

جداسازی پلاسماسل از خون محیطی و هم‌کشتی با سلول استرومای مغز استخوان به منظور کشت طولانی مدت

معصومه بزاز^۱، دکتر جلیل فلاح مهرآبادی^۲، دکتر مهدی مهدوی^۳، دکتر مهدی زین‌الدینی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: فن‌آوری تهیهی آنتی بادی بر پایه‌ی تک سلول B روشی نوین در تهیهی آنتی بادی مونوکلونال انسانی محسوب می‌گردد. مهم‌ترین بخش این فن‌آوری، کشت طولانی مدت پلاسماسل جدا شده از خون جهت ترشح آنتی بادی است. با توجه به این که دلیل زنده ماندن طولانی مدت پلاسماسل‌ها در مغز استخوان حضور سیگنال‌های اطراف آن‌ها است، جهت کشت پلاسماسل در شرایط *In vitro* لازم است این سیگنال‌ها به واسطه‌ی حضور یک لایه سلول تغذیه کننده تأمین شوند. به نظر می‌رسد که از میان انواع مختلف این سلول‌ها، سلول‌های استرومای مغز استخوان (BMSCs) یا (Bone marrow stromal cells) گزینه‌ی مناسب‌تری جهت هم‌کشتی با پلاسماسل محسوب می‌گردند. هدف از این پژوهش، جداسازی پلاسماسل‌های ترشح کنندهی آنتی بادی از خون محیطی و زنده نگهداشتن آن‌ها در شرایط *In vitro* می‌باشد.

روش‌ها: پس از تزریق واکسن کزاز، تیتراژ آنتی بادی در سرم خون افراد داوطلب با روش (Enzyme-linked immunosorbent assay) ELISA اندازه‌گیری شد. PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells) جدا شده از خون فرد ایمن با آنتی بادی‌های رنگی اختصاصی سه نشانگر سطحی CD۴۵، CD۱۹ و CD۳۸ رنگ‌آمیزی شدند. پس از آن پلاسماسل‌ها به روش (Fluorescence-activated cell sorting) FACS از سایر جمعیت‌های سلولی موجود، جدا و در پلیت ۹۶ خانه‌ای Sort شدند. سپس همراه با یک لایه BMSCs کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۰ روز، از پلاسماسل‌ها RNA استخراج شد و واکنش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن آنتی بادی انجام شد.

یافته‌ها: روز ششم پس از واکسیناسیون، تیتراژ آنتی بادی سرم، ۱۶ IU/ml به دست آمد که نشان از پاسخ ایمنی بسیار مناسب در مقابل واکسن کزاز بود. همچنین، آنالیز فلوسایتومتری نمونه‌ی خون محیطی فرد ایمن شده در روز هفتم، درصد پلاسماسل موجود در PBMCs را حدود ۰/۳ درصد نشان داد. در نتیجهی انجام واکنش RT-PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن آنتی بادی، قطعه‌ی (Variable heavy chain) VH به طول ۴۰۰ bp تکثیر شد. این نتیجه، زنده بودن پلاسماسل‌ها و همچنین بیان ژن آنتی بادی را در روز دهم در شرایط هم‌کشتی با BMSCs تأیید نمود.

نتیجه‌گیری: حاصل این پژوهش، فراهم آوردن شرایط مناسب به منظور کشت پلاسماسل برای مدت ۱۰ روز در محیط *In vitro* بود. بنابراین بخشی از فن‌آوری نوین تهیهی آنتی بادی بر پایه‌ی تک سلول B نیز پایه‌گذاری شد. نتایج به دست آمده در این پژوهش شامل درصد پلاسماسل موجود در PBMCs و اندازه‌ی قطعه‌ی ژنی VH تکثیر شده، با سایر مطالعات انجام شده در این زمینه مطابقت داشت.

واژگان کلیدی: آنتی بادی مونوکلونال انسانی، پلاسماسل، سلول استرومای مغز استخوان، FACS، هم‌کشتی

ارجاع: بزاز معصومه، فلاح مهرآبادی جلیل، مهدوی مهدی، زین‌الدینی مهدی. جداسازی پلاسماسل از خون محیطی و هم‌کشتی با سلول

استرومای مغز استخوان به منظور کشت طولانی مدت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۸۲): ۵۴۳-۵۳۴

۱- کارشناس ارشد، پژوهشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

۲- استادیار، پژوهشکده‌ی علوم و فناوری زیستی، دانشگاه صنعتی مالک اشتر، تهران، ایران

۳- استادیار، گروه ایمنی‌شناسی، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

مقدمه

امروزه آنتی بادی‌ها به ابزارهای قدرتمندی در درمان بیماری‌ها تبدیل شده‌اند. آنتی بادی‌های به طور کامل انسانی (Human monoclonal antibodies یا hMAbs) به عنوان بهترین آنتی بادی‌های مونوکلونال درمانی معرفی شده‌اند. از میان تکنولوژی‌های تهیه‌ی hMAbs، تکنولوژی بر پایه‌ی تک سلول B (Single B cell antibody technology) به دلیل ایجاد آنتی بادی با کمترین میزان ایمونوژنیسیته و بیشترین کارایی نسبت به سایر تکنولوژی‌ها، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است (۱). یکی از مراحل مهم در این تکنولوژی، کشت پلاسماسل‌های جدا شده از خون محیطی در شرایط *In vitro* به منظور ترشح آنتی بادی است (۲).

پلاسماسل‌ها آخرین مرحله از تمایز لنفوسیت‌های B می‌باشند که مسؤلیت مهم آن‌ها ترشح میزان بسیار زیاد آنتی بادی جهت ایجاد ایمنی هومورال در برابر عامل بیگانه است؛ بنابراین به گونه‌ای تمایز یافته‌اند که حدود ۷۰-۴۰ پیکوگرم در روز آنتی بادی ترشح نمایند. دیگر ویژگی‌های پلاسماسل عبارتند از افزایش وسعت شبکه‌ی آندوپلاسمی، حضور مقدار بسیار زیادی ریبوزوم در سیتوپلاسم سلول و همچنین بیان بالای آنتی ژن‌های سطحی CD۳۸ و CD۱۳۸ این ویژگی‌ها، پلاسماسل‌ها را از سایر لنفوسیت‌های B متمایز می‌سازد (۳-۵).

پلاسماسل‌ها طی پاسخ ایمنی هومورال و از تمایز سلول‌های B ایجاد می‌گردند. پاسخ ایمنی هومورال در بافت‌های لنفاوی محیطی آغاز می‌گردد. از اولین برخورد آنتی ژن با سلول‌های B بالغ در طحال یا غدد لنفاوی تا تبدیل آن‌ها به پلاسماسل و ورود به خون،

مدت ۸-۶ روز به طول می‌انجامد. در این سه روز، موج عظیمی از پلاسما بلاست‌های اختصاصی آنتی ژن وارد سیستم گردش خون می‌شوند تا به سمت مغز استخوان حرکت کنند و در آن جا مستقر شوند (۶-۷).

با وجود این که پلاسماسل‌ها برای مدت زمان بسیار طولانی در مغز استخوان زنده می‌مانند و آنتی بادی ترشح می‌کنند، اما در شرایط *In vitro* بیش از یک روز زنده نخواهند ماند (۸). تحقیقات نشان داده‌اند که علت زنده ماندن طولانی پلاسماسل‌ها در مغز استخوان، حضور سیگنال‌هایی است که از سلول‌های استرومای مغز استخوان موجود در محیط زندگی طبیعی پلاسماسل ترشح می‌شود. برخی از این سیگنال‌ها در اثر ارتباط سلول-سلول و برخی دیگر به واسطه‌ی حضور سیتوکین‌های ترشح شده در محیط، موجب زنده ماندن طولانی پلاسماسل می‌گردند. مهم‌ترین محرک‌هایی که جهت زنده ماندن پلاسماسل در محیط کشت لازم هستند شامل IL-۶، (Interleukin-۵) IL-۵ و (Interleukin-۵) TNF- α و (Tumor necrosis factor alpha) می‌باشد (۴)؛ بنابراین در صورت کشت پلاسماسل در شرایط *In vitro* لازم است این عوامل در محیط کشت حضور داشته باشند تا پلاسماسل‌ها برای مدت چند روز در محیط کشت زنده بمانند و آنتی بادی ترشح نمایند (۴).

پلاسماسل‌ها با اهداف مختلفی در محیط *In vitro* کشت داده شده‌اند، سپس سوپ رویی آن‌ها جهت آنالیز آنتی بادی ترشح شده، مورد استفاده گرفته است. کشت پلاسماسل، اولین بار در دهه‌ی ۱۹۷۰ با هدف انجام تحقیقات بر روی

روش‌ها

جهت جداسازی، کشت و زنده نگه داشتن پلاسماسل‌ها ابتدا سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی PBMCs (Peripheral blood mononuclear cells)، هفت روز پس از واکسیناسیون، از خون فرد واکسینه شده علیه توکسوئید کزاز، جداسازی شدند. سپس با آنتی بادی مونوکلونال کانژوگه به رنگ فلورسانس و بر اساس الگوی سه رنگی CD⁴⁵-PerCp، CD³⁸-PE و CD¹⁹-Alexa flour⁴⁴⁸ شدند. پس از آماده‌سازی نمونه، پلاسماسل‌ها از میان سایر سلول‌های تک هسته‌ای خون به روش FACS (Fluorescence-activated cell sorting) جداسازی شدند. پس از ۱۰ روز کشت در حضور سلول‌های استرومای مغز استخوان، زنده بودن پلاسماسل و همچنین بیان ژن آنتی بادی توسط واکنش RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) مورد بررسی قرار گرفت.

انتخاب داوطلب بر اساس تیتراژ آنتی بادی سرم بعد از واکسیناسیون

تعدادی از افراد به عنوان داوطلب انتخاب و از آن‌ها سرم صفر گرفته شد. سپس با واکنش کزاز (بخش واکسیناسیون انستیتو پاستور ایران) واکسینه شدند. ۶ روز پس از واکسیناسیون، دوباره از افراد سرم تهیه شد و با استفاده از کیت الایزا اختصاصی توکسین کزاز (شرکت IBL)، تیتراژ آنتی بادی اختصاصی کزاز در سرم صفر و سرم پس از واکسیناسیون برای هر فرد اندازه‌گیری شد. در این میان، فردی که تفاوت تیتراژ آنتی بادی در سرم قبل و پس از واکسیناسیون او بیشتر بود، انتخاب شد. همچنین در روز ششم پس از واکسیناسیون، جهت تعیین درصد پلاسماسل موجود

بیماری مولتیپل میلوما آغاز شد (۵). از آن زمان، کشت پلاسماسل با اهداف مختلفی چون بررسی بدخیمی‌های پلاسماسل، بیماری‌های خود ایمنی، تعیین پاسخ آنتی بادی نسبت به آنتی ژن خاص و در نهایت، تهیه آنتی بادی درمانی انسانی انجام شده است (۶).

با توجه به موارد ذکر شده، زنده نگه داشتن پلاسماسل در محیط کشت نیازمند به حضور یک لایه سلول به عنوان تغذیه کننده می‌باشد (۷-۸، ۳). سلول‌های تغذیه کننده، وظیفه‌ی تأمین عوامل رشد و همچنین برقراری ارتباط سلول-سلول با پلاسماسل، جهت انتقال سیگنال‌های زنده ماندن سلول را بر عهده دارند (۹-۱۰). تا کنون از سلول‌های مختلفی مانند فیبروبلاست پوست و مزانشیم استرومای مغز استخوان (Bone marrow stromal cell) BMSC به عنوان تغذیه کننده جهت کشت پلاسماسل طبیعی و بدخیم استفاده شده است (۴، ۲).

با توجه به این که در ایران اکثر داروهای نو ترکیب به ویژه آنتی بادی‌های درمانی، وارداتی هستند و خرید هر دوز از دارو، مستلزم پرداخت هزینه‌ی سنگینی می‌باشد، پایه‌گذاری تکنولوژی‌های تهیه آنتی بادی‌های مونوکلونال درمانی امری ضروری به شمار می‌رود. در این تحقیق تلاش شده است تا با فراهم آوردن شرایط کشت پلاسماسل در محیط *In vitro*، بخشی از تکنولوژی تهیه آنتی بادی بر پایه‌ی تک سلول B را راه‌اندازی نماییم. هدف از این تحقیق، فراهم آوردن شرایط مناسب جهت جداسازی، کشت و زنده نگه‌داشتن پلاسماسل در *In vitro* برای مدت طولانی جهت ترشح آنتی بادی بوده است.

۹۶ خانه‌ای و در محیط RPMI کامل، بر روی یک لایه سلول استرومای مغز استخوان که از قبل در پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار داده شده بودند، کشت داده شدند. جهت آماده‌سازی سلول بنیادی مزانشیم مغز استخوان، پس از تحویل سلول‌ها از بانک سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان، ابتدا اجازه داده شد تا سلول‌ها تکثیر یابند تا زمانی که حدود ۹۰ درصد سطح فلاسک را اشغال نمایند. سپس با استفاده از تریپسین از سطح فلاسک جدا و پس از شمارش در پلیت ۹۶ خانه‌ای، کشت داده شدند. پس از گذشت ۱۰ روز از کشت پلاسماسل، واکنش RT-PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی ناحیه‌ی متغیر زنجیره‌ی سنگین VH (Variable heavy chain) آنتی بادی انجام شد. برای این منظور ابتدا RNA تام با استفاده از کیت شرکت Signosis از پلاسماسل‌ها استخراج شد و واکنش رونوشت‌برداری معکوس با استفاده از کیت سنتز cDNA (Complementary DNA) شرکت فرمتاز انجام شد. جهت تکثیر ناحیه‌ی سنگین آنتی بادی، cDNA ساخته شده به عنوان الگو در واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. شرایط انجام واکنش در جداول ۱ و ۲ مشخص شده است.

یافته‌ها

بر اساس نتایج به دست آمده از آزمایش الیزا و فلوسایتومتری مشخص شد که افراد واکسینه شده، هر کدام پاسخ متفاوتی نسبت به واکنش داشتند. این نتیجه زمانی مشخص شد که اختلاف تیتراژ IgG (Immunoglobulin G) اختصاصی کزاز در سرم قبل و بعد از واکسیناسیون افراد سنجیده شد (جدول ۳).

در خون محیطی، از فرد خون گرفته شد و آنالیز فلوسایتومتری بر روی خون کامل توسط دستگاه FACS Caliber موجود در بخش فلوسایتومتری در پژوهشکده‌ی سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان انجام شد.

جداسازی پلاسماسل از خون محیطی

روز هفتم پس از واکسیناسیون، ۱۰ میلی‌لیتر خون در Vacutainer حاوی Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (شرکت BD) جمع‌آوری شد و به نسبت ۱:۱ با PBS/EDTA (Ethylenediaminetetraacetic) رقیق شد، سپس به نسبت ۱:۲ بر روی فایکول منتقل شد. سانتریفوژ با دور ۴۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه و بدون توقف انجام شد. لایه‌ی بافیکوت از مرز میان پلاسما و فایکول برداشته شد و با PBS/EDTA شستشو داده شد. در نهایت، رسوب سلولی حاصل در RPMI (Roswell Park memorial institute) کامل به حالت سوسپانسیون درآمد. پس از شمارش سلول‌ها، درصد زنده بودن آن‌ها نیز مشخص شد. سپس آنتی بادی‌های رنگی CD۴۵-PerCp، CD۴۸-Alexafluor، CD۱۹ و CD۳۸-PE به سلول‌ها اضافه شدند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از شستشو و حذف آنتی بادی‌های اتصال نیافته، سلول‌ها به روش FACS با استفاده از دستگاه Cell Sorter BD FACS Aria II در پلیت ۹۶ خانه‌ای Sort شدند.

کشت و شناسایی پلاسماسل

پلاسماسل‌های جدا شده به روش FACS (Fluorescent activated cell sorting)، در پلیت

جدول ۱. شرایط بافری RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) جهت تکثیر قطعات VH (Variable heavy chain)

VH Primers		Templet (cDNA)	H ₂ O	Total	Taq 2x master mix	نام ماده
VH	IgG					
۰/۴mM	۰/۴mM	۳ μl	۷/۵ μl	۲۵ μl	۱x	مقدار

IgG: Immunoglobulin G; cDNA: Complementary DNA

جدول ۲. شرایط دمایی RT-PCR (Reverse transcription polymerase chain reaction) جهت تکثیر قطعات VH (Variable heavy chain)

دما	زمان	مرحله	تعداد چرخه
۹۴ °C	۳۰ (ثانیه)	Denature	Cycle ۳۵
۶۲ °C	۳۰ (ثانیه)	Annealing	
۷۲ °C	۱ (دقیقه)	Extension	
۷۲ °C	۵ (دقیقه)		Final Extention

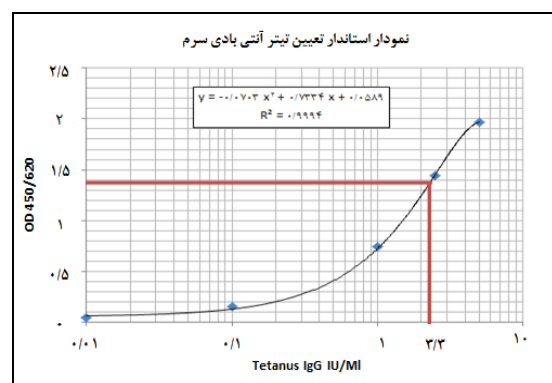
جدول ۳. نتیجه‌ی الایزا جهت تعیین تیترا سرم افراد داوطلب، قبل و بعد از تزریق واکسن

اختلاف تیترا	(IU/ml) Tetanus IgG titer		سن	جنسیت	داوطلب
	بعد از واکسن	قبل از واکسن			
۰/۴	۳/۷	۳/۳	۲۶	زن	۱
۱۶/۰	۱۶/۵	۰/۵	۴۰	مرد	۲
۵/۵	۱۰/۰	۴/۵	۲۳	مرد	۳
۴/۷	۸/۰	۳/۷	۲۵	زن	۴

IgG: Immunoglobulin G

میان داوطلبان، فردی که بیشترین اختلاف تیترا میان سرم صفر و پس از واکسیناسیون داشت، به عنوان دهنده‌ی پلاسماسل در نظر گرفته شد. تیترا آنتی بادی در خون وی حدود ۱۶/۵ IU/ml مشخص شد که با توجه به اطلاعات موجود در کیت الایزا شرکت JBL، نشان از پاسخ ایمنی بسیار مناسبی است. همچنین نتایج آنالیز فلوسایتومتری نمونه‌ی خون فرد ایمن در روز ششم و هفتم نشان داد که میزان پلاسماسل‌ها که همزمان سه شاخص سطحی CD۴۵، CD۱۹ و CD۳۸ را در سطح خود بیان می‌کنند، حدود ۰/۳ درصد است (شکل ۲).

روز هفتم پس از واکسیناسیون پلاسماسل‌ها از

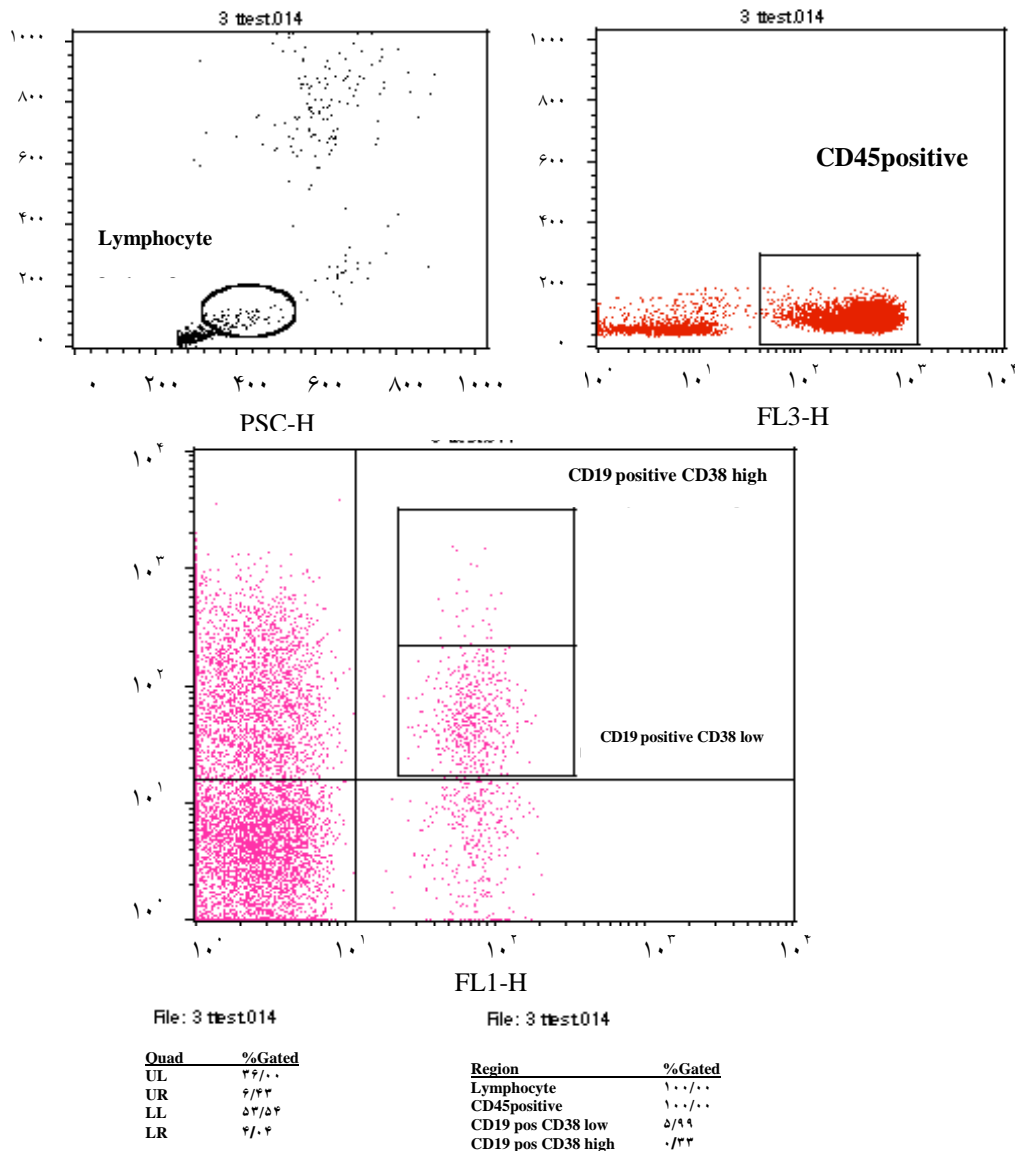


شکل ۱. نمودار استاندارد جهت تعیین تیترا سرم بر اساس IU/ml

بر اساس نمودار استاندارد (شکل ۱) و با توجه به نتایج حاصل از واکنش الایزا در رقت ۱/۵۰۰ سرم، اختلاف تیترا IgG اختصاصی کزاز در افراد داوطلب از ۰/۳ IU/mL تا ۱۶ IU/mL متفاوت بوده است. از

در نهایت واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ناحیه‌ی VH بر روی آن‌ها انجام شد. در نتیجه‌ی انجام واکنش PCR بر روی Total cDNA به دست آمده از پلاسماسل‌ها، قطعه‌ی VH به طول ۴۰۰ bp تکثیر شد (شکل ۳).

میان سایر جمعیت‌های سلولی جداسازی و در پلیت ۹۶ خانه‌ای پوشیده شده با سلول‌های استرومای مغز استخوان، Sort شدند. پس از گذشت ۱۰ روز از هم‌کشتی پلاسماسل‌ها با سلول‌های BMSC، به ترتیب فرایندهای استخراج RNA، ساخت cDNA و



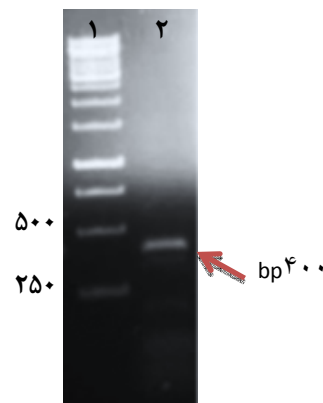
شکل ۲. نتیجه‌ی حاصل از آنالیز داده‌های فلوسایتمتری. جهت انجام آنالیز ابتدا بر اساس نتیجه‌ی حاصل از نمونه‌ی ایزوتایپ کنترل و بر اساس گرانولوسیتی SSC (Side scatter) و اندازه‌ی FSC (Forward scatter) جمعیت‌های گرانولوسیت، مونوسیت و لنفوسیت از یکدیگر متمایز شد و جمعیت لنفوسیتی انتخاب گردید. پس از آن از میان جمعیت $CD45^+$ (FL۳)، جمعیتی از سلول‌ها که بیان همزمان $CD19$ (FL۱) و $CD38$ (FL۲) را نشان می‌دادند، مشخص شدند.

تقسیم و تکثیر نمی‌شوند. تکثیر آن‌ها تنها زمانی ممکن است که بدخیم شوند، مانند آن چه که در بیماری مولتیپل میلوما اتفاق می‌افتد. همچنین با وجود این که پلاسماسل‌ها برای مدت طولانی در شرایط *In vivo* زنده می‌مانند، در صورت کشت در محیط *In vitro* بیش از یک روز زنده نمی‌مانند (۱۰، ۴).

جهت زنده نگه داشتن پلاسماسل در محیط *In vitro*، وجود سیتوکین‌هایی که در محیط زندگی طبیعی پلاسماسل موجب حفظ و زنده ماندن آن می‌گردند، بسیار ضروری است. در پژوهش‌هایی که در زمینه‌ی زنده نگه داشتن پلاسماسل انجام شده است، سیتوکین‌های لازم برای زنده نگه داشتن پلاسماسل‌ها به روش‌های مختلفی مانند کشت بر روی تک لایه‌ی فیروبلاست پوست، استرومای مغز استخوان، PBMC و یا با استفاده از Condition medium حاصل از کشت آن‌ها تأمین شده‌اند (۱۱).

در برخی از پژوهش‌های انجام شده نیز از IL-6 نوترکیب جهت زنده نگه داشتن پلاسماسل استفاده شده است (۱۲). در این پژوهش از سلول‌های استرومای مغز استخوان به عنوان سلول تغذیه کننده استفاده شد و نتایج حاصل نشان داد که شرایط ایجاد شده در این پژوهش، جهت کشت پلاسماسل به مدت ۱۰ روز در محیط *In vitro* مناسب می‌باشد.

همچنین مشخص شد که الگوی سه رنگی فلورسانس بر اساس نشانگرهای سطحی CD۴۵، CD۱۹ و CD۳۸ که در این پژوهش جهت جداسازی پلاسماسل مورد استفاده قرار گرفت، برای زمانی که منبع پلاسماسل، خون محیطی باشد، الگوی مناسبی است. این مورد در پژوهش انجام شده توسط Meijer و همکاران نیز به تأیید رسیده است (۱۴-۱۳).



شکل ۳. تصویر الکتروفورز نتیجه‌ی RT-PCR

(Reverse transcription polymerase chain reaction)

جهت تکثیر قطعات (Variable heavy chain) VH

ردیف ۱. نشانگر ۰.۱ Kb. ردیف ۲. محصول PCR با

پرایمر VH۱

با توجه به این که ژن آنتی بادی از مخزن RNA پلاسماسل‌ها تکثیر یافته است، مشخص شد که با استفاده از شرایط فراهم شده در این پژوهش و در صورت هم‌کشتی پلاسماسل با سلول‌های BMSC می‌توان پلاسماسل‌ها را برای مدت بیش از یک روز (۱۰ روز) در محیط *In vitro* زنده نگه داشت. همچنین مشخص شد که در این مدت، فرایند رونویسی و در نتیجه، بیان ژن آنتی بادی در پلاسماسل‌ها انجام شده است.

بحث

تکنولوژی‌های تهیه‌ی آنتی بادی‌های درمانی به طور کامل انسانی، در حال پیش‌روی به سمت جداسازی ژن آنتی بادی از تک سلول B ترشح کننده‌ی آنتی بادی می‌باشد. یکی از مراحل ضروری در این روش، کشت پلاسماسل برای مدت چند روز در محیط *In vitro* می‌باشد. پلاسماسل‌ها آخرین مرحله از تمایز سلول‌های B هستند و به طور خود به خود

۴۰۰ bp تا ۵۶۰ bp متفاوت بوده است (۱۹). دلیل این اختلاف، تفاوت موجود در طول ناحیه‌ی CDR₃ در آنتی بادی‌های مختلف و همچنین انتخاب محل اتصال پرایمرها طی واکنش PCR می‌باشد. در این پژوهش، پرایمر Forward، اختصاصی ۹ آمینواسید ابتدای آمینو ناحیه‌ی متغیر زنجیره‌ی سنگین و پرایمر Reverse، اختصاصی آمینواسیدهای ۱۲۱-۱۱۵ از ناحیه‌ی CH₁ آنتی بادی IgG در نظر گرفته شد.

بر اساس نتایج حاصل و شرایط ایجاد شده در این پژوهش، مشخص شد که پلاسماسل‌ها را می‌توان با الگوی سه رنگی و به واسطه‌ی حضور همزمان نشانگرهای CD₄₅، CD₁₉ و CD₃₈ از خون محیطی جداسازی نمود. همچنین با شرایط ذکر شده در این پژوهش، امکان کشت و زنده نگه داشتن پلاسماسل‌های انسانی طبیعی برای مدت ۱۰ روز (بیش از یک روز) در محیط *In vitro* فراهم گشت. علاوه بر این، مشخص شد که پلاسماسل‌ها در این مدت ژن‌های مسؤل سنتز آنتی بادی را نیز بیان نموده‌اند.

تشکر و قدردانی

از همکاران پژوهشکده‌ی علوم و فن‌آوری زیستی دانشگاه صنعتی مالک اشتر و همچنین پژوهشگاه رویان که با رهنمودهای خود ما را در انجام این پژوهش یاری نمودند، سپاسگزاری می‌شود.

همچنین درصد پلاسماسل موجود در خون محیطی در افراد مختلف متفاوت بود؛ به طوری که افرادی که تیترا بالاتری از آنتی بادی را در خون خود داشتند، درصد پلاسماسل آن‌ها نیز بیشتر بود. درصد پلاسماسل موجود در خون محیطی افراد واکسینه شده، بین ۰/۳-۰/۱ متغیر بود.

نتایج به دست آمده در این مرحله، با نتایج موجود در دیگر مطالعات مشابه مطابقت داشت؛ به طوری که در سایر مطالعات مشابه، درصد پلاسماسل موجود در خون محیطی در روز ششم تا هشتم پس از واکسیناسیون، در افراد مختلف حدود ۰/۴-۰/۱ گزارش شده بود (۱۸-۱۵). نتیجه‌ی دیگری که از این تحقیق حاصل شد، تناسب میان تیترا آنتی بادی موجود در سرم فرد با میزان پلاسماسل موجود در خون محیطی وی در روز ششم و هفتم پس از واکسیناسیون بود. همچنین در میان افراد داوطلب، فردی که پس از گذشت یک ماه از تزریق واکسیناسیون اول به وی یادآور تزریق شده بود، درصد پلاسماسل بیشتری را در مقایسه با افرادی که تنها یادآور ده ساله به آن‌ها تزریق شده بود، نشان داد. پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش به گونه‌ای در نظر گرفته شده بودند که قطعه‌ی VH با طول حدود ۴۰۰ bp طی واکنش PCR تکثیر گردد. در مطالعات مشابه نیز اندازه‌ی قطعه VH از حدود

References

1. Tiller T. Single B cell antibody technologies. *N Biotechnol* 2011; 28(5): 453-7.
2. He XS, Sasaki S, Narvaez CF, Zhang C, Liu H, Woo JC, et al. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *J Immunol Methods* 2011; 365(1-2): 67-75.
3. Chu VT, Beller A, Nguyen TT, Steinhauser G, Berek C. The long-term survival of plasma cells. *Scand J Immunol* 2011; 73(6): 508-11.
4. Chu VT, Berek C. The establishment of the plasma cell survival niche in the bone marrow. *Immunol Rev* 2013; 251(1): 177-88.
5. Burk KH, Drewinko B, Turjillo JM, Ahearn MJ. Establishment of a human plasma cell line in

- vitro. *Cancer Res* 1978; 38(8): 2508-13.
6. Sabrina Y, Ali M, Nakano H. In vitro generation of anti-hepatitis B monoclonal antibodies from a single plasma cell using single-cell RT-PCR and cell-free protein synthesis. *J Biosci Bioeng* 2010; 109(1): 75-82.
 7. Moser K, Tokoyoda K, Radbruch A, MacLennan I, Manz RA. Stromal niches, plasma cell differentiation and survival. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(3): 265-70.
 8. Minges Wols HA, Underhill GH, Kansas GS, Witte PL. The role of bone marrow-derived stromal cells in the maintenance of plasma cell longevity. *J Immunol* 2002; 169(8): 4213-21.
 9. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, Codoni G, Macagno A, Jarrossay D, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 2011; 333(6044): 850-6.
 10. Chu VT, Berek C. Immunization induces activation of bone marrow eosinophils required for plasma cell survival. *Eur J Immunol* 2012; 42(1): 130-7.
 11. Perez LA, Woessner S, Sole F, Florensa L, Bonet C. Chromosomal and in vitro culture studies in a case of primary plasma cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 76(1): 36-8.
 12. Cassese G, Arce S, Hauser AE, Lehnert K, Moewes B, Mostarac M, et al. Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 2003; 171(4): 1684-90.
 13. Meijer PJ, Nielsen LS, Allan JL. Human antibody repertoires. In: Dimitrov AS, editor. *Therapeutic antibodies: methods and protocols*. New York, NY: Human Press; 2009.
 14. Meijer PJ, Andersen PS, Haahr HM, Steinaa L, Jensen A, Lantto J, et al. Isolation of human antibody repertoires with preservation of the natural heavy and light chain pairing. *J Mol Biol* 2006; 358(3): 764-72.
 15. Lanzavecchia A, Corti D, Sallusto F. Human monoclonal antibodies by immortalization of memory B cells. *Curr Opin Biotechnol* 2007; 18(6): 523-8.
 16. Degraffi A, Hilbert DM, Rudikoff S, Anderson AO, Potter M, Coon HG. In vitro culture of primary plasmacytomas requires stromal cell feeder layers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(5): 2060-4.
 17. Coronella JA, Telleman P, Truong TD, Ylera F, Junghans RP. Amplification of IgG VH and VL (Fab) from single human plasma cells and B cells. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(20): E85.
 18. Wang X, Stollar BD. Human immunoglobulin variable region gene analysis by single cell RT-PCR. *J Immunol Methods* 2000; 244(1-2): 217-25.
 19. Tiller T, Meffre E, Yurasov S, Tsuiji M, Nussenzweig MC, Wardemann H. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning. *J Immunol Methods* 2008; 329(1-2): 112-24.

Isolation of Peripheral Blood Plasma Cells and Co-Culture with Bone Marrow Stromal Cells in Order to Long-Term Culture

Masoumeh Bazzaz MSc¹, Jalil Fallah-Mehrabadi PhD², Mahdi Mahdavi PhD³,
Mahdi Zeinoddini PhD²

Original Article

Abstract

Background: Single B cell antibody technology is a novel strategy to make human monoclonal antibody (mAb). Its main part is long-term culture of primary plasma cells (PC) to secrete antibody. PC survival in bone marrow is related to environmental signals, which should supply using a feeder cell monolayer during in-vitro culture of PCs. It seems that among different kinds of feeder cells, bone marrow stromal cells (BMSCs) are the best. The aim of this study was isolation of antibody secreting plasma cells from peripheral blood and surviving them during in-vitro culture.

Methods: After tetanus vaccination, Ig concentrations of serum samples were titrated using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. Isolated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of vaccinated donor were stained with three fluorescent anti CD38, anti CD19 and anti CD45 antibodies. Stained plasma cells were sorted into 96 wells using fluorescence-activated cell sorting (FACS) and cultured with BMSCs as feeder cell. After 10 days, in order to determine plasma cell survival, total RNA were extracted from plasma cells and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) method was performed using antibody specific primers.

Findings: 7 days after vaccination, the serum antibody titration of donor was 16 IU/ml, which confirmed provoking a good immune response against tetanus vaccination. Flow analysis of peripheral blood sample on seventh day showed the presence of 0.3% plasma cells in PBMCs. Using RT-PCR with primers specific for antibody gene, the amplification of a variable heavy chain (VH) gene segment with the size of 400 bp was done; this confirmed the plasma cells survival and antibody gene expression during co-culture with BMSCs.

Conclusion: The main result of this project was finding suitable pattern to isolate and survive plasma cells during 10 days in-vitro culture. Therefore, a part of single B cell antibody technology was established. Some of the results consist of percentage of plasma cells in PBMCs and the size of VH segment are in agreement with previous studies.

Keywords: Human monoclonal antibody, Plasma cell, Bone marrow stromal cell, Fluorescence-activated cell sorting (FACS), Co-culture

Citation: Bazzaz M, Fallah-Mehrabadi J, Mahdavi M, Zeinoddini M. Isolation of Peripheral Blood Plasma Cells and Co-Culture with Bone Marrow Stromal Cells in Order to Long-Term Culture. J Isfahan Med Sch 2014; 32(282): 534-43

1- Biosciences and Biotechnology Research Center, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Biosciences and Biotechnology Research Center, Malek Ashtar University of Technology, Tehran, Iran

3- Assistant Professor, Department of Immunology, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Corresponding Author: Jalil Fallah Mehrabadi PhD, Email: Jalil.fallah@gmail.com