

جداسازی زیر گروه B-1 لنفوسیت های B از خون بند ناف انسان

نویسندگان:

جواد سنجولی^{*}، نریمان مصفا^۲، عزیز شهرکی واحد^۳، غلامحسین فرجاه^۴

- 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 سلول های شبه ماکروفاژی تحت عنوان سلول های B-1 را دارند. هدف از انجام این مطالعه، امکان جداسازی و تخلیص این رده منحصر به فرد از تشکیلات سلولی خون بند ناف می باشد.

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٪ گلبول های سفید از گلبول های قرمز تفکیک شدند. کشت سلولی برای جدا سازی سلول های 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.

یافته ها: با وجود عدم تفاوت بین شمارش سلولی در دو ماده رقیق سازی خون، میزان حیات سلول ها در روش هیدروکسی اتیل استارچ پایین تر از ۸۷٪ است، در حالی که در روش رقیق سازی به کمک ژلاتین ۳٪ فعالیت حیاتی سلول ها بین ۹۰-۹۵٪ محاسبه شد. نتایج آزمایش روزت لنفوسیتی نشان می دهد که میزان خالص سازی سلول های B-1 با روش فوق به میزان تقریبی ۹۹٪ است.

نتیجه گیری: این فرایند نشان می دهد بیش تر سلول های B استخراج شده از خون بند ناف انسان از نوع سلول های B-1 می باشند و فرایند ژلاتین ۳٪ بهترین و مناسب ترین روش با در نظر گرفتن تعداد و میزان حیات سلول ها است.

واژگان کلیدی: لنفوسیت های B، خون، ماکروفاژ

J Jahrom Univ Med Sci 2013; 10(4):33-40

مقدمه:

کشف اعجاب برانگیز سلول B-1 مشتق شده از فاگوسیت تک هسته ای (B-1-derived mononuclear phagocyte) BDMP یکی از بحث برانگیزترین موضوعات مرتبط با ایمنی طبیعی و غیر اختصاصی در سال های اخیر می باشد [۱]. سلول های B-1 زیر مجموعه ای از لنفوسیت های B هستند که در یک حالت مستقل گسترش می یابند. این سلول ها از سلول های ریشه ای سازنده خون (مشتق شده از کبد جنینی)

ایجاد می شوند. تعداد زیادی از سلول های B-1، مولکول CD5 را بیان می کنند [۲-۴].

گروهی از محققین با مطالعه مارکرهای سطحی فنوتایپیک این سلول ها پی بردند که با سلول هایی با ساختار دوگانه روبرو هستند [۵]. این سلول ها حاصل تحول و تکامل و فراتر از آن تغییر شکل شدید می باشند که در جمعیت چونندگان با مهاجرت به فضای صفاق و پرده جنب می توانند یکی از اصلی ترین 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 سنجولی
 تلفن تماس: ۰۹۳۶۸۵۶۳۹۱۵ پست الکترونیک: sanchoolijavad@gmail.com

طحال، مسئول تولید بیش از ۵۰٪ سلول‌های ترشح کننده آنتی بادی هستند [۱۱-۱۰].

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 سازه‌های سلولی چسبیده 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 $22 \pm 4^{\circ}\text{C}$ 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.

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 خوانند، در تولید و ترشح فاکتورهای التهابی و آگزودای بافتی توانمندند، دارای قدرت انجام مسیر سیکلواکسیژناز-۱ هستند و به خوبی قابلیت پاسخ دهی به سایتوکاین های پیش التهابی و التهاب زایی مانند گاما اینترفرون را دارند [۷-۶].

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 B-2 صلاحیت دار ایجاد و گسترش می‌یابند. این سلول‌ها گنجینه 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 کننده 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 [۶،۲].

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) و سایتوکاین های رشد دهنده سلول‌های B در روند فعال سازی این دسته های سلولی نقش دارند [۹،۳،۱].

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

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، پلاسما 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 فیروپلاستوئیدی، 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 °C ۳۷ با فشار ۵٪ گاز CO₂ 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 (بالای ۹۰٪) 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 ماده فایکول (با وزن مولکولی ۱۰۷۷) انجام گرفت. در حین عمل سانتریفوژ در دمای °C ۴، به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۴۰۰، لایه مخصوص تک هسته ای ها واقع در بخش فوقانی لایه فایکول و منطقه تحتانی پلاسما رقیق شده تشکیل شد. این لایه سلولی به کمک پیپت پاستور و مکنده 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 °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 درجه خلوص تک هسته ای ها در مجموعه 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 محدوده 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 پر شده با سلول در دمای °C ۳۷ (ترجیحاً بن ماری) انکوبه شدند. سپس با قرار دادن در دهانه لوله فالكون و باز نمودن مسیر خروجی ستون که قبلاً با مقدار کافی پارافیلیم مسدود شده بود اقدام به خروج محتویات شد. دهانه 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 (°C ۴) شستشو دو بار تکرار شد تا لنفوسیت های B خارج شوند. سپس سلول‌ها در دور ۲۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه در دمای °C ۴ سانتریفوژ شدند. از گلبول‌های قرمز گوسفند برای انجام آزمایش روزت لنفوسیتی به منظور ارزیابی مرحله تخلیص استفاده شد [۱۷-۱۶].

یافته‌ها:

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 شگفت‌آوری که در تکامل دو سیستم دفاع ذاتی و اختصاصی از خود نشان می‌دهند، قابلیت تکامل فوق‌روانی 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. مثلاً 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 [۱۸-۱۷، ۸، 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 پیش‌سازهای 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 پس‌زدن 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 بهره‌گیری قرار گیرد [۱۹، ۲۰].

هدف این تحقیق، تعیین یک روش کارآمد و معتبر برای تخلیص و جداسازی لنفوسیت‌های تحت‌گروه 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 رقیق‌سازی خون با گرادیان هیدروکسی اتیل استارچ با وجود سرعت بالا در ته‌نشین‌سازی 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 رقیق‌سازی خون، میزان حیات سلول‌ها در روش هیدروکسی اتیل استارچ پایین‌تر از ۸۷٪ بود در حالی که در روش رقیق‌سازی 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 هیپارین تأثیری در نتایج این مرحله نداشت.

مشاهدات نشان می‌دهند که طول مدت سه روز انکوباسیون و کشت سلول‌ها در شرایط استریل در فلاسک‌های 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 تهی‌سازی شدند.

جداسازی لنفوسیت‌های موجود در سوسپانسیون شناور سلولی از رده‌های 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 لکوسیت‌ها، بخش مهمی از عمل خالص‌سازی 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.

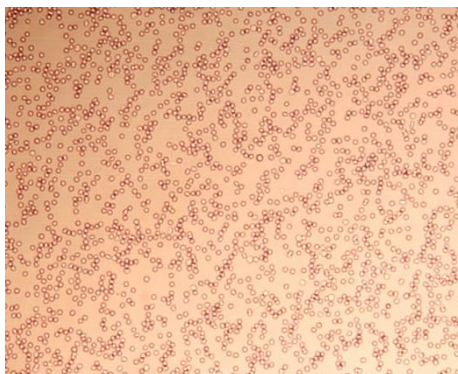
آزمایش روزت لنفوسیتی در گلبول‌های قرمز خون گوسفند نشان داد که میانگین ۷۰٪ سلول‌های خروجی از نایلون وول مثبت بود که این امر نشان‌دهنده درستی انجام کار و جداسازی لنفوسیت‌های T است (تصویر ۲). برای سلول‌هایی که در اثر شوک سرمایی از ستون نایلون وول خارج شدند، آزمایش روزت لنفوسیتی انجام گرفت که نتیجه ۹۹٪ منفی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

بحث:

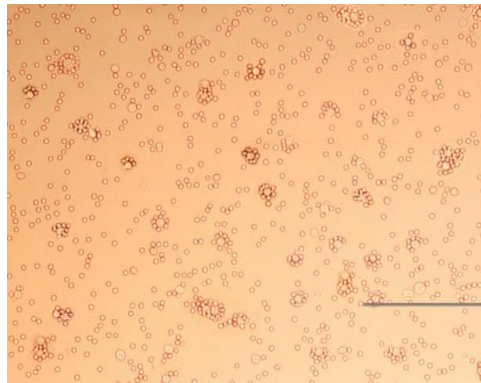
بررسی‌ها و مطالعات دانشمندان علوم بیولوژی و تکامل نشان داده است که با وجود تفاوت‌های عملکردی در اجرای سازوکار

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 چسبیده | تعداد سلول‌های تک هسته ای بعد از گردادیان فایکول | تعداد لنفوسیت - های B بعد از نایلون وول |
|-------------|-----------|--|---|--|---|
| ۱ | 15ml | $15/1 \times 10^6$ ژلاتین | $6/5 \times 10^6$ | 4×10^6 | $3/2 \times 10^6$ |
| ۲ | 115ml | 48×10^6 ژلاتین | $30/1 \times 10^6$ | 22×10^6 | $20/1 \times 10^6$ |
| ۳ | 45ml | $14/7 \times 10^6$ ژلاتین | 9×10^6 | $7/2 \times 10^6$ | 4×10^6 |
| ۴ | 50ml | $17/7 \times 10^6$ ژلاتین | $6/1 \times 10^6$ | $5/2 \times 10^6$ | $4/7 \times 10^6$ |
| ۵ | 50ml | 27×10^6 ژلاتین | 10×10^6 | 7×10^6 | $5/45 \times 10^6$ |
| ۶ | 49ml | 18×10^6 ژلاتین | 7×10^6 | 5×10^6 | $4/25 \times 10^6$ |
| ۷ | 5ml | $17/86 \times 10^6$ ژلاتین | 4×10^6 | $1/5 \times 10^6$ | 750×10^6 |
| ۸ | 35ml | $82/5 \times 10^6$ هیدروکسی اتیل استارچ | 35×10^6 | $19/5 \times 10^6$ | $8/5 \times 10^6$ |
| ۹ | 16ml | 29×10^6 ژلاتین | $15/78 \times 10^6$ | $7/5 \times 10^6$ | $10/04 \times 10^6$ |
| ۱۰ | 23ml | 81×10^6 ژلاتین | 39×10^6 | 18×10^6 | $3/22 \times 10^6$ |
| ۱۱ | 25ml | $144/5 \times 10^6$ هیدروکسی اتیل استارچ | $61/6 \times 10^6$ | $33/76 \times 10^6$ | $12/2 \times 10^6$ |
| ۱۲ | 22ml | 75.32×10^6 ژلاتین | 65×10^6 | $31/6 \times 10^6$ | $21/6 \times 10^6$ |
| ۱۳ | 8ml | 22.4×10^6 ژلاتین | $11/3 \times 10^6$ | 8×10^6 | $1/6 \times 10^6$ |
| ۱۴ | 20ml | 140×10^6 هیدروکسی اتیل استارچ | $97/5 \times 10^6$ | 35×10^6 | 24×10^6 |



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 $\times 40$).



تصویر ۲: روزت لنفوسیتی با روش اصلاح شده برای افزایش دقت لنفوسیت های حاصل از مرحله تهی سازی، سلول های T که واکنش بسیار شدیدی با گلبول های قرمز گوسفند (s-RBC) نشان می دهند. اکثر سلول ها از نظر تشکیل روزت مثبت می باشند (درشت نمایی 40×).

است. گیرنده های لکتینی این سلول ها بسیار زیاد بوده و اتصال محکمی با نایلون وول پیدا خواهند کرد که به واسطه شوک سرمایی خارج نخواهند شد [۲، ۱۵].

در این مطالعه، به منظور تخلیص سلول های لنفوسیت B با کمک گرادیان غلظتی، از دو روش پرکول و نایلون وول استفاده شد. در روش پرکول به دلیل مقاومت همراهی گلبول های قرمز جنینی موجب توده ای شدن و عدم خالص سازی لنفوسیت ها می شود، به طوری که تعداد بسیار کمی از لنفوسیت ها موفق به عبور از این مرحله می شوند و امکان تخلیص لنفوسیت B که جمعیت اندکی از کل لنفوسیت های خون بند ناف هستند فراهم نمی آید. درحالی که روش نایلون وول با وجود قدیمی تر بودن به عنوان یک روش به نسبت کارآمد برای تفکیک سلول های T، B خون بند ناف انسان می باشد. 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 می دهد. سلول های B1 که در مرحله نهایی از نایلون وول استخراج شدند و به واسطه آزمایش روزت اثبات شدند در واقع سلول های 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 می دارند.

بسیاری از محققین که اخذ سلول های بنیادی از منابع خون بند ناف، مغز استخوان و بافت چربی را مورد مقایسه و مطالعه قرار داده اند در نهایت خون بند ناف را به عنوان یک منبع خوب و ایده آل برای اهداف درمانی پیشنهاد کرده اند [۲۱-۲۲]. با وجودی که هدف اکثر پژوهش های سلولی و مولکولی روی خون بند ناف مرتبط با جنبه های درمانی آن است، ولی پرداختن به عملکرد سلول های صلاحیت دار ایمنی موجود در این مجموعه کم تر مورد توجه قرار گرفته است. هرچه قدر تمایز سلول های بنیادی به سمت رده های خون ساز بیش تر باشد، خطر عرضه این شاخص سازگاری و رد پیوند بیش تر می شود. [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 می دهند [۲۱-۲۲].

برخی منابع به کمک بافر مخصوص لیزکننده گلبول قرمز و یا آب مقطر با غلظت های متوالی ۰/۲٪، ۱/۶٪ اقدام به حذف این مقدار گلبول قرمز می کنند، ولی بر اساس تجربیات قبلی، این روش ها موجب افت حیات سلول ها می شود. در مطالعه حاضر سعی شد تا با اسپیراسیون دقیق لایه تک هسته ای ها از روی فایکول گلبول های قرمز تا حد امکان جدا سازی شوند. با این حال درجه خلوص تک هسته ای ها در مجموعه فوق نباید کمتر از ۷۰٪ باشد [۱۳، ۲۰].

از طرفی چون سلول های B هنوز دارای اندک مقداری گیرنده های لکتینی بوده و به نایلون وول اتصال می یابند در مرحله اول از ستون نایلون وول خارج نمی شوند و برای خروج این سلول ها نیازمند شوک سرمایی با محیط کشت یا RPMI سرد شده

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.

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

Sanchooli J^{*1}, Mosafa N², Shahraki Vahed A³, Farjah Gh⁴

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; 10(4):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-adhesive 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