روش ساده و کم هزینه جهت جداسازی مونوسیت‌ها

نگار مرآتیان: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. nmeratian@gmail.com
***نفیسه اسمعیل:** استادیار، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران (*نویسنده مسئول). nafesm5@gmail.com
عباس رضایی: استاد، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. rezaei@mui.ac.ir
ویدا همایونی: دکتری ایمنی شناسی، مرکز تحقیقات نقص ایمنی اکتسابی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. vidahomayouni20@yahoo.com
مزدک گنجعلی خانی حاکمی: دانشیار، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، گروه ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران. mghakemi@med.mui.Ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۶/۶/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۶

چکیده

زمینه و هدف: مونوسیت‌ها یکی از اجزای مهم سیستم ایمنی هستند که در پاسخ‌های التهابی و پاسخ های ایمنی ذاتی نقش مهمی ایفا می‌کنند؛ بنابراین جداسازی این سلول‌ها در تحقیقات ایمنی شناسی دارای اهمیت فراوان بوده و به همین دلیل روش‌های مختلفی برای جداسازی این سلول‌ها ابداع شده است. یکی از کم هزینه‌ترین و آسان‌ترین روش‌ها جداسازی با استفاده از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها است که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفته است.

روش کار: در این روش بعد از جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی، با استفاده از خاصیت چسبندگی مونوسیت‌ها به سطح پلاستیکی این سلول ها از سوسپانسیون سلولی جدا سازی شدند و سپس با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی نشاندار با رنگ فلورسنت (FITC ،PE) متصل شونده به مارکرهای اختصاصی CD11b و CD14 بر سطح مونوسیت‌ها رنگ آمیزی گردید و درصد خلوص سلول‌های جداسازی شده مشخص شد.

یافته‌ها: پس از جدا سازی مونوسیت‌ها و بررسی آن‌ها با دستگاه فلوسایتومتری نتایج بیانگر این موضوع بود که ۹۰/۲ درصد از سلول‌های جداشده دو مارکر CD11b و CD14 را بیان می‌کردند.

نتیجه‌گیری: گرچه روش‌های جداسازی مختلفی برای مونوسیت‌ها وجود دارد اما هرکدام دارای مزیت‌ها و معایبی هستند. یکی از آسان‌ترین و کم‌هزینه ترین این روش‌ها جداسازی براساس خاصیت چسبندگی این سلول‌ها است که امکان جداسازی این سلول‌ها با درصد خلوص بالا را فراهم می‌کند.

کلیدواژه‌ها: مونوسیت، جداسازی، خاصیت چسبندگی

مقدمه

یکی از اجزای سیستم ایمنی که در پاسخ اولیه و سریع میزبان به عفونت نقش مهمی دارند مونوسیت‌ها هستند که از طریق فاگوسیتوز، ترشح سایتوکاین‌های التهابی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن آغازکننده پاسخ‌های التهابی ایجاد شده توسط سیستم ایمنی می‌باشند (۱، ۲). کنترل هموستاز مونوسیت‌ها در پاسخ‌های التهابی در تنظیم پاسخ‌های ایمنی مهم و ضروری است (۲). این سلول‌ها نقش‌های مختلفی در هموستاز، پاسخ ایمنی، ترمیم بافت و سرطان ایفا می‌کنند (۲).

پیش سازهای میلوییدی مغز استخوان در جریان خون تبدیل به مونوسیت می‌شوند که برای چند روز در گردش هستند و بعد از مهاجرت به بافت به ماکروفاژ تبدیل می‌شوند (۳). این سلول‌ها علاوه بر تمایز به سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک، عملکرد پاک‌سازی و برداشت مولکول‌های توکسین و بیگانه را به عهده دارند و در جداسازی آنتی‌ژن‌های خودی و بیگانه به‌عنوان یک سلول یاری‌دهنده به لنفوسیت‌های B و T عمل می‌کنند (۴).

مونوسیت‌ها ۱۰ در صد از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی را تشکیل داده و دارای سه زیرگروه کلاسیک، میانه و غیر کلاسیک می‌باشند (۳، ۴). خون محیطی به‌عنوان منبع اصلی این سلول‌ها به‌منظور مطالعه بر روی خصوصیات بیولوژیکی و ایمنی‌شناختی مونوسیت‌ها می‌باشد (۴). با توجه به اهمیت این سلول‌ها در تحقیقات ایمنی‌شناسی، روش جداسازی این سلول‌ها یک نقش مهم در

مطالعه بر روی جنبه‌های سلولی و عملکرد آن‌ها دارد (۴). روش‌های مختلفی برای جداسازی مونوسیت‌ها از خون محیطی وجود دارد ازجمله جداسازی با استفاده از روش سدیمانتاسیون گرادیانی که در این روش مونوسیت‌ها بر اساس اندازه با استفاده از اختلاف اسمزی که توسط پرکول ایجاد می‌شود از سوسپانسیون سلولی جدا می‌شوند(۵). روش دیگر استفاده از خاصیت مغناطیسی (MACS) Magnetic-activated cell sorting است. به‌گونه‌ای که سلول‌ها به‌وسیله نانو ذرات حاوی آهن متصل به آنتی‌بادی اختصاصی جدا می‌شوند(۴). روش دیگر استفاده از قسمت جداکننده (Cell Sorter) دستگاه فلوسایتومتری است که با استفاده از رنگ‌آمیزی با آنتی‌بادی‌ها و بررسی بیان آن‌ها بر سطح سلول‌ها توسط دستگاه فلوسایتومتر، مونوسیت‌ها از سوسپانسیون سلولی جدا می‌شود(۶). روش دیگر Counterflow centrifugal elutriation (CCE) می‌باشد(۶). هرکدام از این روش‌ها معایب و مزایایی دارند اما یکی از آسان‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش‌های جداسازی مونوسیت استفاده از خاصیت چسبندگی این سلول‌ها به سطح شیشه یا پلاستیک با توجه به وجود مولکول‌های چسبان روی سطح این سلول‌هاست. در این روش ما با استفاده از همین خاصیت مونوسیت‌ها و با کمترین هزینه موفق به جداسازی مونوسیت‌ها با درصد خلوص بالا شدیم.

روش کار

جداسازی سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول و گرادیان شیب غلظت انجام گرفت. بدین‌صورت که ۱۰ میلی‌لیتر خون محیطی همراه با ضد انعقاد جمع‌آوری گردید. خون به نسب برابر با PBS رقیق شد و بر روی فایکول به‌طوری‌که به‌صورت دو لایه جدا از هم قرار بگیرند ریخته شد و با دور ۲۵۰۰ به مدت ۲۰-۲۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول‌های تک‌هسته‌ای جدا شده با PBS شستشو داده شد و رسوب سلولی در محیط غنی شده RPMI همراه با ۱۰٪ سرم و ۱٪ آنتی‌بیوتیک (پنی‌سیلین - استرپتومایسین) به‌صورت سوسپانسیون در آمد.

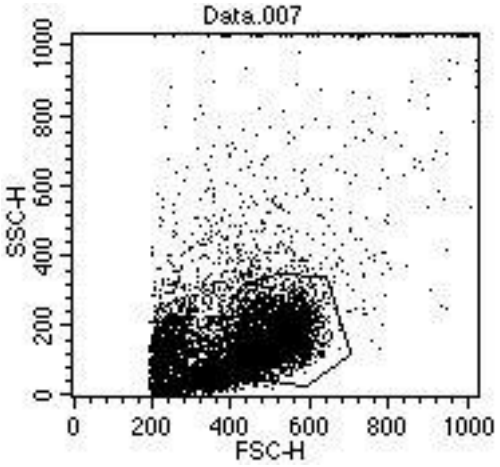
جداسازی مونوسیت‌ها از سلول‌های تک‌هسته‌ای خون محیطی: سوسپانسیون سلولی در محیط غنی شده داخل فلاسک‌های مخصوص کشت CM^2 ۲۵ ریخته شد و به مدت ۳ ساعت در دمای ۳۷ درجه همراه با ۵٪ CO2 و رطوبت انکوبه گردید. پس از این مدت محیط رویی درون فلاسک را که شامل سلول‌های غیر چسبنده است دور ریخته و با محیط غنی شده سلول‌های چسبیده به فلاسک را کاملاً شستشو داده تا هیچ‌گونه سلول غیر چسبیده‌ای وجود نداشته باشد. سپس با استفاده از محلول 0.02% EDTA/PBS سرد که بر روی یخ قرار دارد و انکوبه ۱۰ دقیقه‌ای بر روی یخ و پس از آن ضربه‌های محکم به فلاسک، مونوسیت‌های چسبیده به کف فلاسک را جدا شدند.

در نهایت با افزودن ۱ میلی‌لیتر از محیط به پلت های تشکیل شده شمارش سلول توسط لام نئوبار انجام گرفت و در صد سلول‌های زنده با تریپان بلو بررسی گردید.

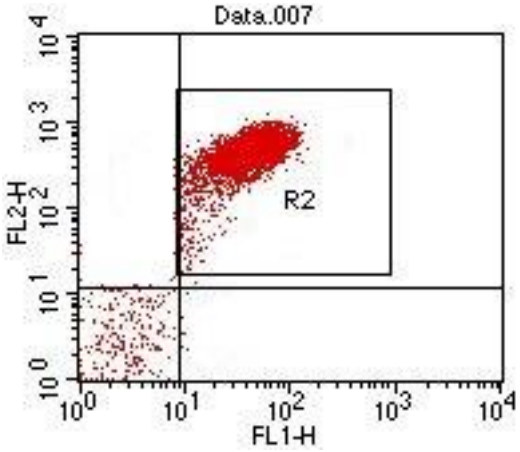
در پایان بررسی خلوص سلول‌های مونوسیت جدا شده توسط دستگاه فلوسایتومتری (BD,Facscalibure,USA) با استفاده از آنتی‌بادی‌های اختصاصی نشان‌دار با رنگ فلورسنت (PE,FITC) متصل شونده به مارکرهای اختصاصی CD11b و CD14 سطح مونوسیت‌ها انجام گردید.

یافته‌ها

در بررسی انجام شده درصد سلول‌های زنده که با تریپان بلو رنگ نگرفته‌اند بالای ۹۰٪ بوده است که نشان‌دهنده زنده‌بودن درصد قابل قبولی از سلول‌ها پس از انجام پروتکل جداسازی می‌باشد. هم‌چنین بعد از جداسازی مونوسیت‌ها، این سلول‌ها توسط آنتی‌بادی‌های مخصوص رنگ‌آمیزی سطح سلول و روش فلوسایتومتری درصد خلوص سلول‌ها مشخص شد. برای این منظور بعد از جداسازی سلول‌ها توسط آنتی‌بادی‌های ضد CD14 و CD11b که مارکر اختصاصی سطح مونوسیت‌ها می‌باشند، رنگ‌آمیزی شدند (شکل ۱). بعد از بررسی با دستگاه فلوسایتومتری (BD,Facscalibure,USA) مشخص شد درصد



شکل ۱- مونوسیت‌ها در بین کل سلول‌ها



شکل ۲- سلول‌ها با بیان هر دو مارکر CD11b و CD14

سلول‌هایی که ازلحاظ هردو مارکر مثبت می‌باشند که درواقع همان مونوسیت‌ها هستند در بین کل سلول‌ها ۹۰/۲٪ است (شکل ۲).

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نقش مهم مونوسیت‌ها و سلول‌های مشتق از آن (ماکروفاژها -سلول‌های دندرتیک) در تنظیم پاسخ‌های التهابی و ایمنی ذاتی مطالعه بر روی عملکرد این سلول‌ها و استفاده از آن‌ها در تحقیقات ایمنی‌شناسی مورد توجه قرار گرفته است(۴). در مطالعه پیش رو ما بر آن شدیم تا یک روش جداسازی مقرون به صرفه و در عین حال دقیق را جهت جداسازی منوسیت‌ها طراحی نماییم و نتایج حاصل از این روش بیانگر درصد خلوص بالا و درصد بالای زنده ماندن این سلول‌ها می‌باشد و به نظر می‌رسد این روش برای جداسازی مونوسیت‌ها روش مناسبی است.روش‌های مختلفی برای جداسازی این سلول‌ها ابداع شده که هرکدام جنبه‌های مثبت و منفی متفاوتی دارند. ازجمله این روش‌ها دیگر استفاده از خاصیت مغناطیسی (MACS) است که روشی آسان اما پرهزینه می‌باشد(۴). روش دیگر استفاده از پرکول است که روش کم‌هزینه‌ای است اما ازجمله معایب آن فعال‌سازی سلول‌ها و آلودگی آن‌ها با لنفوسیت‌ها و سلول‌های NK می‌باشد(۵). روش‌های پرهزینه و سخت‌تری هم مانند Counter flow centrifugal elutriation وجود دارد که از مزیت‌های آن عدم فعال‌سازی سلول‌ها و جداسازی به مقدار زیاد است(۶).

از معمول‌ترین روش‌های جداسازی مونوسیت‌ها استفاده از خاصیت چسبندگی آن‌ها به سطوح پلاستیکی و شیشه‌ای است. جداسازی این سلول‌ها با خاصیت چسبندگی اگرچه روشی کم‌هزینه و ساده می‌باشد، اما دارای معایبی ازجمله فعال‌سازی سلول‌ها و آلودگی با سلول‌های دیگر است(۶). روش‌های مختلفی بر اساس این خاصیت مونوسیت‌ها وجود دارد که لازمه مناسب بودن آن‌ها داشتن درصد خلوص مناسب و کمترین میزان مرگ سلول‌هاست. در روش ارائه شده بعد از انجام روش‌های مختلف مانند استفاده از محیط‌های مختلف مانند DMEM همراه با گلوکز زیاد که باعث چسبندگی سریع سلول‌ها به یکدیگر شده و تشکیل کلامپ دادند و فلاسک‌ها با سایزهای مختلف و نگهداری در انکوباتور در زمان‌های متفاوت ۱ ساعت که سلول‌ها تقریباً همگی هنوز محلول بودند و ۲ ساعت که نیمی از سلول‌ها چسبیده بودند و ۳ ساعت که بیشترین تعداد مونوسیت‌ها چسبیده بودند و ۵ ساعت که علاوه بر مونوسیت‌ها سایر سلول‌های غیر چسبنده هم به سطح فلاسک متصل شده بودند. و همچنین روش‌های مختلف انکوبه کردن سلول‌ها با محلول سرد PBS/ EDTA به‌طوری‌که چنانچه فلاسک‌های حاوی سلول را بر روی به مدت ۱۰ دقیقه روی یخ قرار نگیرند سلول‌های چسبیده جدا نمی‌شوند. در نهایت روش ذکر شده که در آن از محیط RPMI همراه با آنتی‌بیوتیک و سرم انسانی

استفاده شده و سلول‌ها به مدت ۳ ساعت انکوبه شده‌اند و در نهایت بعد از ۱۰ دقیقه انکوباسیون روی یخ همراه با محلول EDTA/PBS جداسازی مونوسیت‌ها انجام شده است، به‌عنوان آسان‌ترین و کم‌هزینه‌ترین روش برای جداسازی مونوسیت‌ها مشخص شد که بعد از بررسی بیان مولکول‌های سطحی توسط فلوسایتومتری درصد خلوص بالایی برای مونوسیت‌ها مشاهده شد و بنابراین می‌تواند به‌عنوان روش آسان و کم‌هزینه با درصد خلوص بالا و درصد بالای سلول‌های زنده برای مونوسیت‌ها مطرح گردد.با توجه به اینکه در کارهای تحقیقاتی و آزمایشگاهی علاوه بر حداکثر بازده حداقل مصرف هزینه هم نیاز است ،این روش جداسازی که شامل همه این موارد می‌باشد به‌عنوان بهترین روش برای جداسازی مونوسیت‌ها در بخش تحقیقات و تشخیص قابل استفاده است.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد نگار مرآتیان اصفهانی به شماره ۳۹۴۶۳۶ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان می‌باشد که توسط منابع مالی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تأمین هزینه شد و با تشکر از همه کسانی که در این پایان‌نامه همکاری داشته‌اند.

منابع

1. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. Lancet; 2001.357(9270):1777-89.

2. Parihar A, Eubank TD, Doseff AI. Monocytes and macrophages regulate immunity through dynamic networks of survival and cell death. J Innate Immun; 2010.2(3):204-15.

3. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, et al. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. Blood; 2010.116(16):e74-80.

4. Beikzadeh B, Delirezh N, Habibian R. The comparison of Different Monocytes Isolation Methods with Their Extraction in Magnetic Activated Cell Sorting. RJMS; 2014.20(117):21-9. [Persian]

5. Repnik U, Knezevic M, Jeras M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. J Immunol Methods; 2003.278(1-2):283-92.

6. Wahl LM, Wahl SM, Smythies LE, Smith PD. Isolation of human monocyte populations. Curr Protoc Immunol; 2006.Chapter 7:Unit 7 6A.

Simple and least expensive method for monocyte isolation

Negar Meratian, MSc Student, Department of Immunology, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran. nmeratian@gmail.com
Nafiseh Esmaeil, Assistant Professor, Department of Immunology, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran (*Corresponding author). nafesm5@gmail.com
Abbas Rezaei, Professor, Department of Immunology, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran. rezaei@mui.ac.ir
Vida Homayouni, PhD, Acquired Immunodeficiency Research Center, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran. vidahomayouni20@yahoo.com
Mazdak Ganjalikhani Hakemi, Associate Professor, Department of Immunology, Isfahan University of Medical Science, Isfahan, Iran. mghakemi@med.mui.Ac.ir

Abstract

Background: Monocytes are a key component of the immune system, which play an important role in inflammatory and innate immune responses. So the isolation of these cells is important in immunology researches and accordingly many methods have been developed for the monocyte isolation. One of the least expensive and simple separation methods is using the ability of these cells to adhere to solid surfaces that were examined in this study.
Methods: In this way, after the isolation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), monocytes were isolated from cell suspension by using the adhesion ability of these cells to the plastic surface.Isolated monocytes were stained by using specific antibodies labeled with fluorescent dyes (PE, FITC) binding to specific markers on the surface of monocytes CD11b and CD14 and the purity of cells were characterized by flow cytometry.
Results: Flow cytometry results after separation of monocytes shown that 90.2% of cells were expressed two markers CD11b and CD14.
Conclusion: Although there are several monocyte isolation methods, each of them have advantages and disadvantages. One of the least expensive and simple method of isolation is using adhesion ability of these cells that provides possibility of monocyte isolation with high purity.

Keywords: Monocyte, Isolation, Adhesion ability