

تولید رده سلولی لنفوبلاستوئید تولید کننده آنتی بادی از لنفوسیت‌های B بیماران تالاسمی ایمن شده علیه آنتی ژن KELL با ویروس اپشتاین بار

پریا احمدی صید محمدی^۱، زهره شریفی^۲، آرزو اودی^۳، سعیده میلانی^۴

چکیده

سابقه و هدف

آلویمیونیزاسیون به علت مواجهه لنفوسیت‌های B با آنتی ژن بیگانه به دنبال تزریق خون ناسازگار ایجاد می‌شود. یکی از راه‌های شناسایی آنتی ژن‌های گروه‌های خونی، استفاده از آنتی بادی‌های مونوکلونال می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر، ترانسفورماسیون سلول‌های آلویمن شده ضد آنتی ژن Kell در افراد تالاسمی به کمک ویروس اپشتاین بار و تولید سلول‌های لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی بادی ضد Kell می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) از ۱۰ بیمار تالاسمی ایمن شده علیه آنتی ژن KELL به روش گرادیان غلظتی فایکول جدا و با سوپ ویروسی اپشتاین بار به دست آمده از محیط کشت خط سلولی B95-8 به مدت ۴ ساعت مواجه شد. پس از گذشت یک تا سه هفته، تولید کلون‌های لنفوبلاستوئیدی تولیدکننده آنتی بادی و اختصاصیت آنتی بادی تولیدی به ترتیب با مشاهده میکروسکوپی، الایزا و روش میکروهماگلو تیناسیون بررسی شد.

یافته‌ها

نتایج به دست آمده نشان داد که مواجهه سلول‌های PBMC بیماران تالاسمی ایمن شده علیه آنتی ژن KELL با سوپ ویروسی EBV سبب ایجاد کلون‌های لنفوبلاستوئیدی می‌گردد. بررسی سوپ سلولی کلون‌های تولیدی نشان داد که آنتی بادی تولیدی توسط این سلول‌ها قادر به شناسایی گلبول‌های قرمز حاوی آنتی ژن KELL و آگلو تیناسیون آن‌ها با آزمایش میکروهماگلو تیناسیون می‌باشد.

نتیجه گیری

بر اساس یافته‌های به دست آمده ترانسفورماسیون PBMC بیماران تالاسمی ایمن شده علیه آنتی ژن KELL باعث ایجاد سلول‌های لنفوبلاستوئیدی تولیدکننده آنتی بادی ضد این آنتی ژن می‌گردد.

کلمات کلیدی: آلویمیونیزاسیون، ویروس اپشتاین بار، لنفوسیت‌های B

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۲۰

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون - آزمایشگاه مونوکلونال - مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۲- PhD ویروس شناسی - استاد مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۳- PhD خون‌شناسی و بانک خون - دانشیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران

۴- مؤلف مسئول: PhD زیست فناوری پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون - مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۶۶۵-۱۱۵۷

مقدمه

در طول چند دهه گذشته، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال به ابزاری کاربردی در تشخیص، درمان و تحقیقات بیوشیمیایی تبدیل شده‌اند (۱). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال عمدتاً شامل سه نوع، آنتی‌بادی موشی، انسانی و آنتی‌بادی‌های نوترکیب می‌باشند (۲). آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انسانی به سختی قابل تولید می‌باشند چرا که در مقایسه با نوع موشی که بر ایمن‌سازی حیوان استوار است، ایمن‌سازی انسان به علت مسائل اخلاقی امکان‌پذیر نمی‌باشد (۳). آلوایمیونیزاسیون نوعی پاسخ ایمنی علیه آنتی‌ژن‌های بیگانه در پی تزریق فرآورده‌های خونی به خصوص گلبول‌های قرمز و هم‌چنین به دنبال رخداد حاملگی می‌باشد (۴، ۵).

تالاسمی یکی از رایج‌ترین اختلالات وراثتی است که به علت کاهش یا فقدان تولید زنجیره آلفا یا بتای گلوبین به وجود می‌آید (۶). اصلی‌ترین رویکرد درمانی در این بیماران، تزریق خون است که از جمله عوارض اصلی آن آلوایمیونیزاسیون می‌باشد (۷). بیشترین آلوآنتی‌بادی تولیدی در این بیماران طبق مطالعه‌های انجام شده در ایران، آنتی‌بادی KELL است (۴). از سلول‌های ایمن شده این بیماران می‌توان برای تولید آنتی‌بادی مونوکلونال استفاده نمود. یکی از روش‌های تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، ترانسفورماسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی توسط ویروس اپشتاین بار می‌باشد. ویروس اپشتاین بار، ویروسی از خانواده هرپس ویروس نوع ۴ است که لنفوسیت‌های B را از طریق گیرنده CD21 آلوده می‌کند و سبب تقسیم پی در پی سلول‌ها و به وجود آمدن سلول‌های لنفوبلاستوتیوید تولیدکننده آنتی‌بادی می‌شود (۸-۱۰). مهار ترانسفورماسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC) به وسیله ویروس اپشتاین بار به علت حضور سلول‌های لنفوسیت T سیتوتوکسیک می‌تواند اتفاق بیوفتد (۱۱). سیکلوسپورین A نوعی داروی سرکوبگر ایمنی می‌باشد که باعث مهار فعال‌سازی سلول‌های T سیتوتوکسیک در *in vivo* و *in vitro* می‌شود. در حضور سیکلوسپورین A، مهار ترانسفورماسیون رفع شده و رشد

لنفوسیت‌های B ترانسفورم شده افزایش می‌یابد (۱۳، ۱۲). با توجه به اهمیت آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در تشخیص خون‌های ناسازگار، هدف این مطالعه ترانسفورماسیون سلول‌های لنفوسیتی آلو ایمن شده بیماران تالاسمی علیه گروه خونی KELL به کمک ویروس اپشتاین بار جهت تولید سلول‌های لنفوبلاستوتیوید تولیدکننده آنتی‌بادی ضد KELL بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه از نمونه خون ۱۰ بیمار تالاسمی ایمن شده علیه آنتی‌ژن KELL استفاده شد. تمامی نمونه‌ها پس از تصویب پروژه و تایید و اخذ کد اخلاق با شماره IR.TMI.REC.1399.025 از سازمان انتقال خون، با مراجعه به درمانگاه تالاسمی ظفر استان تهران با اخذ رضایت‌نامه‌ای که جهت انجام کارهای پژوهشی از بیماران تالاسمی گرفته شده است، تهیه شدند. در این پژوهش گروه مورد بررسی سلول‌های تک هسته‌ای بیماران تالاسمی مواجه یافته با سوپ ویروسی و گروه کنترل منفی مورد استفاده جهت بررسی عملکرد سوپ ویروسی و روند ترانسفورماسیون، سلول‌های تک هسته‌ای بیماران تالاسمی پیش از مواجه با سوپ ویروسی بود.

تهیه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی (PBMC):

۶ میلی‌لیتر خون حاوی ضد انعقاد EDTA از مرکز تالاسمی ظفر تهیه و با استفاده از روش گرادیان غلظتی فایکول سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی PBMC جداسازی گردیدند (۱۴).

تهیه سوپ ویروسی:

سلول‌های ترشح‌کننده ویروس EBV به نام B95-8 (در فاز رشد نمایی) در فلاسک‌های ۷۵ میلی‌متری از مرکز ذخایر ژنتیک خریداری شد و در محیط کامل RPMI1640 کشت داده شدند و ۷-۲ روز بعد از رشد و زرد شدن کامل محیط

Kell مثبت تهیه شده از ویال‌های غربالگر به چاهک‌ها اضافه گردید. به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید و بعد از این مدت وجود آگلوتیناسیون به طور ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی شد.

تست میکروآگلوتیناسیون:

جهت بررسی تولید آنتی‌بادی از پلیت‌های کوت شده با آنتی‌هیومن گلوبولین با غلظت ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر در آزمایشگاه مونوکلونال سازمان انتقال خون استفاده شد. به این منظور ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی چاهک‌هایی که آزمایش هم‌آگلوتیناسیون آن‌ها مثبت شد به همراه چاهک‌های کنترل منفی جمع‌آوری شد و به پلیت کوت شده با آنتی‌هیومن افزوده شد. در این آزمایش سرم IgG انسانی با غلظت ۱۱۰ ng/mL به عنوان کنترل مثبت و چاهک Non-coated به عنوان کنترل منفی الیزا در نظر گرفته شد. پلیت به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از سه بار شست و شو با بافر PBS-Tween، ۵۰ میکرولیتر از محلول کوئزوگه Anti-Human HRP به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۴۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. بعد از سه بار شست و شو با بافر فسفات، به هر چاهک ۵۰ میکرولیتر از محلول سوبسترای تترامیتیل بنزیدی (TMB) افزوده شد و بعد از ۲۰ دقیقه با افزودن ۳۰ میکرولیتر محلول اسید واکنش متوقف شد. آزمایش در دفعات مختلف انجام و جذب نوری در طول موج ۴۵۰ nm با دستگاه الیزاریدر خوانده شد.

نرم‌افزار آماری و آزمون آماری:

مقادیر جذب نوری به دست آمده از روش الیزا از دفعات مختلف کاری، جمع‌آوری شد. سپس میانگین و انحراف معیار و مقدار p با استفاده از نرم‌افزار تحلیل آماری R محاسبه شد.

یافته‌ها

با ترانسفورماسیون سلول‌های لئوسیتیسی، شروع

کشت، مایع رویی برداشته و در فالكون ۱۵ میلی‌لیتری ریخته و با دور ۳۶۰ g به مدت ۷ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی با استفاده از سرنگ از فیلتر ۰/۲۲ میلی‌متری عبور داده شد و در حجم مورد نظر در میکروتیوپ استریل جمع‌آوری شد و در فریزر (-۷۰) درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ترانسفورماسیون سلول‌های تک هسته‌ای:

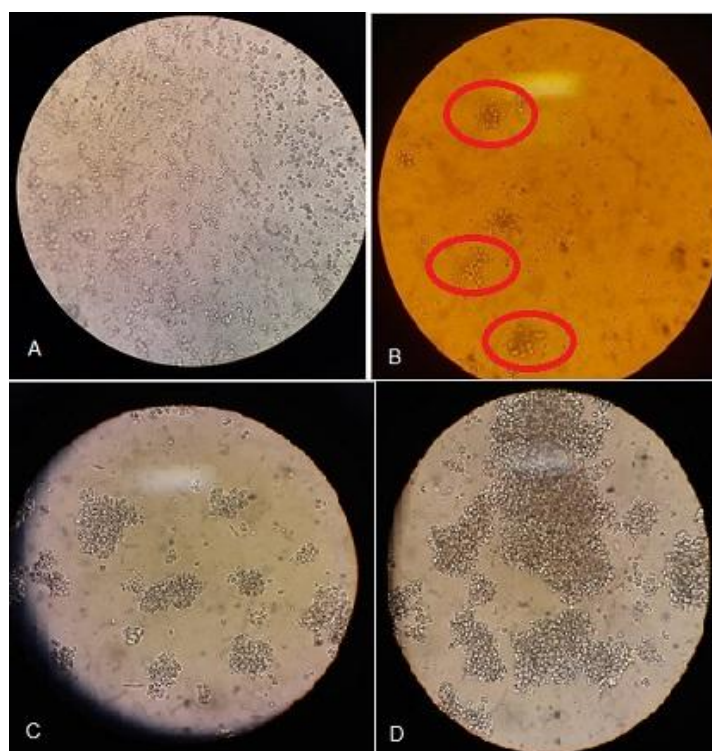
بعد از جمع‌آوری سلول‌های تک هسته‌ای، به ازای هر یک میلیون سلول جدا شده یک میلی‌لیتر از سوپ و پیروسی اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO₂ انکوبه شد. هر ۱۵ دقیقه یک بار سلول‌ها به آرامی مخلوط شدند. بعد از سپری شدن زمان انکوباسیون سلول‌ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای ته صاف (۱۰^۵ سلول به ازای هر چاهک) در حضور ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر سیکلوسپورین در محیط کشت RPMI تقسیم و کشت داده شدند. پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO₂ انکوبه گردید. بعد از ۲۴ ساعت مایع رویی هر چاهک با محیط RPMI تازه حاوی سیکلوسپورین تعویض گردید. تشکیل سلول‌های لنفوبلاستوئید در فواصل زمانی ۴۸ و ۷۲ ساعت و یک تا سه هفته بعد از ترانسفورماسیون با میکروسکوپ معکوس بررسی شد. ۷ تا ۱۰ روز بعد از کشت سلول‌های مجاور شده با ویروس اِپشتاین بار، آزمایش میکروهم‌آگلوتیناسیون جهت تعیین اختصاصیت آنتی‌بادی و آزمایش الیزا جهت تایید تولید آنتی‌بادی انجام شد.

تست الیزا:

وجود آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن Kell در مایع رویی هر چاهک مورد آزمایش در کنار چاهک‌های کنترل منفی و مثبت با استفاده از آزمایش میکروهم‌آگلوتیناسیون تایید شد. برای این امر ۵۰ میکرولیتر از مایع رویی هر چاهک به انتهای چاهک ۹۶ خانه‌ای U شکل اضافه شد و ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱ تا ۲ درصد گلبول‌های قرمز

پلیت‌های U شکل مطابق روش بیان شده انجام گردید. بررسی میکروسکوپی چاهک‌های انجام شده، مثبت شدن تعدادی از چاهک‌ها را تایید نمود (شکل ۲). بررسی آزمایش الایزای چاهک‌هایی که میکروهماگلوتیناسیون آن‌ها مثبت بود در مقایسه با کنترل مثبت و منفی نتیجه قابل قبولی را نشان داد (جدول ۱).

تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها که شامل افزایش سایز سلول و شروع تشکیل کلون‌های سلولی بود، بعد از ۴۸ ساعت از مواجهه با ویروس EBV مشاهده شد. تغییرات سلول‌ها و شکل‌گیری کلون سلولی در روزهای مختلف در شکل نشان داده شده است (شکل ۱). بعد از گذشت ۷-۱۴ روز، آزمایش هم‌آگلوتیناسیون در



شکل ۱: ترانسفورماسیون سلول‌های لنفوسیتی ایمن شده با آنتی ژن KELL. A: PBMC در روز صفر قبل از وقوع ترانسفورماسیون. B: ۴۸ ساعت بعد از ترانسفورماسیون. C: ۷۲ ساعت بعد از ترانسفورماسیون. D: یک هفته بعد از ترانسفورماسیون.



شکل ۲: بررسی میکروسکوپی آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز KELL مثبت با آنتی‌بادی تولید شده علیه آنتی ژن KELL

جدول ۱: میانگین و انحراف معیار جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ nm

کنترل منفی (چاهک‌های کوت نشده با آنتی هیومن گلوبولین)	کنترل مثبت (سرم IgG انسانی با غلظت ۱۱۰ ng/mL)	چاهک‌های مثبت از نظر میکروهماگلو تیناسیون		
۰/۰۰۴	۱/۲۲۰	۱/۴۰۵		
	۱/۲۵۰	۱/۳۵۵		
	۱/۲۴۵	۱/۱۰۰		
	۱/۲۳۸ ± ۰/۰۱	۱/۲۸۶ ± ۰/۱۶	انحراف معیار ± میانگین	
	p value < ۰/۰۰۱			

بحث

تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید یکی از ارزشمندترین دستاوردهای علم بیوتکنولوژی به شمار می‌رود. از جمله کاربردهای سلول‌های لنفوبلاستوئید می‌توان به عرضه آنتی‌ژن در ارزیابی‌های ایمنونولوژیک، تولید آنتی‌بادی‌های مونوکلونال انسانی و رفع محدودیت دسترسی به نمونه بیولوژیک مورد نظر با تولید منبع سلولی نامحدود از نمونه اولیه اشاره کرد. دستیابی به سلول لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌بادی مستلزم حساس‌سازی سلول‌ها علیه آنتی‌ژن مورد نظر در بدن حیوانات آزمایشگاهی و یا در محیط کشت می‌باشد که این مسأله خود زمانبر بوده و با توجه به متفاوت بودن شرایط آزمایشگاهی با بدن انسان، نتیجه مطلوب و مورد نظر را می‌تواند به همراه نداشته باشد. از طرفی ایمن‌سازی انسان علیه آنتی‌ژن خاص نیز به دلیل مسائل اخلاقی مقدور نیست. عارضه ایمن شدن علیه آنتی‌ژن‌های گروه‌های خونی یکی از مشکلاتی است که به علت تزریق خون‌های مکرر در بیماران تالاسمی رخ می‌دهد. از طرفی بیشترین آلوآنتی‌بادی تولیدی در این بیماران طبق مطالعه‌های انجام شده در ایران، آنتی‌بادی KELL می‌باشد (۱۵). با توجه به اهمیت و کاربرد گسترده آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، در این مطالعه برای اولین بار در ایران موفق شدیم با جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران تالاسمی ایمن شده علیه آنتی‌ژن KELL طی

تزریق خون‌های مکرر به روش گرادیان غلظتی فایکول و با استفاده از روش EBV-Transformation به تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌بادی بپردازیم. پیشتر فانگ و همکارانش با توجه به اهمیت آلوآنتی‌بادی‌های انسانی به عنوان ابزار بالینی مهم در آزمایش‌های تشخیصی آزمایشگاهی مانند تعیین گروه‌های خونی برای تزریق خون و پیوند بافت و همچنین در زمینه درمان مانند پیشگیری از بیماری همولیتیکی نوزادان ناشی از مغایرت سیستم گروه خون Rh، به فکر تولید Anti-A از خون محیطی افراد طبیعی افتادند. فانگ بیان داشت که با جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی افراد طبیعی و استفاده از روش EBV-Transformation، امکان تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده Anti-A در آزمایشگاه وجود دارد. آن‌ها جهت حذف سلول‌های سیتوتوکسیک از روش روزت استفاده نمودند و جهت پایداری کلون حاصل از امتزاج سلول‌های لنفوبلاستوئید با سلول‌های میلومایی بهره بردند و موفق به تولید آنتی‌بادی شدند (۱۶). هم‌چنین پاشا با اشاره به اهمیت آنتی‌بادی مونوکلونال انسانی اختصاصی علیه سیستم Rh و کاربرد آن در تعیین گروه خونی و ممانعت از اریتروبلاستوز، به طراحی پژوهشی براساس جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی خانمی با سیستم Rh⁻ و سابقه حاملگی با جنین Rh⁺ و ترانسفورماسیون سلول‌ها با

استفاده از ویروس اِشتاین بار پرداخت (۱۷). فراسن و همکارانش نیز از EBV-Transformation برای تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید استفاده نمودند. از جمله تفاوت‌هایی که پژوهش آن‌ها نسبت به کارهای پیشین و حتی پژوهش ما داشته و باعث افزایش کارآیی ترانسفورماسیون با توجه به نتایج حاصل از کار به بیش از ۸۰ درصد شده بود، جداسازی اختصاصی سلول‌ها با روش FACS Aria بود که اختصاصاً لنفوسیت‌های B جدا و با اِشتاین بار مواجه شده بود (۱۸). لمسکایا با اشاره به این که بسیاری از مطالعه‌های ژنتیکی و مولکولی نیازمند نمونه بیولوژیکی تجدیدپذیر می‌باشند، به بیان روش اصلاح شده EBV-Transformation پرداخت. از جمله مزیت‌های استفاده از خون محیطی، سهولت دستیابی به آن می‌باشد اما بارزترین مشکل آن طول عمر کوتاه سلول‌های خون محیطی است. ویروس اِشتاین بار قادر است لنفوسیت‌های B خون محیطی انسان را به سلول‌های تکثیرشونده به صورت نامحدود تبدیل کند که این سلول‌ها قابل نگهداری در محیط کشت می‌باشند. لمسکایا با جداسازی پلاسمای خون محیطی و مجاورسازی آن با سوپ ویروسی به کشت سلول‌ها در حضور سیکلوسپورین A پرداخت. نتایج حاصل از کار اشاره به موفقیت نامیراسازی سلول‌های B در کنار دیگر سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی در مدت زمان کوتاه با حجم کم نمونه دارد (۱۹). در پژوهش حاضر نیز با دریافت حجم کم نمونه خون بیماران تالاسمی موفق به تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید تکثیر شونده شدیم. بهبود کارآیی EBV-Transformation مستلزم استفاده از ترکیبات سرکوبگری مانند سیکلوسپورین می‌باشد. سیکلوسپورین مهارکننده تولید سایتوکین‌ها و رهاسازی اینترلوکین‌ها محسوب می‌شود که منجر به کاهش فعالیت سلول‌های T سیتوتوکسیک می‌گردد (۲۰). پلوکین و همکارانش با بررسی اثر سیکلوسپورین در حذف سلول‌های سیتوتوکسیک از محیط کشت در روش EBV-Transfusion، شاهد تداوم تکثیر سلول‌های لنفوبلاستوئید بودند (۱۱). هم‌چنین چانگ لیو طی بررسی‌هایی که بر روش‌های متفاوت

حذف لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک، تاثیر مثبتی در روند تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید دارد (۲۱). در پژوهش حاضر نیز افزودن محیط کشت حاوی سیکلوسپورین با حذف اثر لنفوسیت‌های سیتوتوکسیک، سبب بهبود روند ترانسفورماسیون و افزایش تعداد کلون‌های حاصل شد. با توجه به بررسی مطالعه‌های پیشین و نتایج به دست آمده از مطالعه کنونی، نشان داده شد که مواجهه سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران تالاسمی آلو ایمن ضد آنتی‌ژن EBV با ویروس EBV با استفاده از روش EBV-Transformation سبب تولید خط سلولی لنفوبلاستوئید تولید آنتی‌بادی ضد KELL می‌گردد.

نتیجه‌گیری

کلون‌های سلولی لنفوبلاستوئید تولید کننده آنتی‌بادی ضد KELL که از ترانسفورماسیون سلول‌های حساس شده افراد تالاسمی علیه گروه خونی KELL در پی تزریق خون‌های سازگار به وجود آمده‌اند با ویروس EBV، قادر به تشخیص و آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز حاوی این آنتی‌ژن در محیط کشت می‌باشد. آنتی‌بادی تولیدی می‌تواند به عنوان ابزاری جهت غربالگری و تشخیص گروه‌های خونی سازگار در بیماران نیازمند تزریق مداوم خون مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی و طب انتقال خون مرکز تحقیقات مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1399.025 می‌باشد. بودجه این مطالعه توسط مؤسسه آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون انجام شده است.

References:

- 1- Holzlöhner P, Hanack K. Generation of murine monoclonal antibodies by hybridoma technology. *J Vis Exp* 2017; 2017(119): 54832.
- 2- Zimring JC, Hendrickson JE. The role of inflammation in alloimmunization to antigens on transfused red blood cells. *Curr Opin Hematol* 2008; 15(6): 631-5.
- 3- Golestani R, Pourfathollah AA, Moazzeni SM. An extreme strategy for the production of hybridoma. *Hybridoma* 2009; 28(2): 139-44.
- 4- 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.
- 5- Dhawan HK, Kumawat V, Marwaha N, Sharma RR, Sachdev S, Bansal D, *et al.* Alloimmunization and autoimmunization in transfusion dependent thalassemia major patients: Study on 319 patients. *Asian J Transfus Sci* 2014; 8(2): 84-8.
- 6- Nganou BK, Selvaraj J, Tane P, Nchiozem A, Simo I, Mvnl Ch, Palanisamy D. A Review on *Adenocarpus mannii*; a Main Species of the Genus *Adenocarpus*. *Current Traditional Medicine* 2020; 7(6): 3-12.
- 7- El Kababi S, Benajiba M, El Khalfi B, Hachim J, Soukri A. Red blood cell alloimmunizations in beta-thalassemia patients in Casablanca/Morocco: Prevalence and risk factors. *Transfus Clin Biol* 2019; 26(4): 240-8.
- 8- 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.
- 9- Bishop GA, Busch LK. Molecular mechanisms of B-lymphocyte transformation by Epstein-Barr virus. *Microbes Infect* 2002; 4(8): 853-7.
- 10- Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells *in vivo*. *Immunity* 1998; 9(3): 395-404.
- 11- Pelloquin F, Lamelin JP, Lenoir GM. Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol* 1986; 22(12): 689-94.
- 12- Aiyer Harini P, Ashok Kumar HG, Praveen Kumar G, Shivakumar N. An overview of immunologic adjuvants-A review. *J Vaccines Vaccin* 2013; 4(1): 1000167.
- 13- Liddicoat AM, Lavelle EC. Modulation of innate immunity by cyclosporine A. *Biochem Pharmacol* 2019; 163: 472-80.
- 14- Hui-Yuen J, McAllister S, Koganti S, Hill E, Bhaduri-Mcintosh S. Establishment of Epstein-Barr virus growth-transformed lymphoblastoid cell lines. *J Vis Exp* 2011; (57): 3321.
- 15- Sarihi R, Amirizadeh N, Oodi A, Azarkeivan A. Distribution of Red Blood Cell Alloantibodies Among Transfusion-Dependent β -Thalassemia Patients in Different Population of Iran: Effect of Ethnicity. *Hemoglobin* 2020; 44(1): 31-6.
- 16- Fong SKH, Perkins S, Raubitschek A, Larrick J, Lizak G, Fishwild D, *et al.* Rescue of human monoclonal antibody production from an EBV-transformed B cell line by fusion to a human-mouse hybridoma. *J Immunol Methods* 1984; 70(1): 83-90.
- 17- Pasha RPK, Roohit 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.
- 18- Fraussen J, Vrolix K, Martinez-Martinez P, Losen M, Meulemans E, De Baets MH, *et al.* A novel method for making human monoclonal antibodies. *J Autoimmun* 2010; 35(2): 130-4.
- 19- Lemskaya NA. A modified protocol for highly efficient EBV-mediated immortalization of human B lymphocytes from small volumes of peripheral blood serum. *Egypt J Med Hum Genet* 2018; 19(3): 221-3.
- 20- Tedesco D, Haragsim L. Cyclosporine: a review. *J Transplant* 2012; 2012: 230386.
- 21- Liu C, Liu H, Zhang L, Deng N. An Optimized method for construction of Epstein-Barr virus-transformed immortalized lymphoblastoid cell lines. *J Med Discov* 2016; 2(1): 1-4.

Original Article

Evaluation of the development of specific lymphoblastoid cell line producing antibody from B lymphocytes in thalassemia patients immunized against KELL antigen by Epstein-Barr virus

Ahmadi Seyd Mohammadi P.¹, Sharifi Z.¹, Oodi A.¹, Milani S.¹

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

Abstract

Background and Objectives

Alloimmunization is caused by exposure of B lymphocytes to foreign antigens following incompatible blood transfusions and is associated with many hemolytic complications. One of the ways to detect blood group antigens is monoclonal antibodies. The aim of the present study is transforming of alloimmunized cells against KELL antigen in thalassemia patients by EBV-Transformation method and to produce lymphoblastoid cell line producing anti-KELL antibody.

Materials and Methods

In an experimental study, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of 10 thalassemia patients immunized against KELL antigen were isolated by ficoll hypaque method and exposed to EBV-containing supernatant of B95-8 cell line for 4 hours. After one to three weeks, the production of antibody-producing lymphoblastoid clones and the specificity of the antibody were examined by microscopic observation and microhemagglutination method, respectively.

Results

The results showed that exposure of PBMCs of thalassemia patients immunized against KELL antigen with EBV viral soup caused the formation of lymphoblastoid clones. Examination of the supernatant of culture of produced clones showed that the antibody produced by these cells were able to identify red blood cells containing KELL antigen and agglutinate them by micro hemagglutination test.

Conclusions

Based on the findings, there is a possibility of PBMC transformation in thalassemia patients immunized against KELL antigen and antibody production.

Key words: Alloimmunization, Epstein-Barr Virus, B Lymphocytes

Received: 22 May 2022

Accepted: 11 Sep 2022

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