خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۹ شماره ۴ زمستان ۱۴۰۱ (۳۰۰-۲۹۲)

مقاله پژوهشی

ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده Anti-RhE با استفاده از خون بیماران تالاسمی آلوایمیون

مهدی شکفت[۱]، سعیده میلانی[۲]، زهره شریفی[۳]، آرزو اودی[۴]

چکیده

سابقه و هدف

یکی از کاربردهای ویروس اپشتاین بار در تحقیقات، نامیراسازی لنفوسیت‌های B و ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید می‌باشد. افراد مبتلا به تالاسمی معمولاً نیازمند تزریق خون هستند که عارضه اصلی آن آلوایمیونیزاسیون است. آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن RhE سبب واکنش‌های همولیتیک می‌گردد. هدف از این مطالعه، ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌E با استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران تالاسمی آلوایمن علیه آنتی‌ژن E در مواجهه با ویروس EBV بود.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، سلول‌های تک هسته‌ای ۳ بیمار توسط فایکول جدا و با EBV مجاور گردید. سلول‌های ترانسفرم شده در محیط کشت RPMI حاوی سیکلوسپورین کشت داده شدند. پس از ۳-۲ هفته، تشکیل کلون در چاهک‌ها بررسی و آزمایش هماگلوتیناسیون برای چاهک‌ها انجام شد؛ میزان کل آنتی‌بادی چاهک‌های مثبت به روش الایزا اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها

مواجهه سلول‌های تک هسته‌ای بیماران با EBV منجر به ترانسفورم سلول‌ها و ایجاد کلون در برخی از چاهک‌ها گردید. نتایج هماگلوتیناسیون و الایزا نشان داد که کلون‌ها قادر به تولید آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن RhE هستند.

نتیجه‌گیری

می‌توان با استفاده از سلول‌های حساس شده بیماران تالاسمی علیه آنتی‌ژن RhE و نامیراسازی آن به روش ترانسفورماسیون به کمک ویروس EBV ، رده سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌بادی Anti-E ایجاد کرد.

کلمات کلیدی: آنتی‌بادی‌ها، تالاسمی، آلوایمیونیزاسیون، EBV

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۳/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۰۵

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 زیست فناوری ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران ـ کدپستی: ۳۶۹-۱۴۶۶۵
۳- PhD ویروس شناسی ـ استاد مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران
۴- PhD هماتولوژی و بانک خون ـ استادیار مرکز تحقیقات انتقال خون ـ مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون ـ تهران ـ ایران

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

مقدمه

امروزه از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال در تحقیقات، تشخیص و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. اولین گام در فرآیند تولید آنتی‌بادی مونوکلونال، ایمیونیزاسیون درست لنفوسیت‌های B ، با آنتی‌ژن مناسب می‌باشد(۱). با توجه به طول عمر کوتاه و محدود لنفوسیت‌های B گام بعدی نامیراسازی این سلول‌های سیستم ایمنی بوده که با استفاده از روش‌های مختلفی مانند استفاده از مواد شیمیایی کارسینوژن، فعال‌سازی تلومرازها، آلودگی سلول‌ها با ویروس‌های انکوژن مانند EBV و هیبریدیزاسیون با سلول‌های سرطانی صورت می‌گیرد(۲). EBV از خانواده هرپس ویروس‌ها(Herpes virus) بوده و لنفوسیت‌های B و سلول‌های اپیتلیال را از طریق گیرنده خود که CD21 می‌باشد، آلوده می‌سازد(۴، ۳). در شرایط *In vitro* ، EBV با آلوده‌سازی لنفوسیت‌های B ، ابتدا منجر به تغییر شکل سلول‌ها و سپس منجر به ترانسفورماسیون، نامیرایی و تبدیل شدن آن‌ها به Lymphoblastoid Cell Line (LCL) می‌گردد. در واقع LCL ها، سلول‌های ترانسفرم شده‌ای هستند که دائماً در حال تقسیم و تولید آنتی‌بادی می‌باشند(۵). به علت حضور هم‌زمان لنفوسیت‌های B و T در مرحله آلوده‌سازی با EBV ، لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک نیز ایجاد شده که سبب از بین بردن لنفوسیت‌های B می‌گردند؛ برای جلوگیری از وقوع این پدیده از سیکلوسپورین A استفاده می‌شود(۶). تالاسمی یک بیماری ارثی هماتولوژیک ناشی از کاهش یا عدم ساخت زنجیره‌های گلوبین مولکول هموگلوبین بوده که سبب عدم تعادل زنجیره‌های گلوبین و در نهایت همولیز، اریتروپوئز غیر مؤثر و آنمی می‌گردد(۷). امروزه تالاسمی به ۲ گروه وابسته به تزریق خون و غیر وابسته به تزریق خون تقسیم می‌گردد که این تقسیم‌بندی مبتنی بر شدت علائم بالینی بیمار و نیازمندی آن‌ها به تزریق خون برای بقا است(۸). آلوایمیونیزاسیون طی تزریق فرآورده‌های خونی و بارداری رخ می‌دهد و به عنوان یکی از مشکلات اصلی در بیماران نیازمند تزریق خون مداوم شناخته می‌شود که می‌تواند منجر به واکنش‌های تأخیری و شدید همولیتیک ناشی از تزریق خون و هم‌چنین بیماری‌های همولیتیکی جنینی- نوزادی گردد(۱۰، ۹). سیستم گروه خونی Rh یکی از پلی‌مورف‌ترین و ایمونوژن‌ترین سیستم‌های گروه خونی در انسان می‌باشد. ۵ آنتی‌ژن مهم در این سیستم شامل D ، C ، c ، E و e است(۱۱). بر پایه مطالعه‌های انجام شده در ایران، شیوع آنتی‌ژن E حدود ۳۵-۲۹ درصد می‌باشد(۱۳، ۱۲). Anti-RhE آنتی‌بادی، جزو شایع‌ترین آنتی‌بادی‌ها در بیماری‌های همولیتیک جنینی است(۱۴)؛ Anti-RhE آنتی‌بادی، شایع‌ترین آلوآنتی‌بادی ناشی از تزریق خون می‌باشد که می‌تواند منجر به واکنش‌های همولیتیک ناشی از تزریق خون گردد(۱۵، ۹).

با توجه به این که تزریق خون‌های متعدد خطر آلوایمیونیزاسیون را افزایش می‌دهد، تعیین فنوتیپ گلبول‌های قرمز گیرنده و دهنده خون برای یافتن خون مناسب با حداکثر سازگاری و کمترین عوارض امری ضروری می‌باشد که این امر اهمیت تولید مونوکلونال آنتی‌بادی‌ها و استفاده از آن‌ها را در بانک خون مشخص می‌کند(۱۶). ایجاد آلوآنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن RhE که از ایمنی‌زایی بالایی برخوردار بوده، می‌تواند با بروز عوارض نامطلوب، توالی تزریق خون در بیماران را افزایش دهد. بنابراین هدف از این مطالعه، جداسازی لنفوسیت‌های ایمن شده از بیماران تالاسمی آلوایمیون و ترانسفورم آن‌ها با ویروس اپیشتاین بار جهت دستیابی به رده سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌بادی ضد آنتی‌ژن RhE بود.

مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود.

تهیه نمونه خون:

کار بر روی نمونه خون ۳ بیمار مبتلا به تالاسمی و

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

دارای پاسخ آلوایمن علیه آنتی‌ژن RhE شروع گردید. تمامی نمونه‌های خون بیماران تالاسمی از مرکز درمان تالاسمی ظفر پس از تصویب پروژه، تایید و دریافت کد اخلاق با شماره IR.TMI.REC.1399.016 در سازمان انتقال خون و به پیوست رضایت‌نامه‌ای که از بیماران جهت انجام مطالعه پژوهشی اخذ شده است، دریافت گردید.

تهیه سوپ ویروسی:

سلول‌های Marmoset B95-8 (در فاز رشد نمایی) از مرکز ذخایر ژنتیک خریداری شده و در محیط کامل RPMI1640 کشت داده شدند. ۵-۳ روز پس از کشت و زرد کردن کامل محیط کشت، مایع رویی برداشته و به مدت ۷-۵ دقیقه با دور rpm ۱۵۰۰ سانتریفوژ گردید. مایع رویی از فیلتر ۰/۲ میکرون عبور داده شد و در فریزر ۷۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

جداسازی و ترانسفورماسیون سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی:

سلول‌های تک هسته‌ای موجود در نمونه خون دریافتی با استفاده از گرادیان غلظتی فایکول جدا شدند؛ سپس به این سلول‌ها سوپ ویروسی اضافه گردید و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO_2 انکوبه شد. هر ۱۵ دقیقه یک بار سلول‌ها به آرامی مخلوط گردیدند. سپس سلول ها در پلیت ۹۶ خانه‌ای، به میزان ۱۰۰ هزار سلول در هر چاهک تقسیم شده و به چاهک‌ها محیط کشت کامل RPMI + ٪۱۰ FBS حاوی سیکلوسپورین (۰/۱ µg/mL) اضافه گردید(۶ چاهک برای هر بیمار)؛ پلیت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد دارای ۵ درصد CO_2 انکوبه شده و پس از ۲۴ ساعت مایع رویی هر چاهک با محیط تازه حاوی سیکلوسپورین تعویض گردید. تشکیل سلول‌های لنفوبلاستوئید در فواصل زمانی مختلف بعد از ترانسفورماسیون با میکروسکوپ معکوس بررسی گردید. ۳-۲ هفته بعد از کشت سلول‌های مجاور شده با ویروس اپشتاین بار، آزمایش میکروهماگلوتیناسیون جهت تعیین اختصاصیت آنتی‌بادی و آزمایش الایزا جهت تایید تولید آنتی‌بادی انجام شد.

هماگلوتیناسیون:

وجود آنتی‌بادی اختصاصی علیه آنتی‌ژن E در مایع رویی هر چاهک با انجام آزمایش میکرو هماگلوتیناسیون تایید شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع‌رویی هر چاهک به انتهای چاهک ۹۶ خانه‌ای U شکل اضافه شد و ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون ٪۲-٪۱ گلبول‌های قرمز E مثبت تهیه شده از سلول‌های غربالگر به چاهک‌ها اضافه گردید. سپس پلیت به مدت ۴۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شده و بعد از این مدت وجود آگلوتیناسیون به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی بررسی گردید.

آزمایش الایزا:

جهت بررسی تولید آنتی‌بادی از پلیت‌های کوت شده با آنتی‌هیومن گلوبولین در آزمایشگاه مونوکلونال سازمان انتقال خون استفاده شد. ۵۰ میکرولیتر از مایع‌رویی چاهک‌هایی که آزمایش هماگلوتیناسیون آن‌ها مثبت شد به پلیت کوت شده با آنتی‌هیومن اضافه گردید. در این آزمایش چاهک Non-coated به عنوان کنترل منفی الایزا 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 کونژوگه 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 تترامتیل بنزیدین(TMB) افزوده شد و بعد از ۲۰ دقیقه با

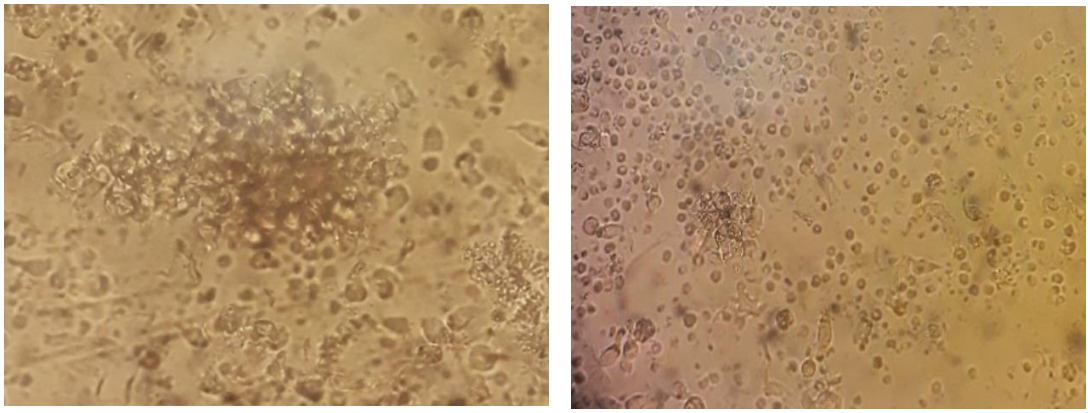
[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

افـزودن ۳۰ میکرولیتـر محلـول اسـید واکـنش متوقـف شـد. مقـادیر جـذب نـوری بـه دسـت آمـده از نتـایج آزمـایش الایـزا در جـدول گـردآوری شـدند. سپـس محاسـبه میـزان میـانگین و انحـراف معیـار و هم‌چنـین مقایسه نتایج با استفاده از R studio صورت گرفت.

یافته‌ها

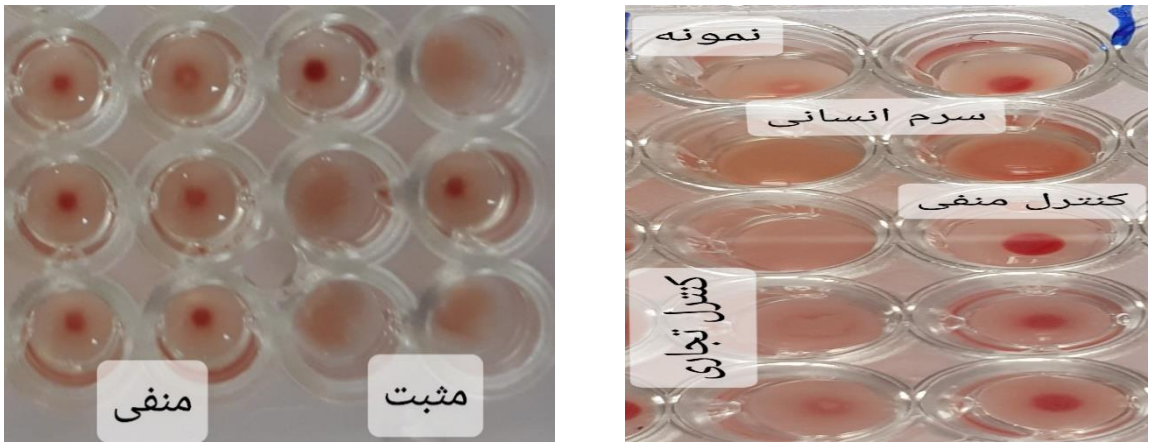
پس از مواجه سلول‌ها با EBV ، تغییرات ظاهری در سلول‌ها، از قبیل کشیده‌تر شدن سلول‌ها و تشکیل کلون‌های کوچک پس از ۴۸ ساعت مشاهده گردید. با گذشت زمان تعداد کلون‌ها بیشتر شـده و افزایـش تعداد سلول‌ها در هر کلـون رؤیـت شـد. پـس از گـذشت ۳-۲ هفتـه، آزمایش هماگلوتیناسیون در پلیت‌های U شکل انجام شد.

یـک چاهـک بـه عنـوان کنتـرل منفی(سـوپ رویـی چاهـک حـاوی سـلول ترانسـفرم نشـده) و ۲ چاهـک بـه عنـوان کنتـرل مثبت(سـرم بیمـارداری Anti-E و کنتـرل تجـاری Anti-E) در نظـر گرفتـه شـدند. ۳۳٪ چاهک‌هـا دارای آزمـایش هماگلوتیناسـیون مثبـت بودنـد. بـه عبـارت دیگـر آنتی‌بـادی تولیـدی توسـط سـلول‌های موجـود در چاهـک توانـایی هماگلوتیناسـیون سوسپانسـیون گلبول‌هـای قرمـز دارای آنتـی‌ژن E را داشت.



A B

شکل ۱: وضعیت سلول‌ها ۴۸ ساعت پس از ترانسفورماسیون(A) یک کلون لنفوبلاستوئید(B)



شکل ۲: نتیجه ماکروسکوپی آزمایش هماگلوتیناسیون برای چاهک‌ها در پلیت U شکل

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

هم‌چنین قدرت هماگلوتیناسیون آنتی‌بادی تولیدی برابر با قدرت هماگلوتیناسیون آنتی‌بادی تجاری Anti-E در رقت ۱/۱۰ بود. سوپ رویی چاهک‌های مثبت در آزمایش هماگلوتیناسیون در میکروتیوب‌های جداگانه جمع‌آوری گردید و جهت انجام آزمایش الایزا به آزمایشگاه مونوکلونال آنتی‌بادی سازمان انتقال خون انتقال داده شد. بعد از انجام مراحل الایزا، میزان جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ۴۵۰ nm خوانده شد.

سلول‌های ترانسفرم شده تولیدکننده آنتی‌بادی، در صورت عدم فیوژن با سلول‌های میلومایی پس از ۳ تا ۴ هفته از ترانسفورماسیون به وسیله EBV ، می‌میرند.

جدول ۱: جذب نوری، میانگین و انحراف معیار هر چاهک در طول موج ۴۵۰ nm

محتویات چاهک	جذب نوری	میانگین	میانگین ± انحراف معیار
سلول ترانسفورم شده + سیکلوسپورین	۰/۸۹۲ ۱/۰۴۲ ۰/۹۲۱ ۰/۸۷۵ ۱/۰۰۹ ۱/۰۰۲	۰/۹۵۶	۰/۰۶۳ ± ۰/۹۵۶
سلول ترانسفورم نشده + سیکلوسپورین	۰/۱۷۳ ۰/۱۲۸ ۰/۱۸۵	۰/۱۶۲	۰/۰۲۴ ± ۰/۱۶۲
سرم IgG انسانی	۱/۲۲۰ ۱/۲۸۰ ۱/۱۵۰	۱/۲۱۰	۰/۰۵۳ ± ۱/۲۱۰
چاهک کوت نشده (کنترل منفی)	۰/۰۳۷ ۰/۰۴۹ ۰/۰۳۴	۰/۰۴۰	۰/۰۰۶ ± ۰/۰۴۰

جدول ۲: مقایسه چاهک‌های حاوی سلول‌های ترانسفرم شده و ترانسفرم نشده در محیط کشت حاوی سیکلوسپورین

	تعداد	میانگین	انحراف معیار	p value
ترانسفورم نشده	۳	۰/۱۶۲	۰/۰۲۴	<۰/۰۰۱
ترانسفورم شده	۶	۰/۹۵۶	۰/۰۶۳	

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

بحث

امروزه آنتی‌بادی‌های مونوکلونال جایگاه ویژه‌ای در علم پزشکی پیدا کرده‌اند و از آن‌ها در فرآیندهای تشخیص و درمان بیماری‌ها استفاده می‌شود. برای اولین بار از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای تشخیص گروه‌های خونی استفاده گردید و امروزه نیز یکی از کاربردهای اصلی این ترکیبات در ایمونوهماتولوژی می‌باشد که منجر به شناسایی و تعیین فنوتیپ گلبول‌های قرمز و هم‌چنین دریافت خون در بیماران نیازمند تزریق خون با حداکثر سازگاری می‌باشد.

با توجه به این که بیماران تالاسمی به دلیل تزریق خون‌های مکرر عمدتاً دارای آلوآنتی‌بادی، به خصوص Anti-E می‌باشند، بنابراین سلول‌های خون محیطی این افراد به طور طبیعی در محیط بدن ایمیونیزه شده‌اند و نیازی به ایمیونیزاسیون این سلول‌ها در *In vitro* نبوده و با نامیراسازی این سلول‌ها به وسیله EBV و ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید می‌توان فرآیند تولید آنتی‌بادی مونوکلونال را تسریع کرد.

در این مطالعه، سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون محیطی بیماران تالاسمی آلوایمیون علیه آنتی‌ژن RhE براساس گرادیان غلظتی فایکول جدا شدند و به وسیله EBV ترانسفورم گردیدند. به دلیل حضور لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک در سلول‌های جدا شده، از سیکلوسپورین به عنوان مهارکننده این سلول‌ها استفاده شد. پس از ۳-۲ هفته با استفاده از آزمایش هماگلوتیناسیون حضور آنتی‌بادی مد نظر در چاهک‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت و برای چاهک‌های مثبت در آزمایش هماگلوتیناسیون، جهت سنجش میزان کل آنتی‌بادی آزمایش الایزا صورت گرفت. میانگین جذب نوری این چاهک‌ها (چاهک‌های مثبت در آزمایش هماگلوتیناسیون) برابر با ۰/۹۵۶ بود که در مقایسه با میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل(سلول ترانسفورم نشده) که ۰/۱۶۲ بود دارای تفاوت معنادارای بود($p< ۰/۰۰۱$). مقایسه نتایج الایزا چاهک‌های حاوی سلول‌های ترانسفورم شده و ترانسفورم نشده و تشکیل کلون در چاهک‌های حاوی سلول‌های ترانسفورم شده، بیانگر عملکرد مناسب EBV و تولید آنتی‌بادی توسط سلول‌ها بود. به نظر می‌رسد به دلیل استفاده از ویروس EBV در تولید این آنتی‌بادی‌ها و امکان انتقال آن از راه دهان و بینی، بهتر است آنتی‌بادی‌های تولیدی بدین روش ویروس‌زدایی شوند.

طوسی‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۷ در ایران با مطالعه و بررسی عوامل مؤثر دریافتند که در درمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۵٪ CO_2، ۲۰٪ FBS و محیط کشت RPMI ، نامیراسازی لنفوسیت‌ها به خوبی رخ می‌دهد(۱۷). این در حالی است که ما در مطالعه خود برخلاف مطالعه طوسی‌زاده از ۱۰٪FBS استفاده کرده و موفق به ایجاد سلول‌هایی نامیرا شدیم.

یوئن در سال ۲۰۱۱ در آمریکا، موفق به نامیراسازی لنفوسیت‌های B خون محیطی با استفاده از EBV و تاکرولیموس(مهارکننده لنفوسیت‌های T) گردیدند(۱۸). ما در مطالعه خود از سیکلوسپورین به غلظت ۰/۱ µg/mL به عنوان جایگزین تاکرولیموس استفاده کرده و نتایجی مشابه به دست آوردیم.

فراسن و همکاران در سال ۲۰۱۰ سلول‌های B خون محیطی را به روش FACS جدا کرده و با استفاده از EBV آن‌ها را نامیرا ساختند؛ آن‌ها هم‌چنین در مطالعه خود به این نتیجه رسیدند که استفاده از PBMC در مقایسه با لنفوسیت‌های B منجر به حصول نتیجه بهتری می‌گردد که این امر ممکن است به دلیل حضور سایر سلول‌ها و کمک آن‌ها به لنفوسیت‌های B باشد(۱۹). ما نیز در مطالعه خود سلول‌های تک هسته‌ای موجود در خون محیطی را جدا کرده و با استفاده از EBV موفق به ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید شدیم که این یافته ما منطبق بر یافته‌های فراسن و همکاران بود.

لمسکایا در سال ۲۰۱۷ روش نامیراسازی سلول‌ها با EBV با کارآیی بالا را به کار بردند؛ آن‌ها در این روش از ۳ تا ۵ میلی‌لیتر از خون محیطی به عنوان منبعی برای جداسازی لنفوسیت‌های B و محیط

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

کشت RPMI1640 بدون لایه تغذیه‌کننده استفاده کردند(۲). ما نیز در پژوهش خود از ۶-۵ میلی‌لیتر از خون بیماران تالاسمی آلوایمیون به عنوان منبعی برای جداسازی PBMC استفاده کرده و نامیراسازی سلول‌ها و ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید را بدون استفاده از لایه تغذیه‌کننده انجام دادیم.

نتایج حاصل از این مطالعه بیانگر این موضوع می‌باشد که می‌توان با استفاده از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی بیماران تالاسمی آلوایمیون و EBV ، رده سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌بادی ایجاد کرد.

نتیجه‌گیری

می‌توان از حجم کمی از خون (۶-۵ میلی‌لیتر) بیماران تالاسمی آلوایمیون که لنفوسیت‌های آن‌ها به صورت طبیعی در محیط بدن ایمیونیزه شده‌اند به عنوان منبع سلولی برای ایجاد رده سلولی لنفوبلاستوئید تولیدکننده آنتی‌بادی به وسیله EBV استفاده نمود. آنتی‌بادی تولیدی توانایی شناسایی و آگلوتیناسیون گلبول‌های قرمز را دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله حاصل پایان‌نامه دانشجویی دوره کارشناسی ارشد رشته هماتولوژی و طب انتقال خون در مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون با کد اخلاق IR.TMI.REC.1399.016 می‌باشد. بودجه این مطالعه توسط مؤسسه عالی آموزشی و پژوهشی طب انتقال خون تأمین گردیده و همه مراحل عملی پروژه در آزمایشگاه آنتی‌بادی مونوکلونال و ویروس‌شناسی انجام شده است.

References:

1- Hanack K, Messerschmidt K, Listek M. Antibodies and Selection of Monoclonal Antibodies. Adv Exp Med Biol 2016; 917: 11-22.
2- 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.
3- Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. Lancet 1964; 1(7335): 702-3.
4- Cohen JI. Primary Immunodeficiencies Associated with EBV Disease. Curr Top Microbiol Immunol 2015; 390(Pt 1): 241-65.
5- Sugimoto M, Tahara H, Ide T, Furuichi Y. Steps involved in immortalization and tumorigenesis in human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. Cancer Res 2004; 64(10): 3361-4.
6- Movafagh A, Heydary H, Mortazavi-Tabatabaei SAR, Azargashb E. The significance application of indigenous Phytohemagglutinin (PHA) mitogen on metaphase and cell culture procedure. Iran J Pharm Res 2011; 10(4): 895-903.
7- Muncie HLJ, Campbell J. Alpha and beta thalassemia. Am Fam Physician. 2009; 80(4): 339-44.
8- Viprakasit V, Ekwattanakit S. Clinical Classification, Screening and Diagnosis for Thalassemia. Hematol Oncol Clin North Am 2018; 32(2): 193-211.
9- Azarkeivan A, Ansari S, Ahmadi MH, Hajibeigy B, Maghsudlu M, Nasizadeh S, *et al*. Blood transfusion and alloimmunization in patients with thalassemia: Multicenter study. Pediatr Hematol Oncol 2011; 28(6): 479-85.
10- 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.
11- Avent ND, Reid ME. The Rh blood group system: a review. Blood 2000; 95(2): 375-87.
12- Ahmadi MH, Maroufi F, Kelki H, Zolghadri N, Moradi F, Maali A, *et al*. The incidence of ABO, Kell and Rh system blood groups in general population of Qazvin, Iran. Arch Adv Biosci 2018; 9(4): 42-6.
13- Shahverdi E, Moghaddam M, Talebian A, Abolghasemi H. Distribution of blood groups in the Iranian general population. Immunohematology 2016; 32(4): 135-9.
14- Moran P, Robson SC, Reid MM. Anti-E in pregnancy. BJOG 2000; 107(11): 1436-8.
15- Hosseini MS, Jafari L, Shiri Heris R, Gharehbaghian A. Red blood cell alloimmunization in Iran: A

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

Comprehensive review of the literature. Asian J Transfus Sci 2020; 14(1): 4-8.
16- Alkindi S, AlMahrooqi S, AlHinai S, AlMarhoobi A, Al-Hosni S, Daar S, *et al*. Alloimmunization in Patients with Sickle Cell Disease and Thalassemia: Experience of a Single Centre in Oman. Mediterr J Hematol Infect Dis 2017; 9(1): e2017013.
17- Tousizadeh B, Moghim S, Chaleshtori ARS, Ghanbarian M, Mirian M, Salehi M, *et al*. Application of Epstein-Barr Virus for Optimization of Immortalized B-lymphocyte Production as a Positive Control in Genetic Studies. Adv Biomed Res 2017; 6: 80.
18- 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.
19- 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.

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]

Sci J Iran Blood Transfus Organ 2022;19 (4): 292-300

Original Article

Establishment of lymphoblastoid cell line producing Anti-RhE antibody using alloimmune thalassemia patient's blood

Shekeft M.[1], Milani S.[1], Sharifi Z.[1], Oodi A.[1]

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

Abstract

Background and Objectives

One of the applications of Epstein-Barr virus in research is the immortalization of B lymphocytes and the creation of the lymphoblastoid cell line. People with thalassemia usually need blood transfusion, the main complication of which is alloimmunization. Antibody against RhE antigen causes hemolytic reactions. The aim of this study is to create a lymphoblastoid cell line that produces anti-E using peripheral blood mononuclear cells of alloimmune thalassemia patients against E antigen when exposed to Epstein Bar Virus (EBV).

Materials and Methods

In an experimental study, the mononuclear cells of 3 patients were isolated by Ficol and mixed with EBV. The transformed cells were cultured in RPMI medium containing cyclosporine. After 2-3 weeks, the formation of clones in the wells was checked and the hemagglutination test was performed for the wells containing the growing cells; the total amount of antibody in positive wells was measured by ELISA method.

Results

Exposure of mononuclear cells of patients with EBV led to cell transformation and creation of clones in some wells. The results of hemagglutination and ELISA methods showed that the clones were able to produce antibodies against the RhE antigen.

Conclusions

Anti-E antibody-producing lymphoblastoid cell line can be created by using sensitized cells of thalassemia patients against RhE antigen and its immortalization by EBV transformation method.

Key words: Antibodies, Thalassemia, Alloimmunization, EBV

Received: 18 Jun 2022
Accepted: 27 Aug 2022

Correspondence: Milani S., PhD of Medical Biotechnology. Blood Transfusion Research Center, High Institute for Research and Education in Transfusion Medicine.
P.O.Box: 14665-369, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88993778; Fax: (+9821) 88993778
E-mail: *s.milani@tmi.ac.ir*

[Downloaded from bloodjournal.ir on 2026-11-24]