مقاله پژوهشی

جداسازی زیرگروه B-1 لنفوسیت های B از خون بند ناف انسان

نویسندگان:

جواد سنچولی*[1]، نریمان مصفا[2]، عزیز شهرکی واحد[3]، غلامحسین فرجاه[4]

۱- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران
۲- گروه ایمونولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- گروه پرستاری، دانشکده پرستاری و مامایی دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران
۴- گروه آناتومی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 11, No. 1, Spring 2013

چکیده:

مقدمه: لنفوسیت های B1 با دارا بودن عرضه بالایی از مارکر CD5، توانایی تمایز و تغییر شکل به سلول‌های شبه ماکروفاژی تحت عنوان سلول‌های B-1 را دارند. هدف از انجام این مطالعه، امکان جداسازی و تخلیص این رده منحصر به فرد از تشکیلات سلولی خون بند ناف می‌باشد.

روش کار: ۱۴ نمونه بند ناف نوزادان سالم از زایمان طبیعی یا سزارین انتخابی مورد استفاده قرار گرفتند. با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ و یا ژلاتین ۳٪ گلبول‌های سفید از گلبول‌های قرمز تفکیک شدند. کشت سلولی برای جدا سازی سلول‌های چسبنده از غیر چسبنده انجام شد. رده های سلولی لنفوسیتی خون بند ناف از محتویات باقی مانده لکوسیتی با استفاده از گرادیان غلظتی ماده فایکول و سانتریفوژ جداسازی شدند. به منظور ارزیابی مرحله تخلیص از آزمایش روزت لنفوسیتی استفاده شد.

یافته‌ها: با وجود عدم تفاوت بین شمارش سلولی در دو ماده رقیق سازی خون، میزان حیات سلول‌ها در روش هیدروکسی اتیل استارچ پایین‌تر از ۸۷٪ است، در حالی که در روش رقیق سازی به کمک ژلاتین ۳٪ فعالیت حیاتی سلول‌ها بین ۹۰-۹۵٪ محاسبه شد. نتایج آزمایش روزت لنفوسیتی نشان می‌دهد که میزان خالص سازی سلول‌های B-1 با روش فوق به میزان تقریبی ۹۹٪ است.

نتیجه گیری: این فرایند نشان می‌دهد بیش‌تر سلول‌های B استخراج شده از خون بند ناف انسان از نوع سلول‌های B-1 می‌باشند و فرآیند ژلاتین ۳٪ بهترین و مناسب‌ترین روش با در نظر گرفتن تعداد و میزان حیات سلول‌ها است.

واژگان کلیدی: لنفوسیت های B، خون، ماکروفاژ

J Jahrom Univ Med Sci 2013; 11(1): 33-40

مقدمه:

کشف اعجاب برانگیز سلول B-1 مشتق شده از فاگوسیت تک هسته‌ای (B-1-derived mononuclear phagocyte) BDMP یکی از بحث برانگیزترین موضوعات مرتبط با ایمنی طبیعی و غیر اختصاصی در سال‌های اخیر می‌باشد [۱].

سلول‌های B-1 زیر مجموعه ای از لنفوسیت های B هستند که در یک حالت مستقل گسترش می‌یابند. این سلول‌ها از سلول‌های ریشه ای سازنده خون (مشتق شده از کبد جنینی) ایجاد می‌شوند. تعداد زیادی از سلول‌های B-1، مولکول CD5 را بیان می‌کنند [۴-۲].

گروهی از محققین با مطالعه مارکرهای سطحی فنوتایپیک این سلول‌ها پی بردند که با سلول‌هایی با ساختار دوگانه روبرو هستند [۵]. این سلول‌ها حاصل تحول و تکامل و فراتر از آن تغییر شکل شدید می‌باشند که در جمعیت جوندگان با مهاجرت به فضای صفاق و پرده جنب می‌توانند یکی از اصلی‌ترین سازوکارهای دفاع ذاتی را در چنین فضای پر رفت و آمد و مهمی به اجرا در آورند. در انسان الگویی از این گسترش

* نویسنده مسئول، نشانی: زابل، دانشگاه علوم پزشکی زابل، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی، جواد سنچولی
تلفن تماس: ۰۹۳۶۸۵۶۳۹۱۵ پست الکترونیک: sanchoolijavad@gmail.com
دریافت: ۱۳۹۰/۰۶/۰۳ اصلاح: ۱۳۹۱/۰۷/۲۶ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۸/۰۷

پیش بینی می‌شود، ولی دست یابی به مسیر گسترش این سیستم و راه یابی به مکان نهایی مهاجرت یعنی فضای صفاق عملی نیست. این سلول ها در عملکرد به شدت بیگانه خوارند، در تولید و ترشح فاکتورهای التهابی و اگزودای بافتی توانمندند، دارای قدرت انجام مسیر سیکلواکسیژناز-۱ هستند و به خوبی قابلیت پاسخ دهی به سیتوکاین های پیش التهابی و التهاب زایی مانند گاما اینترفرون را دارند [۶-۷].

حضور مجموعه گسترده ای از این سلول‌ها در موش ها ثابت شده است. با کشت طولانی مدت این سلول‌ها، فعالیت‌های شبه ماکروفاژی آن‌ها نیز روشن شده است [۸].

در بزرگسالان، تعداد بسیاری از سلول‌های B-1 به عنوان یک جمعیت خود تجدید شونده در صفاق و بافت‌های مخاطی یافت می‌شوند. سلول‌های B-1 زودتر از سلول‌های Bصلاحیت دار ایجاد و گسترش می‌یابند. این سلول‌ها گنجینهٔ نسبتاً محدودی از ژن‌های V را بیان می‌کنند و تنوع اتصالی خیلی کم‌تری نسبت به سلول‌های لنفوسیت B2 صلاحیت دار عرضه می‌کنند. سلول‌های B-1 به طور خود به خودی آنتی بادی‌های IgM را ترشح می‌کنند که اغلب با پلی ساکاریدهای میکروبی و لیپیدها واکنش می‌دهند. همچنین یک منبع سریع تولید آنتی بادی را بر ضد میکروب‌ها در جایگاه های اختصاصی مثل صفاق ایجاد می‌کنند. مطالعات نشان می‌دهند که این سلول‌ها در مکان‌های مخاطی ممکن است به نیمی از سلول‌های ترشح کنندهٔ آنتی بادی از کلاس IgA در بافت مخاطی تمایز یابند و همچنین حاوی ذخیره گیرنده آنتی بادی محدودی هستند که پاسخ‌های ایمنی زودرسی را ایجاد می‌کنند [۲،۶].

در سال ۱۹۸۹، فدریکوکالیگاریس و همکاران گزارش دادند که نسبت قابل توجهی از لنفوسیت های B انسانی با مارکر CD5 در خون بند ناف حضور دارند. تشابه های عملکردی این لنفوسیت ها با گروه مشابه در نمونه های موشی به اثبات رسیده است. به علاوه این سلول‌ها در روند تولید آنتی بادی‌های طبیعی فعال می‌باشند. سلول‌های B-1 قابل تکثیر نیز می‌باشند و می‌توانند در شرایط ویژه به حفره های صفاق و توراکس مهاجرت کرده و بخش عظیمی از دفاع طبیعی را فراهم سازند. اینترلوکین های ۴ (IL-4) وسیتوکاین های رشد دهنده سلول‌های B در روند فعال سازی این دسته های سلولی نقش دارند [۱،۳،۹].

تحقیقات در مورد عملکرد سلول‌های B-1 نشان می‌دهد که عمل انتقال پیام در تکامل آن‌ها نقش بسیار مهمی دارد. این سلول‌ها در تشکیل مرکز زاینده ناتوان هستند و یا شرکت نمی‌کنند. همچنین مشخص شده است که سلول‌های B-1 صفاق از نظر تولید آنتی بادی در خاموشی به سر برند، اما در طحال، مسئول تولید بیش از ۵۰٪ سلول‌های ترشح کننده آنتی بادی هستند [۱۰-۱۱].

قرار گرفتن سلول در محیط‌های کوچک حاوی برخی سایتوکاین ها تا حدی موجب تغییر ویژگی‌های ظاهری و عملکردی می‌شود که اطلاعات اندکی در مورد این تغییرات در محیط‌های غیر از حفره های بدن وجود دارد [۱۲].

تحقیقات نشان می‌دهند که خون بند ناف انسان حاوی پیش سازهای سلولی چسبنده ای به نسبت کم‌تر از مغز استخوان می‌باشد که ممکن است در مراحل متفاوت متمایز باشند [۱۳].

مطالعه حاضر با وجود اطلاع از عدم دست یابی به این سلول‌ها در انسان و با هدف بهره گیری از سلول‌های خون بند ناف نوزادان سالم متولد شده از مادران سالم و جوان به عنوان منبعی برای گسترش سلول‌های B-1 در محیط کشت سلولی رایج طراحی شد. هدف اصلی، جداسازی و تخلیص سلول‌های B-1 از مجموعه لنفوسیت های خون بند ناف انسان است.

روش کار:

در این پژوهش تجربی، ۱۴ نمونه خون بند ناف نوزادان سالم از زایمان طبیعی یا سزارین به صورت نمونه گیری تصادفی مورد استفاده قرار گرفتند. خون بند ناف به دو روش استاندارد زیر جمع آوری شدند.

الف- استفاده از کیت مخصوص بند ناف شامل کیسه خون گیری، لوله مدرج، فلاسک و کیسه یخ. کلیه مراحل خون گیری در اتاق زایمان و در شرایط استریل توسط کارکنان مؤسسه بانک خون بند ناف وابسته به پژوهشکده رویان انجام و کل مجموعه با حفظ شرایط استاندارد و در دمای ۲۲oC ±۴ به آزمایشگاه منتقل شد.

ب- جمع آوری خون در اتاق عمل از بند ناف نوزادان متولد شده با سزارین. برای این کار از قبل لوله های مخصوص جمع آوری خون به مقدار ۵۰ واحد بین‌المللی به ازای هر میلی لیتر خون با هپارین آغشته و سپس با هدایت انتهای قطع شده طناب بند ناف به طرف لوله، محتویات بند ناف به آهستگی تخلیه شد. مراحل فوق در اتاق سزارین بیمارستان پارسیان انجام شد.

لازم به توضیح است که پس از کسب رضایت کامل و انجام آزمایش‌های مربوط به سلامت شامل بررسی HIV,HBV,HCV، سیفلیس روی مادران اهدا کننده خون بند ناف، به عنوان واحد نمونه انتخاب شدند. معیار خروج از مطالعه، نتیجه مثبت آزمایش‌های HIV,HBV,HCV و سیفلیس در مادر بود.

تفکیک و حذف گلبول‌های قرمز از محتویات خون بند ناف: به منظور هرچه بهتر جداسازی گلبول‌های سفید خون بند ناف و اجتناب از حضور سلول‌های خونی قرمز جنینی از دو روش زیر استفاده شد:

الف- استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ : از گرادیان غلظتی هیدروکسی اتیل استارچ رقیق شده به میزان ۱۰٪ با PBS. این گرادیان غلظتی قادر به رسوب اکثر سلول‌های قرمز خونی بند ناف، به خصوص انواع هسته دار است. نمونه های خون به نسبت ۱ به ۵ با هیدروکسی اتیل استارچ مخلوط شد و پس از خاتمه انکوباسیون یک ساعته در دمای اتاق، پلاسمای غنی از لکوسیت توسط مکنده پلاستیکی و پیپت پاستور از محتویات بخش فوقانی لوله خارج و جمع آوری شد. این مجموعه حاوی کلیه لکوسیت های خون بند ناف است که پس از شمارش و تأیید میزان حیات به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰ سانتریفوژ و برای مرحله بعدی که جداسازی تک هسته ای ها می‌باشد نگهداری شدند.

ب- استفاده از ژلاتین ۳٪ : در این روش، نمونه های خون با محلول ژلاتین ۳٪ در سالین ۰/۹ ٪ به نسبت حجمی یک به یک مخلوط شده و در دمای اتاق و در زیر هود لامینار انکوبه شدند. سلول‌های قرمز خونی که به دلیل جوان و هسته دار بودن وزن مخصوص بالایی دارند، از لابه لای گرادیان ژلاتین عبور کرده، در حالی که گلبول‌های قرمز سنگین به دلیل نیروی ثقل افزایش یافته به کمک ژلاتین، ته نشین می‌شوند. پس از برداشت محتویات رویی، عمل سانتریفوژ به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۴۰۰ انجام شد. با شمارش سلول و تعیین میزان حیات، فرایند خالص سازی ادامه یافت. در این مرحله میزان حیات نباید از ۹۵٪ کم‌تر باشد.

جداسازی و تخلیص سلول‌های غیر چسبنده خون بند ناف: مرحله کشت سلولی برای جدا سازی سلول‌های چسبنده از قبیل سلول‌های فیبروبلاستوئیدی، سلول‌های استم مزانشیمال، سلول‌های اندوتلیالی جدار رگی، مونوسیت های موجود در گردش خون بند ناف و سایر سلول‌های چسبنده احتمالی می‌باشد. طول مدت انکوباسیون ۳ روز و در دمای ^{o}C ۳۷ با فشار ۵٪ گاز CO_2 و رطوبت اشباع در نظر گرفته شد. در طول این مدت سلول‌های مونوسیتی به کف فلاسک چسبیده و در نهایت خالص سازی سلول‌های چسبنده از غیر چسبنده انجام شد. درجه خلوص و حیات سلول‌ها (بالای۹۰٪) به کمک شمارش و رنگ آمیزی در مجاورت با تریپان بلو انجام پذیرفت. در انتها، سلول‌های غیر چسبنده در همان محیط کامل کشت سلول به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۲۵۰ سانتریفوژ شدند [۴].

تفکیک رده های لنفوسیتی خون بند ناف از محتویات باقی مانده لکوسیتی: مایع رویی کشت مرحله قبل که حاوی تک هسته ای ها و گرانولوسیت های خون بند ناف هستند، دوباره با حجم مناسب به حالت تعلیق درآمدند. در ابتدا تفکیک رده های سلولی با استفاده از گرادیان غلظتی مادهٔ فایکول (با وزن مولکولی ۱/۰۷۷) انجام گرفت. در حین عمل سانتریفوژ در دمای ^{o}C ۴، به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۴۰۰، لایه مخصوص تک هسته ای ها واقع در بخش فوقانی لایهٔ فایکول و منطقه تحتانی پلاسمای رقیق شده تشکیل شد. این لایه سلولی به کمک پیپت پاستور و مکندهٔ پلاستیکی با احتیاط برداشته شد. لایه مذکور حاوی لنفوسیت های T، لنفوسیت های B (اکثراً تحت گروه B-1) و سلول‌های NK می‌باشد. دوباره محتویات مخلوط و در دمای $^{\circ}C$ ۴، به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۲۵۰ سانتریفوژ شدند. باید توجه داشت که در جداسازی به این روش امکان وجود مقداری از گلبول‌های قرمز خون بند ناف وجود دارد. با این حال درجهٔ خلوص تک هسته ای ها در مجموعهٔ فوق نباید کم‌تر از ۷۰٪ باشد [۱۴].

تخلیص و جداسازی لنفوسیت های B از تک هسته ای های خون بند ناف: پس از برداشت تک‌هسته‌ای‌های خون بند ناف از لابه لای فایکول و محدودهٔ زیرین پلاسما ، شمارش سلول‌ها و تعیین میزان حیات انجام شد. برای دستیابی به سلول‌های لنفوسیت B از ستون‌های نایلون وول که در این مطالعه از ست تزریق خون تهیه شده بود استفاده شد. سوسپانسیون سلولی موجود در مقدار مناسب محیط کشت به کمک پیپت پاستور داخل ستون ریخته شد. ستون‌های پرشده با سلول در دمای ^{o}C ۳۷ (ترجیحاً بن ماری) انکوبه شدند. سپس با قرار دادن در دهانهٔ لولهٔ فالکون و باز نمودن مسیر خروجی ستون که قبلاً با مقدار کافی پارافیلم مسدود شده بود اقدام به خروج محتویات شد. دهانهٔ فوقانی ستون نیز آزاد شد تا به طور کامل سلول‌های غیر چسبنده تخلیه شوند. در ابتدا ستون‌های نایلون وول با حفظ دمای قبلی سه بار متوالی شستشو داده شدند. سلول‌های B که دارای مقداری گیرنده های لکتینی بوده و به نایلون وول اتصال می‌یابند در مرحله اول از ستون نایلون وول خارج نمی‌شوند و برای خروج آن‌ها به شوک سرما با محیط کشت یا RPMI سرد شده نیاز است [۲،۱۵]. با انجام عمل شوک سرمایی به کمک محیط کشت سرد (^{o}C ۴) شستشو دو بار تکرار شد تا لنفوسیت های B خارج شوند. سپس سلول‌ها در دور ۲۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ^{o}C ۴ سانتریفوژ شدند. از گلبول‌های قرمز گوسفند برای انجام آزمایش روزت لنفوسیتی به منظور ارزیابی مرحله تخلیص استفاده شد [۱۷-۱۶].

یافته‌ها:

هدف این تحقیق، تعیین یک روش کارآمد و معتبر برای تخلیص و جداسازی لنفوسیت های تحت گروه B-1 از جمعیت لنفوسیتی خون بند ناف بود. تخلیص گلبول‌های سفید با انجام دو تکنیک جداسازی (استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ و ژلاتین) مشخص کرد که روش رقیق سازی خون با گرادیان هیدروکسی اتیل استارچ با وجود سرعت بالا در ته نشین سازی گلبول‌های قرمز خون بند ناف موجب افت شدید حیات سلول‌ها می‌شود که در این پژوهش، روش ژلاتین ترجیح داده شد (جدول ۱).

با وجود عدم تفاوت بین شمارش سلولی در دو ماده رقیق سازی خون، میزان حیات سلول‌ها در روش هیدروکسی اتیل استارچ پایین‌تر از ۸۷٪ بود در حالی که در روش رقیق سازی به کمک ژلاتین ۳٪ فعالیت حیاتی سلول‌ها بین ۹۰-۹۵٪ محاسبه شد. روش اخذ خون از دو طریق استفاده از کیسه و هدایت لوله ای به کمک هپارین تأثیری در نتایج این مرحله نداشت.

مشاهدات نشان می‌دهند که طول مدت سه روز انکوباسیون و کشت سلول‌ها در شرایط استریل در فلاسک های مخصوص کشت سلول، قادر به حذف نسبتاً کاملی از سلول‌های چسبنده اولیه بوده است (تصویر ۱). تقریباً ۹۰٪ درصد از سلول‌ها در طی این مرحله کشت حذف و تهی سازی شدند.

جدا سازی لنفوسیت های موجود در سوسپانسیون شناور سلولی از رده های میلوئیدی لکوسیتی و سلول‌های ریشه ای هماتوپوئیتیک که احتمالاً همراه این مجموعه می‌باشند با کمک گرادیان فایکول انجام گرفت. یافته‌ها نشان می‌دهند که با وجود سنگینی بار گلبول‌های قرمز همراه لکوسیت ها، بخش مهمی از عمل خالص سازی صورت پذیرفته است (جدول ۱). خوشبختانه در این مرحله کم‌ترین افت میزان حیات سلولی مشاهده شد. لیکن در مطالعه گسترش سلولی همچنان همراهی گلبول‌های قرمز جنینی تا حدود ۱۰٪ وجود داشت.

آزمایش روزت لنفوسیتی در گلبول‌های قرمز خون گوسفند نشان داد که میانگین ۷۰٪ سلول‌های خروجی از نایلون وول مثبت بود که این امر نشان دهنده درستی انجام کار و جداسازی لنفوست های T است (تصویر ۲). برای سلول‌هایی که در اثر شوک سرمایی از ستون نایلون وول خارج شدند، آزمایش روزت لنفوسیتی انجام گرفت که نتیجه ۹۹٪ منفی شد.

بحث:

بررسی‌ها و مطالعات دانشمندان علوم بیولوژی و تکامل نشان داده است که با وجود تفاوت‌های عملکردی در اجرای سازوکار های ایمنی اختصاصی و دفاع ذاتی، در بسیاری از موارد منابع و ریشه های تکاملی این دو سیستم نه تنها تشابه فراوانی با یکدیگر دارند، بلکه از الگوهای یکسان نیز مشتق شده‌اند. این که سلول‌های اصلی در این دو سیستم دارای اجداد مشترک می‌باشند به اثبات رسیده است، ولی نکته جالب توجه، قدرت تحول و تبدیل اجزای سلولی این دو سیستم به یکدیگر است. یکی از بهترین نمونه‌ها در معرفی چنین تحولی، جمعیت لنفوسیت های B، به ویژه تحت گروه B-1 می‌باشد. این سلول‌ها با وجود ویژگی شگفت آوری که در تکامل دو سیستم دفاع ذاتی و اختصاصی از خود نشان می‌دهند، قابلیت تکامل فوق رویانی را در طی گسترش خونی و بافتی دارند. یکی از این پدیده‌ها، قدرت تغییر شکل تحت رده ای از آن‌ها به نام سلول‌های B-1b می‌باشد. شکل ویژه این سلول و تحولات عملکردی و ساختاری آن‌ها بر پیچیدگی‌شان افزوده و با وجود فهم بسیاری از سازوکار های مؤثر در ادامه این تحولات در جوندگان، هنوز نکاتی مبهم در سیر تکاملی و توسعه این تحت رده در انسان وجود دارد [۱۶].

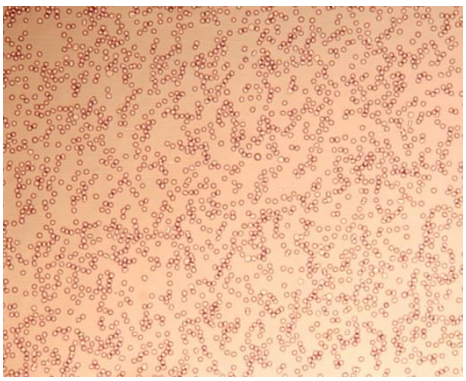
سیر تحولات مورفولوژیک سلول‌های B-1 در جوندگان کاملاً به اثبات رسیده است. منشأ اخذ نمونه و پرداختن به ماهیت عملکردی این سلول محوطه صفاق موش می‌باشد. بر اساس بررسی‌های انجام شده به خوبی قابلیت‌های وسیع فاگوسیتیک آن‌ها مشخص شده است [۱۸-۸،۱۷-۴،۷].

در انسان دست یابی به این جمعیت لنفوسیتی تقریباً امکان ناپذیر است. با وجود فهم سازوکارهای مشابه در انسان، هنوز هم نکات مبهمی در چگونگی گسترش این سلول وجود دارد. خون بند ناف نوزادان سالم یکی از منابع بسیار مهم و در عین حال منحصر به فرد این سلول‌ها است، ولی تعداد آن‌ها بسیار ناکافی است. بخش اعظم جمعیت B لنفوسیتی خون بند ناف (حدود ۹۰٪) از نوع B-1 می‌باشد [۲۲-۱۹].

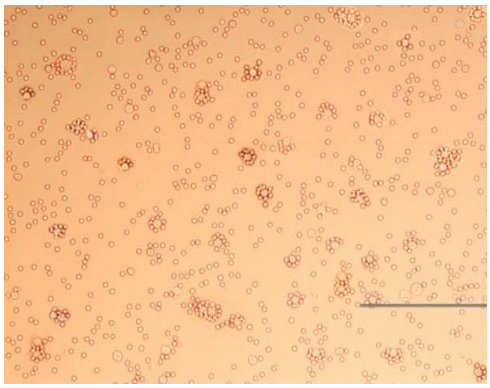
خون بند ناف نوزادان سالم کاربرد بسیاری در پزشکی نوین پیدا کرده است و به عنوان یک منبع قابل توجه از پیش سازهای هماتوپوئیتیک در درمان بسیاری از اختلالات مادرزادی و بیماری‌های بدخیم استفاده می‌شود. یکی از مهم‌ترین ارجحیت‌های بند ناف نسبت به مغز استخوان، کاهش وقایع ایمونوپاتولوژیک در پس زدن پیوند است. با وجودی که تهیه سلول‌های B-1 از بند ناف و نگهداری آن‌ها آسان است، ولی محتوای سلولی کم‌تری نسبت به مغز استخوان دارند. روش‌های بسیاری برای تقویت و تکثیر سلول‌های خون بند ناف وجود دارد تا به کمک آن‌ها جمعیت سلولی هدف تقویت و به میزان لازم مورد بهره گیری قرار گیرد [۱۹، ۲۰].

جدول ۱: شمارش سلول‌ها در مراحل مختلف جداسازی و کشت

شماره نمونه	حجم نمونه	شمارش اولیه سلول‌ها بعد از حذف گلبول‌های قرمز به کمک ژلاتین و هیدروکسی متیل استارچ	تعداد تک هسته‌ای-ها پس از حذف سلول‌های چسبنده	تعداد سلول‌های تک هسته ای بعد از گرادیان فایکول	تعداد لنفوسیت-های B بعد از نایلون وول
۱	15ml	۱۵/۱×۱۰^۶ ژلاتین	۶/۵×۱۰^۶	۴×۱۰^۶	۳/۲×۱۰^۶
۲	115ml	۴۸×۱۰^۶ ژلاتین	۳۰/۱×۱۰^۶	۲۲×۱۰^۶	۲۰/۱×۱۰^۶
۳	45ml	۱۴/۷×۱۰۶ ژلاتین	۹×۱۰^۶	۷/۲×۱۰^۶	۴×۱۰^۶
۴	50ml	۱۷/۷×۱۰۶ ژلاتین	۶/۱×۱۰^۶	۵/۲×۱۰^۶	۴/۷×۱۰^۶
۵	50ml	۲۷×۱۰۶ ژلاتین	۱۰×۱۰^۶	۷×۱۰^۶	۵/۴۵×۱۰^۶
۶	49ml	۱۸×۱۰۶ ژلاتین	۷×۱۰^۶	۵×۱۰^۶	۴/۲۵×۱۰^۶
۷	5ml	۱۷/۸۶×۱۰۶ ژلاتین	۴×۱۰^۶	۱/۵×۱۰^۶	۷۵۰×۱۰^۶
۸	35ml	۸۲/۵×۱۰^۶ هیدروکسی اتیل استارچ	۳۵×۱۰^۶	۱۹/۵×۱۰^۶	۸/۵×۱۰^۶
۹	16ml	۲۹×۱۰^۶ ژلاتین	۱۵/۷۸×۱۰^۶	۷/۵×۱۰^۶	۱۰/۰۴×۱۰^۶
۱۰	23ml	۸۱×۱۰^۶ ژلاتین	۳۹×۱۰^۶	۱۸×۱۰^۶	۳/۲۲×۱۰^۶
۱۱	25ml	۱۴۴/۵×۱۰^۶ هیدروکسی اتیل استارچ	۶۱/۶×۱۰^۶	۳۳/۷۶×۱۰^۶	۱۲/۲×۱۰^۶
۱۲	22ml	75.32×10^6 ژلاتین	۶۵×۱۰^۶	۳۱/۶×۱۰^۶	۲۱/۶×۱۰^۶
۱۳	8ml	22.4×10^6 ژلاتین	۱۱/۳×۱۰^۶	۸×۱۰^۶	۱/۶×۱۰^۶
۱۴	20ml	140×10^6 هیدروکسی اتیل استارچ	۹۷/۵×۱۰^۶	۳۵×۱۰^۶	۲۴×۱۰^۶



تصویر ۱: روزت لنفوسیتی با روش اصلاح شده برای افزایش دقت لنفوسیت های حاصل از مرحله تهی سازی، سلول‌های B که واکنشی با گلبول‌های قرمز گوسفند (s-RBC) نشان نمی‌دهند. اکثر سلول‌ها از نظر تشکیل روزت منفی می‌باشند (درشت نمایی 40×).



تصویر ۲: روزت لنفوسیتی با روش اصلاح شده برای افزایش دقت لنفوسیت های حاصل از مرحله تهی سازی، سلول‌های T که واکنش بسیار شدیدی با گلبول‌های قرمز گوسفند (s-RBC) نشان می‌دهند. اکثر سلول‌ها از نظر تشکیل روزت مثبت می‌باشند (درشت نمایی 40×).

بسیاری از محققین که اخذ سلول‌های بنیادی از منابع خون بند ناف، مغز استخوان و بافت چربی را مورد مقایسه و مطالعه قرار داده‌اند در نهایت خون بند ناف را به عنوان یک منبع خوب و ایده آل برای اهداف درمانی پیشنهاد کرده‌اند [۲۲-۲۱].

با وجودی که هدف اکثر پژوهش‌های سلولی و مولکولی روی خون بند ناف مرتبط با جنبه های درمانی آن است، ولی پرداختن به عملکرد سلول‌های صلاحیت دار ایمنی موجود در این مجموعه کم‌تر مورد توجه قرار گرفته است. هرچه قدر تمایز سلول‌های بنیادی به سمت رده های خون ساز بیش‌تر باشد، خطر عرضه این شاخص سازگاری و رد پیوند بیش‌تر می‌شود. [۲۱].

مطالعه حاضر، وجود یک ناهمگونی در شمارش تعداد رده های لنفوسیتی در نمونه های مختلف نشان داد. با این حال، نمونه های مختلف خون بند ناف از نظر تعداد سلول با یکدیگر متفاوتند. به خصوص جمعیت لنفوسیت B1 بالاتر از مقادیری است که مقالات و مراجع نشان می‌دهند [۲۲-۲۱].

برخی منابع به کمک بافر مخصوص لیزکنندهٔ گلبول قرمز و یا آب مقطر با غلظت‌های متوالی ۰/۲٪، ۱/۶٪ اقدام به حذف این مقدار گلبول قرمز می‌کنند، ولی بر اساس تجربیات قبلی، این روش‌ها موجب افت حیات سلول‌ها می‌شود. در مطالعه حاضر سعی شد تا با آسپیراسیون دقیق لایهٔ تک هسته ای ها از روی فایکول گلبول‌های قرمز تا حد امکان جدا سازی شوند. با این حال درجهٔ خلوص تک هسته ای ها در مجموعهٔ فوق نباید کمتر از ۷۰٪ باشد [۱۳،۲۰].

از طرفی چون سلول‌های B هنوز دارای اندک مقداری گیرنده های لکتینی بوده و به نایلون وول اتصال می‌یابند در مرحله اول از ستون نایلون وول خارج نمی‌شوند و برای خروج این سلول‌ها نیازمند شوک سرمایی با محیط کشت یا RPMI سرد شده است. گیرنده های لکتینی این سلول‌ها بسیار زیاد بوده و اتصال محکمی با نایلون وول پیدا خواهند کرد که به واسطه شوک سرمایی خارج نخواهند شد [۱۵، ۲].

در این مطالعه، به منظور تخلیص سلول‌های لنفوسیت B با کمک گرادیان غلظتی، از دو روش پرکول و نایلون وول استفاده شد. در روش پرکول به دلیل مقاومت همراهی گلبول‌های قرمز جنینی موجب توده ای شدن و عدم خالص سازی لنفوسیت ها می‌شود، به طوری که تعداد بسیار کمی از لنفوسیت ها موفق به عبور از این مرحله می‌شوند و امکان تخلیص لنفوسیت B که جمعیت اندکی از کل لنفوسیت های خون بند ناف هستند فراهم نمی‌آید. درحالی‌که روش نایلون وول با وجود قدیمی‌تر بودن به عنوان یک روش به نسبت کارآمد برای تفکیک سلول‌های T, B خون بند ناف انسان می‌باشد. شمارش سلولی در بعد از این مرحله گویای کارآمدی این روش است. در این پژوهش سعی شد تا یک روش بهینه و کارآمد برای استخراج و جداسازی لنفوسیت های B1 از خون بند ناف انسانی با حفظ حیات و مورفولوژی سلولی معرفی شود. نتایج به دست آمده در مراحل مختلف این فرایند آزمایشگاهی، موفقیت در استخراج و تخلیص این سلول را از منبع انسانی به خوبی نشان می‌دهد. سلول‌های B1 که در مرحله نهایی از نایلون وول استخراج شدند و به واسطه آزمایش روزت اثبات شدند در واقع سلول‌های بنیادی از دسته B1 هستند که امکان استفاده از آن‌ها برای مصارف درمانی و تحقیقاتی بسیاری وجود دارد.

تقدیر و تشکر: بدین وسیله پژوهشگران مراتب سپاس خود را از عزیزانی که انجام این تحقیق بدون مساعدت آن‌ها ممکن نبوده است اعلام می‌دارند.

References:

1. Subramaniam KS, Datta K, Quintero E, et al. The absence of serum IgM enhances the susceptibility of mice to pulmonary challenge with Cryptococcus neoformans. J Immunol 2010; 184(10): 5755-67.
2. Abbas AK, Lichman AH, Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Saunders; 2012: 75-137.
3. Pishdadian A, Varasteh AR, Sankian M. Type 2 innate lymphoid cells: friends or foes-role in airway allergic inflammation and asthma. J Allergy (Cairo). 2012; 2012:130937.
4. Popi AF, Osuguii L, Perez KR, et al. Could a B-1 Cell Derived Phagocyte ''Be One'' of the Peritoneal Macrophages during LPS-Driven Inflammation? PLoS One 2012; 7(3):13-6.
5. Reynaud CA, Weill JC. Gene profiling of $CD11b^{+}$ and $CD11b^{-}$ B1 cell subsets reveals potential cell sorting artifacts. J Exp Med 2012; 209(3): 433-6.
6. Baumgarth N. The double life of a B-1 cell: self-reactivity selects for protective effector functions. Nat Rev Immunol 2011; 11(1): 34–46.
7. Griffin DO, Rothstein TL. Human "orchestrator" CD11b(+) B1 cells spontaneously secrete interleukin-10 and regulate T-cell activity. Mol Med 2012; 18(9): 1003-8.
8. Koide N, Sugiyama T, Mori I, et al. Change of mouse cd5+ b1 cells to a macrophage-like morphology induced by gamma interferon and inhibited by interleukin-4. Clin Diagn Lab Immunol 2002; 9(6): 1169-74.
9. Caligaris-Cappio F, Gobbi M, Bofill M, et al. Infrequent normal B lymphocyte express features of B-Chronic Lymphocyte Leukemia. J Exp Med 1982; 155(2): 623-8.
10. Stall AM, Wells SM, Lam KP. B-1 cells: unique origins and functions. Semin Immunol 1996; 8(1): 45–59.
11. Jellusova J, Düber S, Gückel E, et al. Siglec-G regulates B1 cell survival and selection. J Immunol 1996; 8(1): 45-59.
12. Borrello M.A, Phipps RP. Fibroblast-Secreted Macrophage Colony-Stimulating Factor Is Responsible for Generation of Biphenotypic B/Macrophage Cells from a Subset of Mouse B Lymphocytes. J of Immunol 1999; 163(7): 3605–11.
13. Alfonso ZZC, Forneck ED, Allebrandt WF, et al. Establishment of an adherent cell layer from human umbilical cord blood. Gen Mol Biol 2000; 23(3): 519-22.
14. Griffin DO, Holodick NE, Rothstein TL. Human B1 cells in umbilical cord and adult peripheral blood express the novel phenotype CD20+CD27+CD43+CD70. J Exp Med 2011; 208(1): 67-80.
15. Roit I, Male D. Immunology. 6th ed. Maryland: Mosby; 2011.
16. Steiner LA, Danilova N, Willett CE. The immune system in zebrafish. In: Alt FW, Honjo T, Neuberger MS. Molecular biology of B cells. 3rd ed. London: Elsevier Acad Press; 2004.
17. Ghosn EEB, Russo M, Almeida SR. Nitric oxide-dependent killing of Cryptococcus neoformans by B-1-derived mononuclear phagocyte. J Leukoc Biol 2006; 80(1): 36–44.
18. Li J, Barreda DR, Zhang Y, et al. B lymphocytes from early vertebrates have potent phagocytic and microbicidal abilities. Nat Immunol 2006; 7(10): 1116-24.
19. Bleback K, Kern S, Kluter H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cell from UBC. Stem Cells 2004; 22(4): 625-34.
20. Kern S, Eichler H, Stoeve J, et al. Comparative analysis of MSC from bone marrow/umbilical cord blood or adipose tissue. Stem Cells 2006; 24(5): 1294-301.
21. Haddad R, Guardiola P, Izac B, et al. Molecular characterization of early human T/NK and B-lymphoid progenitor cells in umbilical cord blood. Blood 2004; 104(13): 3918-26.
22. Chivu AM, Diaconu AC, Bleotu AC, et al. The comparison of different protocols for expansion of umbilical-cord blood hematopoietic stem cells. J Cell Mol Med 2004; 8(2): 223-31.

Original Article

Isolation of B-1 subtype B lymphocytes from human cord blood

Sanchooli J[*1], Mosafa N[2], Shahraki Vahed A[3], Farjah Gh[4]

Received: 08/25/2011 Revised: 10/17/2012 Accepted: 10/28/2012

1. Dept. of Immunology, School of Medicine, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran
2. Dept. of Immunology, School of Medicine, Shahid beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Dept. of Nursing, School of Nursing and Midwifery, Zabol University of Medical Sciences, Zabol, Iran
4. Dept. of Anatomy, School of Medicine, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran

Journal of Jahrom University of Medical Sciences, Vol. 11, No. 1, Spring 2013

J Jahrom Univ Med Sci 2013; 11(1): 33-40

Abstract:

Introduction:

B1 lymphocytes by having a large supply of CD5 as a marker have the capability of cell differentiation and distinguishing them into cells similar to macrophages B1 Cell. The aim of the study is to determine the possibility of separation and purification of this unique category from other cellular organizations of cord blood lymphocytes.

Materials and Methods:

14 samples of the umbilical cord blood from normal delivery or elective cesarean were used. Dilutions of cells to purified circulating Leukocytes by the use of hydroxyl ethyl starch or 3% gelatin have been made and WBC was separated from RBC. In order to separate adhesive or non-adhesve cells, cell culture was done. By gradient ficoll and centrifuge, lymphocyte cells of the umbilical cord from the remaining leukocytes and mononuclear cells were purified and they were extracted from B lymphocytes by nylon wool columns. And rosette test was used for testing the extracted cells.

Results:

In spite of lack of difference between cellular counts in the two blood dilution materials, the amount of cellular survival showed to be lower than 87% in hydroxyl ethyl starch method while in the dilution method with gelatin 3%, the cellular life was about 90-95%. The results of Rosette test showed that dilution amount of B1 cells by the above method was about 99%.

Conclusion:

This process reveals that most of B cells extracted from cord blood are the of B1 cell type and the best and most suitable technique is gelatin 3% procedure with regard to the number and amount of cellular's life.

Keywords: B lymphocytes, Blood, Macrophage

* Corresponding author, Email: sistani_z@yahoo.com