAS Discov 2018; 23(7): 742-50.
21- Flores C, Fouquet G, Moura IC, Maciel TT, Hermine O. Lessons to Learn From Low-Dose Cyclosporin-A: A New Approach for Unexpected Clinical Applications. Front Immunol 2019; 10: 588.
22- Tay C, Kanellakis P, Hosseini H, Cao A, Toh BH, Bobik A, Kyaw T. B Cell and CD4 T Cell Interactions Promote Development of Atherosclerosis. Front Immunol 2020; 10: 3046.
23- Fei F, Yu Y, Schmitt A, Rojewski MT, Chen B, Gotz M, *et al*. The inhibitory effect of cyclosporine a and prednisolone on both cytotoxic cd8+ T cells and cd4+ cd25+ regulatory T cells. Current Signal Transduction Therapy 2009; 4(3): 222-33.
24- Zimmerer JM, Pham TA, Wright CL, Tobin KJ, Sanghavi PB, Elzein SM, *et al*. Alloprimed CD8(+) T cells regulate alloantibody and eliminate alloprimed B cells through perforin- and FasL-dependent mechanisms. Am J Transplant 2014; 14(2): 295-304.
25- Pasha RP, Roohi A, Shokri F. Establishment of human heterohybridoma and lymphoblastoid cell lines specific for the Rh D and C antigens. Transfus Med 2003; 13(2): 83-92.
26- Golestani R, Pourfathollah AA, Moazzeni SM. An extreme strategy for the production of hybridoma. Hybridoma (Larchmt) 2009; 28(2): 139-44.
27- Funaro A, Gribaudo G, Luganini A, Ortolan E, Lo Buono N, Vicenzi E, *et al*. Generation of potent neutralizing human monoclonal antibodies against cytomegalovirus infection from immune B cells. BMC Biotechnol 2008; 8: 85.
28- Moens L, Tangye SG. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. Front Immunol 2014; 5: 65.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2021;18(2): 97-104

Original Article

Alloimmune lymphocytes proliferation in presence of Mixed Lymphocyte Culture and cyclosporine

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

Mixed Lymphocytes Culture (MLC), is a method studies the cell-cell interaction between subpopulations of lymphocytes and the production of compounds caused by this interaction. MLC as a source of cytokines can increase B lymphocytes proliferation. Repeated blood transfusions cause B lymphocytes alloimmunization. Cyclosporin A has inhibitory effect on immune system. In alloimmunization, stimulated B lymphocytes can produce antibodies against exposed foreign red blood cell antigens. Immortalization of B lymphocytes can lead to continuous production of monoclonal antibodies. Considering MLC as an important source of cytokines and the presence of B lymphocytes as a group of cells in peripheral blood cells, the aim of this study was to produce MLC and evaluate its effect on proliferation of alloimmune peripheral blood cells in the presence or absence of cyclosporine A using microscopic evaluation and dye exclusion staining method.

Materials and Methods

In an experimental study, RhD antigen positive and negative lymphocytes were exposed together for MLC production. Peripheral blood lymphocytes resulted from two alloimmunized patients was treated with MLC and cyclosporine, and their proliferation was analyzed compared to the control group using microscopy and trypan blue staining method. The results were analyzed by t-test using prism software ($p< 0.05$).

Results

MLC and cyclosporine increased proliferation of lymphocytes with mean value being 440000 (SD: 197989.8) vs 160000 (SD: 84852.8) of control group.

Conclusions

MLC and cyclosporine increase lymphocyte cells proliferation. By confirmation of additional experiments, MLC and cyclosporine may be used as effective agents in lymphocyte proliferation and antibody production of alloimmune B lymphocytes.

Key words: Cyclosporin A, Lymphocyte Culture test، Mixed, Blood Transfusion

Received: 10 May 2021
Accepted: 30 May 2021

Correspondence: Milani S., PhD of Medical Biotechnology. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-1157, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88993778; Fax: (+9821) 88993778
E-mail: *s.milani@tmi.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-08]