

مقایسه روش های مختلف جداسازی مونسیت ها با روش جداسازی آن ها در

Magnetic Activated Cell Sorting

***بابک بیک زاده:** کارشناس ارشد ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (*نویسنده مسئول). bbeikzadeh@live.com
دکتر نوروز دلیرز: دانشیار ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
رضا حبیبیان: دانشجوی دکتری تخصصی ایمنی شناسی، گروه میکروب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۲

تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۲

چکیده

زمینه و هدف: خون محیطی، منبع اصلی از مونسیت ها برای بررسی بیولوژیکی و ایمنی شناسی می باشد، از این رو روش های جداسازی این سلول ها از اهمیت خاصی برخوردار است. این مطالعه با مقایسه چندین روش، روشی مناسب تر با کمترین آسیب و بیشترین میزان خلوص سلولی در مواردی که امکان استفاده از روش MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) وجود ندارد ارائه می دهد.

روش کار: روش هایی از جمله کوت کردن فلاسک ها با کیتوزان (۷)، ژلاتین (۸)، پلاسما (۲) و ژلاتین- پلاسما (۲) می باشند که از نظر میکروسکوپی و زمان مورد نیاز برای جداسازی (مقایسه بین روش های مذکور)، شمارش سلولی (۹)، زنده مانی (۹)، و بیان CD14 به عنوان نشانگر مونسیتی (۱۰) با روش MACS (۹) با استفاده از روش One-way ANOVA و آزمون Tukey مقایسه شد.

یافته ها: نتایج حاصل نشان داد که کمترین میزان شمارش سلولی مربوط به گروه شاهد و کیتوزان بوده و بیشترین مقدار مربوط به MACS و ژلاتین- پلاسما بود بر همین اساس بین روش های پلاسما، ژلاتین- پلاسما و MACS از نظر میزان زنده مانی تفاوتی مشاهده نشد و کمترین زمان لازم برای جداسازی مونسیت ها نیز مربوط به ژلاتین- پلاسما بود. همچنین مشخص شد که بیشترین میزان بیان CD14 و خلوص مونسیت ها مربوط به روش ژلاتین- پلاسما و MACS می باشد.

نتیجه گیری: از این رو می توان نتیجه گرفت که هرچند روش های ژلاتین و پلاسما هر کدام نسبت به شاهد عملکرد بهتری را در خالص سازی مونسیت ها نشان می دهند اما پوشش دادن ژلاتین با پلاسما درصد خلوص بالاتری نسبت به بقیه روش ها داشته و در مقایسه با MACS، می تواند روشی مناسب در کنار آن باشد.

کلیدواژه ها: مونسیت، کیتوزان، ژلاتین، پلاسما، ژلاتین- پلاسما، MACS.

مقدمه

دندرتیک التهابی تبدیلی می شوند که از مقدم ترین سلول ها در برخورد با عوامل بیگانه هستند (۲). مونسیت ها ۲۰-۱۰ درصد از سلولهای تک هسته ای خون محیطی را تشکیل داده و علاوه بر تمایز به سلول های ماکروفاژ و دندرتیک عملکرد پاکسازی و برداشت مولکول های توکسین و بیگانه، به عنوان یک سلول یاری دهنده به لنفوسیت های T و B عمل می کنند. از این رو برای درک بهتره عملکرد این سلول ها باید آن ها را از لنفوسیت ها و گرانولوسیت ها جدا کرد. خون محیطی به عنوان منبع اصلی این سلول ها به منظور مطالعه بر روی خصوصیات بیولوژیکی و ایمنی شناختی مونسیت ها می باشد (۳). با توجه به اهمیت این سلول ها در تحقیقات ایمنی شناسی، ویروس شناسی به ویژه در زمینه ویروس نقص سیستم ایمنی انسانی، از این رو روش

مونسیت ها عضوی از یک گروه متنوع سلولی به نام لوکوسیت ها می باشد. لوکوسیت ها در جریان خون و لنف با مهاجرت به مکان های آسیب دیده بافتی و یا عفونی به عنوان یک منبع در بهبود قسمت های آسیب دیده و یا حذف عوامل عفونی در شکل گیری یک پاسخ ایمنی شرکت می کنند (۱). پیش سازهای مونسیت ها، مونوبلاست ها و پرومونسیت ها می باشد که از ردهء میلوپیدی مغز و استخوان منشاء گرفته و در جریان خون تبدیل به مونسیت می شوند (۱). این سلول ها در خون، مغز استخوان و طحال حضور داشته و قابلیت تکثیر ندارند. در پاسخ های التهابی بدن به واسطه دارا بودن گیرنده های کموکاینی و مولکول های چسبنده با مهاجرت از خون به مکان های ملتهب، به ماکروفاژ و سلول های

EDTA (Sigma-آمریکا)، اسید استیک (Merck-آلمان)، BSA (Sigma-آمریکا)، فایکول هایپک (Sigma-آمریکا)، پلاسما اتولوگ و MACS (Miltenyi Biotec-آمریکا) می باشد. در ابتدا برای روش ها شامل: ۱- کوت کردن فلاسک با کیتوزان، ۲- کوت کردن فلاسک با پلاسما، ۳- کوت کردن فلاسک با ژلاتین، ۴- کوت کردن فلاسک با ژلاتین و پلاسما، از سه فرد داوطلب در رده سنی ۲۵ تا ۳۰ سال با توجه رضایت آگاهانه میزان ۱۰ml خون هیپارینه (۲۰۰ U/ml) اخذ می گردد. سپس سلولهای تک هسته ای خون محیطی را به روش PBMC جداسازی می گردد بدین منظور ابتدا خون هیپارینه با ۱۰ml محیط کشت RPMI-1640 رقیق می کنیم. خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده است اضافه شد. مجموع خون رقیق شده و فایکول با سرعت ۸۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلولهای تک هسته ای خون محیطی (Peripheral Blood Mononuclear Cell) PBMC که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده جمع می شوند به آرامی جمع آوری گردید. PBMC به دست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن، با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت ۴۵۰ RPMI-1640 به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلولهای حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت ۲۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. تعداد و میزان سلولهای تک هسته ای خون محیطی به دست آمده، با استفاده از رنگ تری پان بلو تعیین شد (۶). تعداد 1×10^7 سلول PBMC برای هر کدام از فلاسک T25 به همراه محیط کشت RPMI-1640، ۲mM L-گلوتامین، ۱۰۰U/ml پنی سیلین، ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین و سرم AB ۱۰٪ اضافه گردید و یک فلاسک هم به عنوان گروه شاهد در نظر گرفته شد. بعد از اتمام انکوباسیون (دو ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، CO_2 ۵٪ و ۹۰٪ رطوبت) مایع رویی که حاوی کلیه سلول های تک هسته ای بجز مونوسیت ها هستند با دو بار شستشوی آرام حذف خواهند شد. سپس به هر فلاسک

جداسازی این سلول ها یک نقش مهم در مطالعه بر روی جنبه های سلولی و عملکرد آنها دارد. روش های مختلفی برای جداسازی این سلول ارائه شده است که متداول ترین آنها جداسازی به روش MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) و plastic adherence می باشد. چسبندگی مونوسیت ها به سطوح پلی استیرن فلاسک های کشت سلولی یک مزیت است اما استفاده از روش های مکانیکی مثل Scraping و یا استفاده از آنزیم هایی همانند تریپسین برای جداسازی این سلول ها موجب آسیب های سلولی می شود که همراه با کاهش زنده مانده سلول است (۲). اما در روش MACS جداسازی مونوسیت ها متفاوت می باشد بگونه ای که سلول ها بوسیله نانو ذرات حاوی آهن متصل به آنتی بادی اختصاصی جدا می شوند. از مزایای آن می توان به خلوص و زنده مانده بالای این روش اشاره کرد اما هزینه بالای استفاده از آن و احتمال فعال شدن مسیرهای سیگنال دهی سلولی بدلیل اتصال آنتی بادی از معایبی می باشد که استفاده آن را محدود کرده است. از این رو تحقیقاتی در این زمینه صورت گرفته است که نتیجه آن ارائه روش هایی از جمله کوت کردن فلاسک ها با کیتوزان، ژلاتین، پلاسما و ژلاتین-پلاسما می باشد. که هر کدام از آن ها دارای معایب و مزایایی می باشد. از این رو با توجه به مطالب ذکر شده، این مطالعه با مقایسه روش های مذکور، روشی مناسب تر با کمترین میزان آسیب و بیشترین میزان خلوص سلولی در مواردی که امکان استفاده از روش MACS وجود ندارد ارائه می دهد. تا استفاده از آن رهگشای تحقیقات سلولی و ایمنی شناسی باشد.

روش کار

در این مطالعه مواد مورد استفاده شامل محیط کشت RPMI-1640 (Gibco-انگلستان) به همراه ۲mM L-گلوتامین (Sigma-آمریکا)، ۱۰۰U/ml پنی سیلین (Sigma-آمریکا)، ۱۰۰ μg/ml استرپتومایسین (Sigma-آمریکا) و سرم AB ۱۰٪ کیتوزان (Sigma-آمریکا)، ژلاتین پوست گاو (Sigma-آمریکا)، DPBS (Sigma-آمریکا)،

۵ ml از پلاسما اتولوگ به فلاسک های کوت شده توسط ژلاتین اضافه شد. سپس به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از طی این مرحله پلاسما تخلیه و فلاسک ها با DPBS شستشو داده شدند. فلاسک ها به مدت یک ماه قابل استفاده می باشند (۲).

خالص سازی مونوسیت ها به روش MACS ابتدا سلول های PBMC از خون محیطی جدا کرده و شمارش گردید. سلول ها را با سرعت $300 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را برداشته شد. با اضافه کردن $100 \mu l$ بافر (PBS-2mMEDTA-0/5%BSA) به ازای هر 10^7 سلول، سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سپس $10 \mu l$ از Microbead را به سلول ها اضافه گردید. سوسپانسیون را مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در دمای ۴-۸ درجه انکوبه گردید. با اضافه کردن ml ۲ بافر، سلول ها را با سرعت $300 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ستون جداسازی سلول را بر روی MACS stand نصب و با ml ۳ بافر شستشو داده شد. سوسپانسیون سلولی را به ستون اضافه گردید و سلول ها خارج شده در یک لوله جمع آوری شد. سپس با اضافه کردن ml ۳ بافر ستون را شستشو داده و از MACS stand جدا گردید. به منظور جداسازی سلول های داخل ستون، ستون به یک لوله استریل دیگر منتقل و با اضافه کردن ml ۳ بافر توسط پیستون از ستون جداسازی خارج گردید. سلول ها را با دور $400 \times g$ سانتریفیوژ و با استفاده از رنگ تری پان بلو تعداد و زنده مانی آن ها توسط لام هموسیتومتر بررسی شد (۹).

شمارش، زنده مانی و زمان: شمارش و درصد زنده مانی مونوسیت ها برای هر روش بعد از حذف مایع رویی و اضافه کردن بافر سرد (DPBS+EDTA) توسط تریپان بلو و لام هموسیتومتری تعیین گردید. همچنین مدت زمان لازم برای جداسازی سلول ها بعد از اضافه کردن بافر نیز برای روش های ۱-۴ تخمین زده شد (۹).

فلوسایتومتری: سلول های بدست آمده از هر

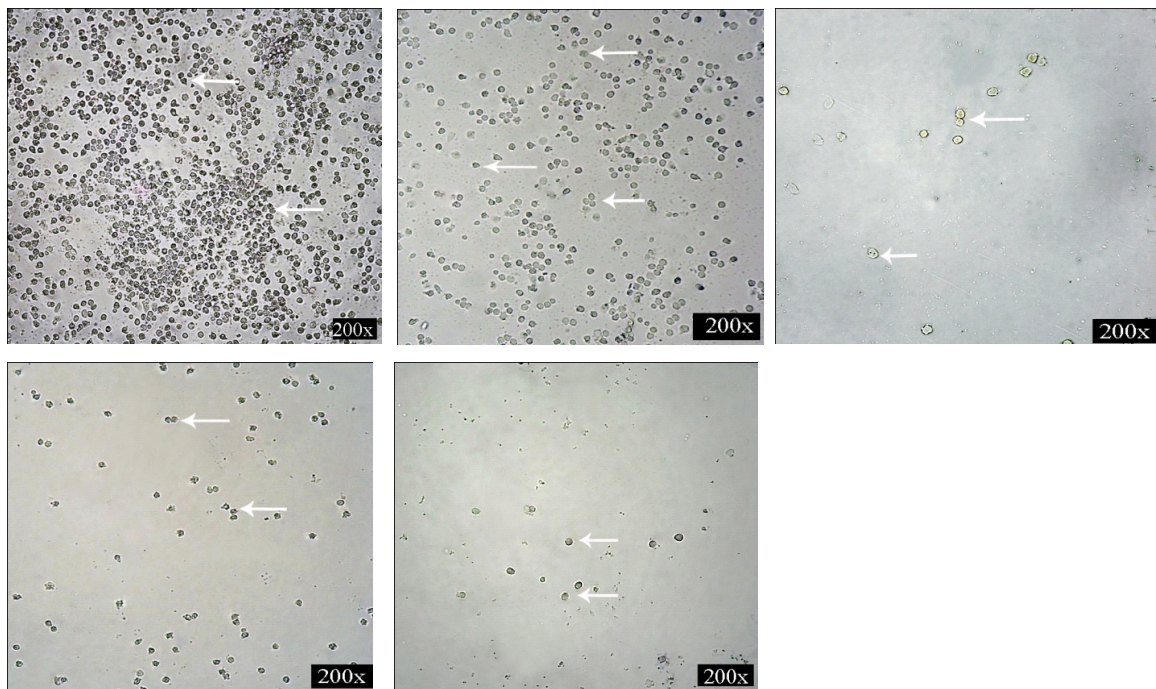
۵-۱۰ بافر سرد PBS بدون کلسیم و منیزیم به همراه EDTA (۱۰mM) اضافه و فلاسک ها را به مدت ۵-۱۰ دقیقه به آرامی تکان داده تا سلول ها جدا شوند و سلول های تخلیص شده را از نظر میکروسکوپی و مدت زمان لازم (مقایسه بین روش های ۱-۴)، شمارش سلولی، زنده مانی و میزان بیان CD14 که نشان دهنده خلوص مونوسیت ها است در کنار روش MACS مورد بررسی قرار گرفتند.

۱- کوت کردن فلاسک با کیتوزان: ۵ ml از محلول کیتوزان [15 mg/ml کیتوزان در اسید استیک (۱M)] را به هر کدام از فلاسک ها اضافه کرده. سپس فلاسک ها را به مدت ۲ روز در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد برای خشک شدن انکوبه گردید. در مرحله بعد برای خنثی کردن خاصیت اسیدی به هر فلاسک NaOH (۰/۱N) اضافه شد و بعد از ۱۵ دقیقه آن را با آب دیونیزه شستشو داده. قبل از اضافه کردن سلول ها، هر فلاسک را برای استریلیزاسیون به مدت یک شبانه روز در زیر اشعه UV قرار داده می شوند (۷).

۲- کوت کردن فلاسک با پلاسما: ۵ ml از پلاسما اتولوگ را به هر فلاسک اضافه کرده. فلاسک ها را به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد. سپس پلاسما را تخلیه گردید و به میزان ۱ ml از پلاسما در داخل فلاسک باقی گذاشته، سپس فلاسک را به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. قبل از استفاده یک بار فلاسک را با بافر PBS بدون کلسیم و منیزیم (DPBS) شستشو داده شد (۲).

۳- کوت کردن فلاسک با ژلاتین: ۵ ml از ژلاتین (۲٪ در آب دیونیزه) اتوکلاو کرده و بعد از هم دما شدن با محیط فلاسک اضافه کرده. فلاسک ها را به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس به میزان ۱ ml از ژلاتین را در داخل فلاسک نگه داشته و باقیمانده را تخلیه و به مدت یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای خشک شدن نگهداری شد. هر فلاسک به مدت یک ماه در این دما قابل نگهداری است (۸).

۴- کوت کردن فلاسک با ژلاتین و پلاسما: ابتدا



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی نشان دهنده میزان تراکم سلول‌های چسبنده پس از استفاده از بافر DPBS+EDTA در گروه‌های (a) شاهد، (b) کیتوزان، (c) پلاسما، (d) ژلاتین، (e) ژلاتین- پلاسما است. فلش‌های سفید رنگ نیز نشان دهنده میزان تراکم مونوسیت‌ها می‌باشد.

خاصیت چسبندگی خود به صورت شناور در آمده، به گونه‌ای که کمترین میزان جدا شدن سلول‌ها مربوط به گروه شاهد (فلاسک پلی استایرن) و بیشترین میزان کاهش تراکم سلولی متعلق به گروه ژلاتین- پلاسما و به همین ترتیب گروه‌های پلاسما، ژلاتین و کیتوزان بوده است. با در نظر گرفتن مشاهدات فوق مشخص گردید که پوشش دادن سطح فلاسک‌ها با ژلاتین- پلاسما نسبت به موارد مذکور بویژه گروه شاهد روند جدا شدن سلول‌های چسبنده (مونوسیت‌ها) را تسهیل می‌کند (شکل ۱).

شمارش، زنده مانی و زمان جداسازی سلول‌ها نتایج حاصل نشان داد که کمترین میزان شمارش سلولی مربوط به گروه کنترل و کیتوزان بوده و بیشترین مقدار مربوط به MACS و ژلاتین- پلاسما می‌باشد ($p=0/043$). مقادیر $40 \pm$ (12×10^4)، $132 \pm$ (43×10^4)، $80 \pm 10^4 \times$ (25)، $59 \pm$ (85×10^4) و $34 \pm$ (96×10^4) به ترتیب برای گروه‌های کیتوزان، پلاسما، ژلاتین، ژلاتین- پلاسما و MACS مشخص گردید. برای گروه کنترل این میزان $20 \pm$ (8×10^3) بوده است (نمودار ۱). همچنین میزان زنده مانی سلول‌های

گروه بعد از یک بار شستشو با بافر FACS، در همین بافر که حاوی سرم موش ۲٪ بود به مدت ۳۰ دقیقه در 4°C انکوبه شد. سپس پس از یک بار شستشو حجم بافر به $100 \mu\text{l}$ رسانده و به مقدار $10 \mu\text{l}$ از آنتی بادی ضد نشانگر سطحی CD14 کونژوگه با رنگ FITC (DAKO-Purified) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در 4°C انکوبه گردید. در پایان انکوباسیون، سلول‌ها را با بافر FACS شستشو داده و با دستگاه فلوسایتمتری Partec مورد آزمایش قرار داده و نتایج بدست آمده توسط نرم افزار Flow Max آنالیز گردید (۱۰).

آنالیز آماری: کلیه نتایج در این بخش حاصل سه بار تکرار می‌باشد و نتایج با برنامه SPSS ویراست ۱۸ بررسی شد. مقایسه بین گروه‌ها توسط One-way ANOVA و آزمون Tukey انجام و مقدار $p < 0/05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

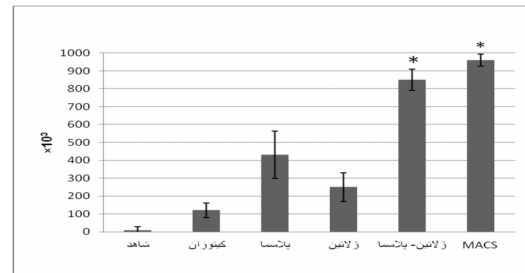
مشاهده میکروسکوپی: پس از اضافه کردن بافر سرد DPBS+EDTA به فلاسک‌های هر گروه (۴-۱)، سلول‌های چسبنده با از دست دادن

همین اساس بین گروه های پلاسما، ژلاتین-پلاسما و MACS از نظر میزان زنده مانی تفاوت معنی دار مشاهده نشد ($P=0/1$) و تنها در گروه کنترل، کیتوزان و ژلاتین در مقایسه با روش MACS این تفاوت به گونه ای که درصد زنده مانی کمتری داشته دیده شد ($P=0/028$) (نمودار ۲). نتایج مربوط به مدت زمان لازم برای جداسازی سلول های چسبنده اینگونه نشان داد که کمترین زمان لازم برای گروه ژلاتین-پلاسما ($10 \pm 1/23$ دقیقه) نسبت به گروه ژلاتین (29 ± 1 دقیقه)، پلاسما (15 ± 3 دقیقه)، کیتوزان (21 ± 1 دقیقه)، کنترل ($32 \pm 1/5$ دقیقه) بود ($P=0/032$) (نمودار ۳).

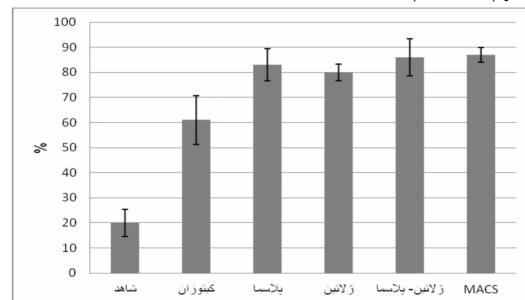
فلوسایتومتری: بررسی بیان CD14 در سلول ها
جدا شده نشان داد که بیشترین میزان بیان و خلوص مونوسیت ها مربوط به روش ژلاتین-پلاسما و MACS می باشد (شکل ۲ و نمودار ۴).

بحث و نتیجه گیری

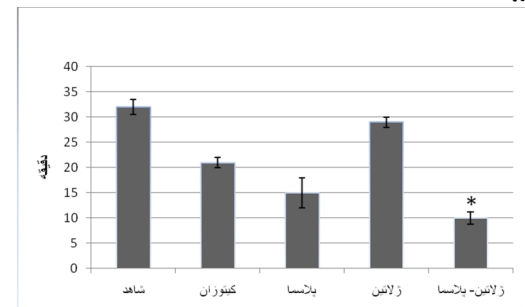
از آنجایی که مونوسیت ها و سلول های مشتق از آن (ماکروفاژها- سلول های دندریتیک) در تنظیم التهاب و ایمنی ذاتی نقش مهمی را دارا هستند از این رو مطالعه بر روی عملکرد این سلول ها و استفاده از آنها در تحقیقات ایمنی شناسی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۱). استفاده از این سلول ها به علت خاصیت چسبندگی با جنبه های مثبت و منفی در تحقیقات آزمایشگاهی همراه بوده. با تولید آنتی بادی های مونوکلونال و ابداع روش هایی مثل MACS به منظور جداسازی انواع مختلفی از سلول ها، بررسی و تحقیق بر روی این سلول ها را آسان کرده است. با این وجود در این مطالعه روشی با درصد خلوص و زنده مانی مشابه و کم هزینه در مقایسه با روش MACS معرفی گردید. که بر پایه استفاده از پروتئین های موجود در پلاسما یا سرم است. مهمترین نوع از پروتئین های پلاسما در این مطالعه فیبرینونکتین بوده که در ماتریکس خارجی سلول ها وجود دارد و بطور طبیعی با سلول های تک هسته ای و فاگوسیت کننده در ارتباط می باشد و عملکرد



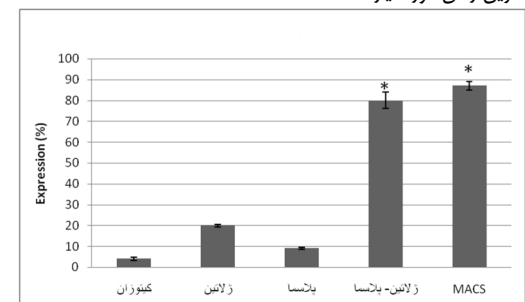
نمودار ۱- مقایسه شمارش سلولی انجام شده در گروه های شاهد، کیتوزان، پلاسما، ژلاتین، ژلاتین-پلاسما و MACS. (* نشان دهنده اختلاف معنی دار در گروه های ژلاتین-پلاسما و MACS نسبت به گروه های دیگر ($P=0/043$)).



نمودار ۲- درصد زنده مانی مونوسیت ها، مقایسه میزان زنده مانی مونوسیت های جدا شده پس از استفاده از بافر (DPBS+EDTA) در گروه های مختلف.

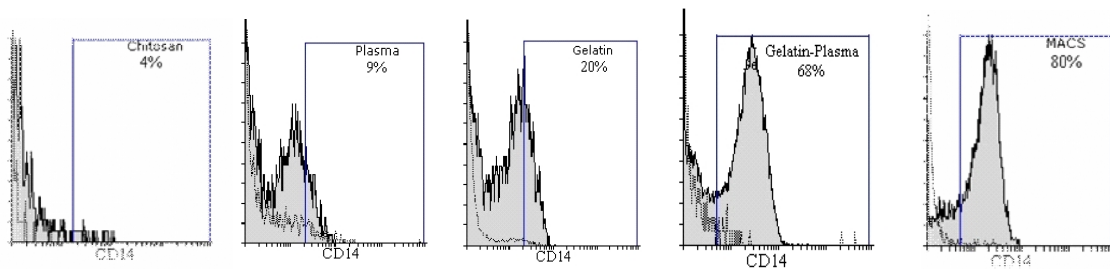


نمودار ۳- بررسی زمان مورد نیاز برای جداسازی سلول ها در گروه های شاهد، کیتوزان، پلاسما، ژلاتین، ژلاتین-پلاسما. (* نشان دهنده کمترین زمان مورد نیاز).



نمودار ۴- مقایسه بیان CD14 در هر گروه. (* نشان دهنده اختلاف معنی دار در گروه های ژلاتین-پلاسما و MACS).

جدا شده در هر گروه $61 \pm 9/76$ ، $83 \pm 6/33$ ، $80 \pm 3/25$ ، $86 \pm 7/42$ ، $87 \pm 3/02$ ، $20 \pm 5/34$ درصد به ترتیب موارد مذکور تعیین گردید. بر



شکل ۲- پلات های هیستوگرام فلوسایتومتری نشان دهنده میزان بیان CD14 در سلول های جدا شده در هر گروه، خطوط منقطع نشان دهنده کنترل منفی و خطوط ممتد میزان بیان CD14 را نشان می دهد.

این خاصیت به دلیل دارا بودن گیرنده هایی برای پروتئین فیبرینونکتین (CigR) در این سلول ها بوده که در لنفوسیت ها و پلاکت ها یافت نمی شود. بعلاوه به دلیل ترشح گلیکوپروتئین Cold insoluble globulin در غشاء مونسیت ها این سلول ها توسط اتصالات منیزیمی به فیبرین های موجود در پلاسما و سطح ژلاتین متصل می شوند. اتصال مونسیت به ژلاتین وابسته به تراکم می باشد و پوشش دادن ژلاتین با پلاسما این اتصال را مستحکم تر و میزان خالص سازی را بیشتر می کند (۵،۱۱). استفاده از محلول سرد PBS بدون کلسیم، منیزیم و EDTA، اتصالات کلسیمی بین سلولی توسط EDTA شلاته می شود و سرد بودن محلول کمک به جدا شدن بهتر سلول ها از سطح ژلاتین و پلاسما می کند. همچنین مطالعات قبلی نشان می دهد که شستشوی فلاکس های کوت شده با ژلاتین و پلاسما با بافر PBS بدون کلسیم، منیزیم قبل از استفاده، می تواند مانع اتصال مونسیت ها شود بگونه ای که نشان دهنده اهمیت بیشتر Mg^{++} در اتصال مونسیت به فیبرین و Cig نسبت به Ca^{++} بوده که تاییدی بر چگونگی جدا شدن سلول ها در هنگام استفاده از این محلول به همراه EDTA است (۱۱).

مشاهده میکروسکوپی و بررسی نتایج حاصله از فلاکس های کوت شده با کیتوزان تغییری در میزان چسبندگی مونسیت ها نسبت به گروه شاهد نشان نمی دهد، این مشاهدات با مطالعه صورت گرفته توسط Lin و همکارانش به منظور کشت ملانوسیت ها، نشان دهنده قابلیت اتصالی کیتوزان در کشت سلول است (۷). برطبق یافته

تنظیمی در رفتار سلولی و اتصالی به اینتگرین ها، کلاژن، فیبرین و هیپارین سولفات را دارا است (۴، ۱۲). بعلاوه این که در سطح سلول های تک هسته ای بویژه مونسیت ها برای این برهمکنش سلولی گیرنده وجود دارد. این مولکول در مهره داران از دو منشاء سرچشمه می گیرد. نوع اول آن فیبرینونکتین محلول در پلاسما (cold-insoluble globulin or Cig) که یکی از اجزای پروتئینی اصلی پلاسمای خون می باشد که توسط سلول های هیپاتوسیت کبد تولید می شود. نوع دوم آن غیر محلول بوده که در ماتریکس خارج سلولی وجود دارد و توسط سلول های مختلفی ترشح می شود (۱۲). از طرف دیگر ژلاتین پوست گاو که از کلاژن موجود در پوست گاو تهیه می شود، بدلیل وجود همین پروتئین کاندید مناسبی برای اتصال مونسیت ها می باشند همچنین میل ترکیبی بین Cig و کلاژن با دناتوره شدن کلاژن افزایش می یابد (۲، ۵).

همانطور که گفته شد از معمول ترین روش های جداسازی مونسیت ها استفاده از خاصیت چسبندگی آن ها به سطوح پلاستیکی و شیشه ای است. این روشی ساده، اما حضور لنفوسیت ها و پلاکت ها درصد خلوص مونسیت ها را کاهش می دهد (۹). از طرف دیگر این خاصیت چسبندگی در عمل به صورت غیر قابل برگشت بوده و استفاده از روش های مکانیکی (Scraping) برای جدا کردن، در صد زنده مانی این سلول ها را کاهش می دهد (۲). از مزایای کوت کردن سطوح پلاستیکی و شیشه ای با ژلاتین و پلاسما این است که خاصیت چسبندگی را مختل می کند.

درصد خلوص بالاتری نسبت به بقیه گروه ها داشته و در ضمن داشتن توجیه اقتصادی، قابل نگهداری بودن به مدت یک ماه و همچنین روش تهیه ساده آن در مقایسه با روش MACS که از اختصاصیت بالاتری برخوردار است، می تواند به عنوان روشی مناسب در کنار آن باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری آقایان اصغر علیاری و یوسف حیدر ثانی کارشناسان محترم آزمایشگاه ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Geissmann F, Manz M G, Jung S, Sieweke M H, Merad M, Ley K. Development of monocytes macrophages, and dendritic Cells. *Science*; 2010.327:651-656.
2. Freundlich B, Avdalovic N. Use of gelatin/plasma coated flasks for isolating human peripheral blood Monocytes. *Journal of Immunological Methods*; 1983. 62:31-37.
3. Keizer G D, Figdor C G, De Vries J D. Sensitive and quantitative determination of monocyte adherence. *Journal of Immunological Methods*; 1986. 95:141-147.
4. Underwood P A, Bennett F A. A comparison of the biological activities of the cell-adhesive proteins vitronectin and fibronectin. *Journal of Cell Science*; 1989. 93: 641-649.
5. Pankov R, Yamada K M. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science*; 2002. 115: 3861-3863.
6. Treves A J, Yagoda D, Haimovitz A, Ramu N, Rachmilewitz D, Fuks Z. The isolation and purification of human peripheral blood monocytes in cell suspension. *Journal of Immunological Methods*; 1980. 39:71-80.
7. Lin S J, Jee S H, Hsaio W C, Lee S J,

های حاصل از تخمین زمان مورد نیاز برای هرگروه، بیشترین زمان جداسازی برخلاف گروه ژلاتین پلاسما به ترتیب برای گروه ژلاتین، کیتوزان و پلاسما بود (نمودار ۳) که این می تواند به دلیل اثر کم EDTA بر مواد مذکور باشد، اما پوشش دادن ژلاتین با پلاسما با توجه به این که گروه پلاسما به تنهایی زمان کمتری را برای جداسازی به خود اختصاص داده بود و ارتباط مستقیم بین اتصال مونوسیت ها و میزان تراکم ژلاتین، این مشکل را برطرف کرده و به همین ترتیب این الگو در آزمون های مربوط به میزان شمارش و زنده مانی سلول ها مشاهده می شود به گونه ای که گروه ژلاتین- پلاسما نسبت به دیگر گروه ها افزایش معنی دار و یکسانی با MACS نشان می دهد (نمودار ۱ و ۲). از دیگر مشاهدات صورت گرفته در این تحقیق کاهش میزان سطح آلودگی پلاکتی در فلاسک های پوشیده شده توسط ژلاتین و پلاسما نسبت به گروه شاهد و کیتوزان بود که با کاهش میزان چسبندگی سلول ها به یکدیگر و به دنبال آن کاهش ایجاد کلامپ های سلولی از عوامل موثر در میزان زنده مانی و شمارش سلولی به حساب می آید. این یافته توسط محققان دیگر نیز تایید گردیده است (۱۳، ۲).

از طرفی بررسی فلوسایتومتری بیان CD14 به عنوان نشانگر مونوسیتی میزان خلوص مونوسیت ها را در گروه ژلاتین- پلاسما را نیز در مقایسه با MACS تایید می کند اگر چه این مقدار کمتر از آن می باشد (شکل ۲). بررسی و مقایسه کلی مشاهدات و نتایج حاصل از میزان شمارش، زنده مانی و خلوص مونوسیت ها در هر گروه با یافته های حاصل از مطالعات قبلی همسو بوده و نشان دهنده عملکرد بهتر ترکیب ژلاتین و پلاسما در جداسازی مونوسیت ها می باشد (۲، ۸، ۱۴، ۱۵).

از این رو می توان نتیجه گرفت که هرچند فلاکس های کوت شده با ژلاتین و پلاسما به تنهایی هر کدام نسبت به کیتوزان و گروه شاهد عملکرد بهتری را در خالص سازی مونوسیت ها نشان می دهند اما پوشش دادن ژلاتین با پلاسما

Young T H. Formation of melanocyte spheroids on the chitosan-coated surface. *Biomaterials*; 2005. 26:1413-1422.

8. Hassan N F, Campbell D E, Douglas S D. Purification of human monocytes on gelatin-coated surfaces. *Journal of Immunological Methods*; 1986. 95: 273-276.

9. Delirez N, Shojaeefar E. Phenotypic and functional comparison between flask adherent and magnetic activated cell sorted monocytes derived dendritic cells. *Iran J Immunol*; 2012. 9 (2):98-108.

10. Xu Y, McKenna R W, Karandikar N J, Pildain A J, Kroft S H. Flow cytometric analysis of monocytes as a tool for distinguishing chronic myelomonocytic leukemia from reactive monocytosis. *Am J Clin Pathol*; 2005. 124:799-806.

11. Almeida M C, Silva A C, Barral A, Netto M B. A Simple Method for Human Peripheral Blood Monocyte Isolation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 2000. 95(2): 221-223.

12. Bevilacqua M P, Amrani D, Mosesson M W, Bianco C. Receptors for cold-insoluble globulin (plasma fibronectin) on human monocytes. *J Exp MED*; 1981. 153:42-60.

13. Chou T Z, Fu E, Wu C J, Yeh J H. Chitosan enhances platelet adhesion and aggregation. *BBRC*; 2003. 302:480-483.

14. Kacani L, Frank I, Spruth M, Schwendinger M G, Mullauer B, Sprinzl G M et al. Dendritic Cells Transmit Human Immunodeficiency Virus Type 1 to Monocytes and Monocyte-Derived Macrophages. *Journal of Virology*; 1998. 72: 6671–6677.

15. Browne S H, Lesnick M L, Guiney D G. Genetic Requirements for Salmonella-Induced Cytopathology in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Infection and Immunity*; 2002. 70: 7126–7135.

The comparison of Different Monocytes Isolation Methods with Their Extraction in Magnetic Activated Cell Sorting

***Babak Beikzadeh**, MSc, Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (*Corresponding author). bbeikzadeh@live.com

Nowruz Delirezh, PhD, Associate Professor of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Reza Habibian, PhD, Student of Immunology, Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran.

Abstract

Background: Peripheral blood is the main source of monocytes to investigate immunology and biology properties. Therefore, isolation methods of these cells are important. In this study, several methods were compared, while the MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) technique cannot be used, we offer the most appropriate method with lowest cellular damage and highest purity.

Methods: methods such as coated flask with Chitosan (7), gelatin (8), plasma (2), gelatin-plasma (2) were compared with MACS (9), From the microscopic views and time of required isolating monocytes (Comparison between the mentioned methods), cell count (9), cell viability (9), the expression of CD14 as a monocyte marker (10) were compared with MACS (9) by using One-way ANOVA and Tukey test.

Results: The findings indicated that lowest cell count was belonged to controlling group and Chitosan, the highest numbers refer to gelatin-plasma and MACS. Moreover, the highest monocytes CD14 expression was observed in gelatin- plasma and MACS method.

Conclusions: Hence it can be concluded that each gelatin and plasma methods were better than the control group in the isolation of monocytes. But covering gelatin with plasma has higher purity than other methods to compare with MACS; it can be a good method beside that.

Keywords: Monocytes, Chitosan, Gelatin, Plasma, Gelatin - Plasma, MACS.