مقایسه روش های مختلف جداسازی مونوسیت 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 دلیرژ: 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 دریافت: ۹۲/۳/۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۶/۱۲

چکیده

زمینه و هدف: خون محیطی، منبع اصلی از مونوسیت 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 مونوسیتی (۱۰) با روش MACS (۹) با استفاده از روش One-way ANOVA و آزمون Tukey مقایسه شد.

یافته‌ها: 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 مونوسیت ها نیز مربوط به ژلاتین- پلاسما بود. همچنین مشخص شد که بیشترین میزان بیان CD14 و خلوص مونوسیت ها مربوط به روش ژلاتین- پلاسما و MACS می باشد.

نتیجه‌گیری: 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 مونوسیت‌ها 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.

کلیدواژه‌ها: مونوسیت، کیتوزان، ژلاتین، پلاسما، ژلاتین- پلاسما، MACS.

مقدمه

مونوسیت 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 مونوسیت ها، مونوبلاست ها و پرومونوسیت ها می باشد که از ردهء میلوییدی مغز و استخوان منشاء گرفته و در جریان خون تبدیل به مونوسیت 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 مولکول‌های چسبنده با مهاجرت از خون به مکان‌های ملتهب، به ماکروفاژ و سلول های دندرتیک التهابی تبدیل می شوند که از مقدم ترین سلول ها در برخورد با عوامل بیگانه هستند (۲). مونوسیت ها ۲۰-۱۰ در صد از سلولهای تک هسته ای خون محیطی را تشکیل داده و علاوه بر تمایز به سلول‌های ماکروفاژ و دندریتیک 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 برروی خصوصیات بیولوژیکی و ایمنی شناختی مونوسیت 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، ازاین رو روش

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]

جداسازی این سلول ها یک نقش مهم در مطالعه بر روی جنبه های سلولی وعملکرد آنها دارد. روش‌های 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 مانی 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 مانی 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)، 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 هپارینه (۲۰۰ U/ml) اخذ می گردد. سپس سلولهای تک هسته ای خون محیطی را به روش PBMC جداسازی می گردد بدین منظور ابتدا خون هپارینه 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 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده جمع می‌شوند به آرامی جمع آوری گردید. PBMC به دست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن، با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت g ۴۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سلول-های 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 ۱×۱۰۷ 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، ۵٪ CO_2 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]

۵-۱۰ ml 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 میکروسکپی 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 [۱۵mg/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 پلاسمای 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 در جه 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).

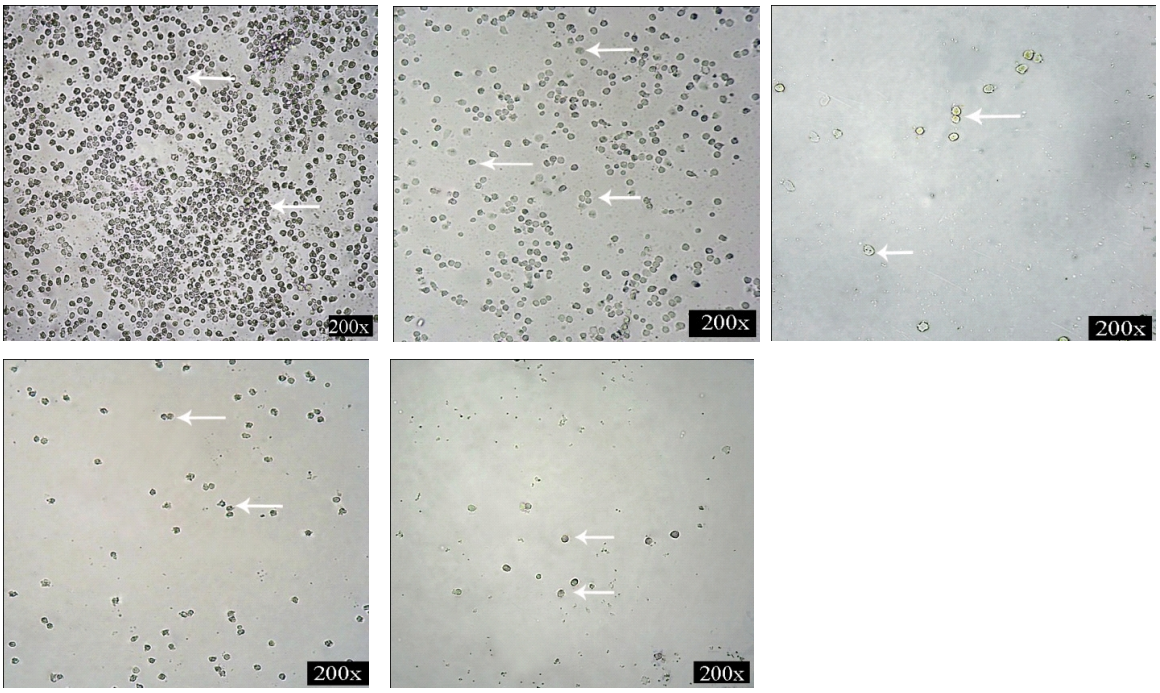
۴- کوت کردن فلاسک با ژلاتین و پلاسما: ابتدا ۵ ml از پلاسما اتولوگ به فلاسک های کوت شده توسط ژلاتین اضافه شد. سپس به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. بعد از طی این مرحله پلاسما تخلیه و فلاسک ها با DPBS شستشو داده شدند. فلاسک ها به مدت یک ماه قابل استفاده می باشند (۲).

خالص سازی مونوسیت ها به روش MACS ابتدا سلول های PBMC از خون محیطی جدا کرده و شمارش گردید. سلول ها را با سرعت ۳۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده و مایع رویی را برداشته شد. با اضافه کردن ۱۰۰ µl بافر (PBS-2mMEDTA-0/5%BSA) به ازای هر ۱۰۷ سلول، سوسپانسیون سلولی تهیه شد. سپس ۱۰µl 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 ۳۰۰ ×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس ستون جداسازی سلول را بر روی MACS stand نصب و با ۳ ml 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 ۳ ml 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 ۳ ml بافر توسط پیستون از ستون جداسازی خارج گردید. سلول ها را با دور ۴۰۰ ×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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی نشان دهنده میزان تراکم سلول های چسبنده پس از استفاده از بافر DPBS+EDTA در گروهای (a) شاهد، (b) کیتوزان، (c) پلاسما، (d) ژلاتین، (e) ژلاتین- پلاسما است. فلش های سفید رنگ نیز نشان دهنده میزان تراکم مونوسیت ها می باشد.

گروه بعد از یک بار شستشو با بافر FACS، در همین بافر که حاوی سرم موش ۲٪ بود به مدت ۳۰ دقیقه در ۴°c انکوبه شد. سپس پس از یک بار شستشو حجم بافر به ۱۰۰µl رسانده و به مقدار ۱۰µl از آنتی بادی ضد نشانگر سطحی CD14 کونژوگه با رنگ FITC (DAKO-Purified) اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در ۴°c انکوبه گردید. در پایان انکوباسیون، سلول ها را با بافر FACS شستشو داده و با دستگاه فلوسایتومتری 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 می باشد و نتایج با برنامه SPSS ویراست۱۸ بررسی شد. مقایسه بین گروه ها توسط One-way ANOVA و آزمون Tukey انجام و مقدار p<۰/۰۵ معنی دار درنظر گرفته شد.

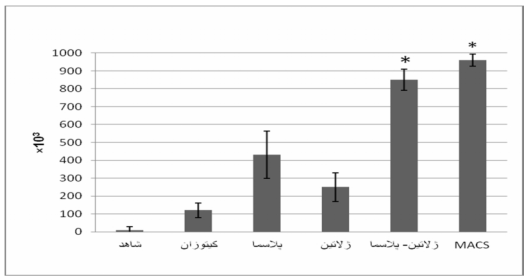
یافته‌ها

مشاهده میکروسکوپی: پس از اضافه کردن بافر سرد DPBS+EDTA به فلاسک های هر گروه (۱-۴)، سلول های چسبنده با از دست دادن خاصیت چسبندگی خود به صورت شناور در آمده، به گونه ای که کمترین میزان جداشدن سلول ها مربوط به گروه شاهد (فلاسک پلی استایرن) و بیشترین میزان کاهش تراکم سلولی متعلق به گروه ژلاتین- پلاسما و به همین ترتیب گروه های پلاسما، ژلاتین و کیتوزان بوده است. با در نظر گرفتن مشاهدات فوق مشخص گردید که پوشش دادن سطح فلاسک ها با ژلاتین- پلاسما نسبت به موارد مذکور بویژه گروه شاهد روند جدا شدن سلول های چسبنده (مونوسیت ها) را تسهیل می‌کند (شکل۱).

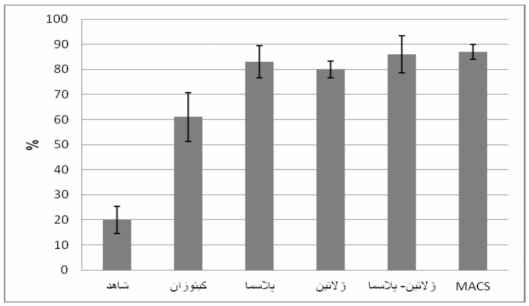
شمارش، زنده مانی و زمان جداسازی سلول ها

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 می باشد (p=۰/۰۴۳). مقادیر ۴۰± (۱۰۴×۱۲)، ۱۳۲ ± (۱۰۴ ×۴۳)، ۸۰ ± ۱۰۴ × ۲۵)، ۵۹ ± (۱۰۴ ×۸۵) و۳۴ ±(۱۰۴×۹۶) به ترتیب برای گروه های کیتوزان، پلاسما، ژلاتین، ژلاتین- پلاسما و MACS مشخص گردید. برای گروه کنترل این میزان ۲۰ ± (۱۰۳×۸) بوده است (نمودار۱). همچنین میزان زنده مانی سلول های

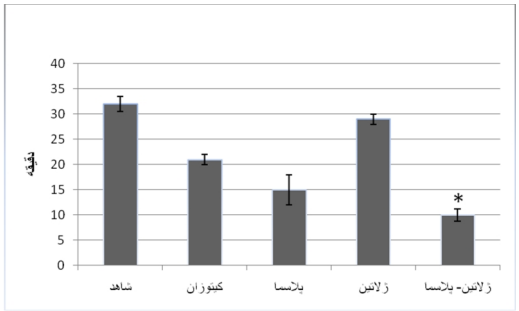
[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]



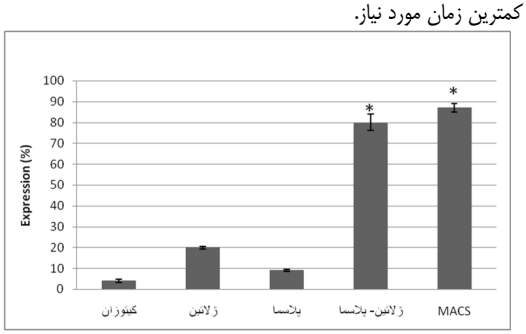
نمودار۱- مقایسه شمارش سلولی انجام شده در گروه های شاهد، کیتوزان، پلاسما، ژلاتین، ژلاتین- پلاسما و MACS. (*) نشان دهنده اختلاف معنی دار در گروه های ژلاتین- پلاسما و MACS نسبت به گروه های دیگر (P=۰/۰۴۳).



نمودار ۲- درصد زنده مانی مونوسیت ها، مقایسه میزان زنده مانی مونوسیت های جداشده 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.

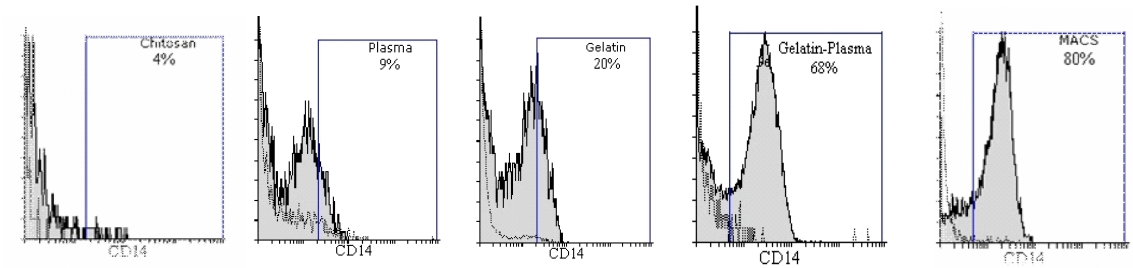
جداشده در هر گروه ۶۱±۹/۷۶، ۸۳±۶/۳۳، ۸۰±۳/۲۵، ۸۶±۷/۴۲، ۸۷±۳/۰۲، ۲۰±۵/۳۴ درصد به ترتیب موارد مذکور تعیین گردید. بر همین اساس بین گروه های پلاسما، ژلاتین- پلاسما و MACS از نظر میزان زنده مانی تفاوت معنی دار مشاهده نشد (P=۰/۱) و تنها در گروه کنترل، کیتوزان و ژلاتین در مقایسه با روش MACS این تفاوت به گونه ای که درصد زنده مانی کمتری داشته دیده شد (P=۰/۰۲۸) (نمودار۲). نتایج مربوط به مدت زمان لازم برای جداسازی سلول های چسبنده اینگونه نشان داد که کمترین زمان لازم برای گروه ژلاتین- پلاسما (۱۰±۱/۲۳ دقیقه) نسبت به گروه ژلاتین (۲۹±۱ دقیقه)، پلاسما (۱۵±۳ دقیقه)، کیتوزان (۲۱±۱ دقیقه)، کنترل (۳۲±۱/۵ دقیقه) بود (P=۰/۰۳۲) (نمودار۳).

فلوسایتومتری: بررسی بیان CD14 در سلول‌ها جدا شده نشان داد که بیشترین میزان بیان و خلوص مونوسیت ها مربوط به روش ژلاتین- پلاسما و MACS می باشد (شکل۲ و نمودار۴).

بحث و نتیجه گیری

از آنجایی که مونوسیت ها و سلول های مشتق از آن (ماکروفاژها- سلول های دندرتیک) 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 مونوکولونال 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]



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.

تنظیمی در رفتار سلولی و اتصالی به اینتگرین ها، کلاژن، فیبرین و هپارین سولفات را دارا است (۴، ۱۲). بعلاوه این که در سطح سلول های تک هسته ای بویژه مونوسیت 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 هپاتوسیت 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 مونوسیت 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 مونوسیت 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 مونوسیت ها را کاهش می‌دهد (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. 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 مونوسیت ها این سلول ها توسط اتصالات منیزیمی به فیبرین های موجود در پلاسما و سطح ژلاتین متصل می شوند. اتصال مونوسیت 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 وEDTA، 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 مونوسیت ها شود بگونه ای که نشان دهنده اهمیت بیشتر Mg++ در اتصال مونوسیت 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 مونوسیت 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

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]

هـای حاصـل از تخمـین زمـان مـورد نیـاز بـرای هرگروه، بیشترین زمان جداسـازی بـرخلاف گـروه ژلاتـین پلاسـما بـه ترتیـب بـرای گـروه ژلاتـین، کیتوزان و پلاسما بود (نمودار۳) که این می توانـد به دلیل اثر کم EDTA بر مواد مـذکور باشـد، امـا پوشش دادن ژلاتین با پلاسما با توجه به ایـن کـه گروه پلاسـما بـه تنهـایی زمـان کمتـری را بـرای جداسازی بـه خـود اختصـاص داده بـود و ارتبـاط مستقیم بین اتصال مونوسیت هـا و میـزان تـراکم ژلاتین، این مشکل را برطـرف کـرده و بـه همـین 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 بـه دیگـر گروه ها افزایش معنـی دار و یکسـانی بـا MACS نشان می دهـد (نمـودار۱و۲). از دیگـر مشـاهدات صورت گرفته در این تحقیق کاهش میـزان سـطح آلودگی پلاکتـی در فلاسـک هـای پوشـیده شـده توسط ژلاتین و پلاسما نسـبت بـه گـروه شـاهد و کیتـوزان بـود کـه بـا کـاهش میـزان چسـبندگی سلول‌ها به یکدیگر و بـه دنبـال آن کـاهش ایجـاد کلامپ های سلولی از عوامل موثر در میـزان زنـده مانی و شمارش سلولی بـه حسـاب مـی آیـد. ایـن یافته توسط محققان دیگر نیز تایید گردیده اسـت (۱۳، ۲).

از طرفی بررسی فلوسایتومتری بیان CD14 بـه عنوان نشانگر مونوسیتی میزان خلـوص مونوسـیت ها را در گروه ژلاتین- پلاسما را نیز در مقایسـه بـا MACS تایید می کند اگر چه این مقدار کمتـر از آن می باشـد (شـکل ۲). بررسـی و مقایسـه کلـی مشاهدات و نتایج حاصل از میزان شـمارش، زنـده مـانی و خلـوص مونوسـیت هـا در هـر گـروه بـا یافته‌های حاصل از مطالعات قبلـی همسـو بـوده و نشان دهنده عملکرد بهتر ترکیب ژلاتین وپلاسـما در جداسازی مونوسیت هـا مـی باشـد (۲، ۸، ۱۴، ۱۵).

از این رو مـی تـوان نتیجـه گرفـت کـه هرچنـد فلاکس های کوت شـده بـا ژلاتـین و پلاسـما بـه تنهایی هر کدام نسبت به کیتوزان و گـروه شـاهد عملکرد بهتری را در خالص سـازی مونوسـیت هـا نشان می دهند اما پوشش دادن ژلاتین با پلاسـما درصد خلوص بـالاتری نسـبت بـه بقیـه گـروه هـا داشته و در ضمن داشتن توجیـه اقتصـادی، قابـل نگهداری بودن به مدت یک مـاه و همچنـین روش تهیه ساده آن در مقایسه بـا روش MACS کـه از اختصاصیت بالاتری برخوردار است، مـی توانـد بـه عنوان روشی مناسب در کنار آن باشد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکـاری آقایـان اصـغر علیـاری و یوسف حیدر ثانی کارشناسـان محتـرم آزمایشـگاه 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,

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]

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. Delirezh 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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]

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.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2025-08-06]