مقاله پژوهشی

ارمغان دانش، مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی یاسوج
دوره ۲۲، شماره۲، خرداد و تیر ۱۳۹۶(شماره پی در پی۱۲۱)

مقایسه عملکردی مونوسیت‌های جدا شده از فلاسک‌های کشت در روش‌های لیدوکائین/EDTA ، تریپسین و PBS سرد/EDTA

هادی اسمعیلی گورچین قلعه[۱]، سید میثم ابطحی فروشانی[۱*]، ناهیده افضل آهنگران[۱]، سیامک ناجی حدادی[۲]

[۱] گروه میکروبیولوژی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران، [۲]گروه پاتولوژی، مرکز سالید تومور، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران

تاریخ وصول : ۱۳۹۵/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۳/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: دسترسی آسان، استحصال سریع و پتانسیل بالای درمانی سلول‌های مونوسیت، موجب شده که در تحقیقات سلول درمانی توجه ویژه‌ای به این سلول شود. مونوسیت‌ها از جمله سلول‌های چسبنده به فلاسک محسوب می‌شوند، بنابراین یافتن روش جداسازی مناسب که کمترین آسیب به سلول و عملکرد آن برساند از اهمیت خاصی برخوردار است. هدف از این مطالعه مقایسه قابلیت‌های عملکردی مونوسیت بعد از جداسازی با سه روش لیدوکائین/EDTA ، تریپسین و PBS سرد/EDTA بود..

روش بررسی: در این مطالعه تجربی،بعد از استخراج سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی از موش بالب سی، سلول‌ها(۱×۱۰^{۷} سلول در میلی لیتر) در محیط کشت RPMI در فلاسک کشت T25 به مدت ۴ ساعت انکوبه شدند. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌های غیر چسبنده (عمدتاً لنفوسیت‌ها) با دو بار شستشوی آرام جدا شده و از فلاسک خارج شد. سپس برای جداسازی سلول‌های مونوسیت چسبیده از ۳ روش تریپسین، روش لیدوکائین و فسفات بافر سالین سرد استفاده و بعد از جداسازی سلول‌ها با هر روش، قابلیت‌های عملکردی مونوسیت‌ها سنجیده شد و با هم دیگر مقایسه شدند. داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده آنالیز واریانس یک طرفه تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: میزان استحصال، زنده مانی، فعالیت متابولیک، درصد فاگوسیتوز، انفجار تنفسی، میزان نیتریک اکساید و قابلیت مخمر کشی در سلول‌هایی که با روش لیدوکائین جداشده بودند، نسبت به گروه‌های دیگر به طور معنی‌داری بیشتر بود. هرچند که شیوه استفاده از تریپسین با وجود اینکه موجب استحصال سلول بیشتری نسبت به روش PBS سرد می‌شود، ولی این سلول‌ها در مقایسه با روش لیدوکائین/EDTA و یا PBS سرد/EDTA، اختلال فیزیولوژیک قابل توجهی دارند. برداشت نوترال رد به وسیله سلول‌های مونوسیت جداسازی شده با روش تریپسین نسبت به دو روش دیگر در سطح پایین‌تری بود. در مقایسه بین شیوه PBS سرد و لیدوکائین به نظر می‌رسد که بین مونوسیت‌های به دست آمده از دو روش فوق، از نظر برداشت نوترال رد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

نتیجه‌گیری: در مقایسه با روش‌های تریپسین وPBS سرد/EDTA، روش لیدوکائین/EDTA یک مناسب جهت جداسازی مونوسیت‌های چسبیده به کف فلاسک به دلیل استحصال سلول‌های بشتر و کارآمد می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: جداسازی، عملکرد، مونوسیت، لیدوکائین، تریپسین، بافر فسفات سالین

[*]**نویسنده مسئول: سید میثم ابطحی فروشانی**، ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، گروه میکروب شناسی
Email: meysamabtahi@hotmail.com

مقدمه

سلول‌های مونوسیت دسته‌ای از لکوسیت‌ها بوده که نقش کلیدی در فرآیند التهاب، دفاع علیه پاتوژن‌ها و برقراری هموئستازی دارند. آنها از پیش‌سازهای میلوئیدی موجود در مغز استخوان نشأت گرفته و از طریق جریان خون به بافت‌های محیطی مهاجرت می‌کنند(۲ و۱). مونوسیت‌ها در انسان ۱۰ درصد و در موش ۴ درصد جمعیت گلبول-های سفید را به خود اختصاص می‌دهند. مونوسیت‌ها در بافت‌های التهابی یا آسیب دیده توانایی تمایز به سلول‌های دندریتیک و ماکروفاژ را دارا بوده و به واسطه این قابلیت تمایزشان، در هر دو پاسخ ایمنی ذاتی و اختصاصی علیه بیماری‌های مختلف شرکت می‌کنند. هم‌چنین جمعیت قابل توجهی از مونوسیت‌ها در طحال و ریه حضور دارند که توانایی مهاجرت به بافت‌های دیگر را دارند(۴ و۳). قابلیت فاگوسیتوز سلول‌های مونوسیت در سال ۱۸۸۰ به وسیله مچنیکوف کشف شد و بعد از آن مشخص شد که در پاسخ‌های ایمونولوژیکی علیه پاتوژن‌ها و بیماری‌های مختلف حضورشان ضروری است. اگرچه سلول‌های مونوسیت در دفاع علیه باکتری‌ها، قارچ‌ها، ویروس‌ها و پروتوزآهای مهاجم و از بین بردن آنها نقش چشمگیری دارند به واسطه عملکردشان در حفظ هموئستاز با اعمال اثرات بازدارنده جلوی آسیب بافتی بیش از حد بیماری‌های التهابی و تخریب کننده را می‌گیرند(۶ و۵). سلول‌های مونوسیت خون محیطی از جمله مهم‌ترین منابع تولید سلول‌های دندریتیک می‌باشند. فاگوسیتوز آنتی ژن‌های توموری و عرضه آنها به وسیله سلول‌های دندرتیک مشتق شده از سلول‌های مونوسیت اهمیت فوق العاده‌ای در موفقیت ایمونوتراپی دارند(۷).

بر اساس دانسته‌های کنونی به نظر می‌رسد که سلول‌های مونوسیت پس از مهاجرت آنها به بافت (ماکروفاژها و سلول‌های دندرتیک) براساس ریزمحیط اطرافی چندین فنوتیپ مختلف را پیدا می‌کنند(۸). به طور مثال نشان داده شده است که مونوسیت‌ها پس از مهاجرت به بافت بسته به شرایط قادر به تبدیل به حداقل دو نوع ماکروفاژ می‌باشند. این فنوتیپ‌ها از لحاظ سایتوکاین‌ها، کموکاین‌ها، گیرنده‌های لیگاند و عملکرد با یکدیگر متفاوتند. ماکروفاژهای کلاسیک یا M1 گروهی از این ماکروفاژها با خاصیت ضدمیکروبی و التهابی قوی بوده که در پاتوژنز بیماری‌های التهابی و خود ایمن و هم‌چنین دفاع ضد توموری نقش فعالی دارند(۹). ماکروفاژهای M2 یا ماکروفاژهای فعال شده از مسیر آلترناتیو(جایگزین) به میزان کمتری از سایتوکاین‌های التهابی را نسبت به ماکروفاژهای M1 ، تولید کرده و در عوض نقش مهمی را در بازسازی و ترمیم آسیب‌های بافتی ایجاد می‌کنند. این سلول‌ها نسبت به ماکروفاژهای M1 قابلیت میکروب‌کشی به مراتب کمتری دارند، ولی در عوض در مراحل پایانی بیماری‌های خود ایمن مثل روماتوئید آرتریت نقش بسیار مهمی را بازی می‌کنند(۱۰). مطالعه‌های اخیر پیشنهاد داده است که سلول‌های مونوسیت موجود در

گردش خون به دلیل دارا بودن قابلیت‌هایی از قبیل دسترسی آسان به بافت‌ها و لانه گزینی دایمی در آنها و هم‌چنین توانایی تبدیل آنها به ماکروفاژها، پتانسیل بسیار بالایی برای ایجاد درمان‌های مبتنی بر استفاده از مونوسیت‌ها فراهم می‌آورند. کارآمدی این رهیافت در یک بیماری نادر ژنتیکی تحت عنوان اثبات Pulmonary alveolar proteinosis شده است(۱۱). هم‌چنین مونوسیت‌ها امکان برنامه‌ریزی مجدد و تبدیل به انواع دیگر سلول‌ها از قبیل سلول‌های انسولین ساز را دارند. نکته جالب این که استفاده از مونوسیت‌ها در این شرایط به دلیل آن که به راحتی از خون خود فرد گرفته می‌شود، مشکلات معمول پیوند و ناسازگاری بافتی را نخواهد داشت. این قابلیت‌های ممتاز مونوسیت موجب شده که به عنوان هدف کلیدی در درمان بیماری‌ها مورد توجه محققان قرار گیرد.

طبیعتاً اولین قدم در این امر جداسازی سلول‌های مونوسیت از خون محیطی است. ارزان‌ترین روش برای دست یابی به سلول‌های مونوسیت خون محیطی، جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای و کشت آنها در فلاسک‌های کشت به مدت ۲ تا ۴ ساعت است. پس از طی این مدت سلول‌های مونوسیت به کف فلاسک می‌چسبند و به این ترتیب از سایر سلول‌های تک هسته‌ای جدا می‌شوند. برای جداسازی سلول‌های مونوسیت چسبیده به سطوح پلاستیکی روش‌های مختلفی وجود دارد، ولی با توجه به موارد ذکر شده انتخاب یک روش جداسازی که با کمترین آسیب سلولی و بیشترین جداسازی سلولی همراه باشد، حایز اهمیت است. از جمله روش‌های رایج و ارزان قیمت برای جداسازی سلول‌های چسبنده به فلاسک از قبیل مونوسیت/ ماکروفاژها می‌توان به استفاده از PBS سرد به همراه EDTA، روش آنزیم تریپسین به همراه EDTA و روش لیدوکائین به همراه EDTA اشاره کرد(۱۲و۱۳). با این حال به نظر نمی‌رسد که تا کنون مطالعه دقیقی در مورد تفاوت‌های عملکردی مونوسیت‌های جدا شده به شیوه‌های مختلف انجام شده باشد. هدف از مطالعه حاضر مقایسه روش‌های مذکور در جهت یافتن روشی مناسب با کمترین آسیب سلولی و بیشترین میزان سلول برای دست یابی به نتایج بهتر در مطالعه‌های سلول درمانی با مونوسیت-ها می‌باشد.

روش‌بررسی

در این مطالعه تجربی برای جداسازی مونوسیت از خون محیطی از موش‌های بالب سی با محدوده سنی ۶ تا ۸ هفته که از انستیتو پاستور ایران خریداری شده بودند استفاده شد. این موش‌ها در شرایط استاندارد آب، غذا، دما و نور کافی بر اساس پروتکل‌های بین المللی استفاده از حیوانات آزمایشگاهی نگهداری شدند. پس از طی زمان مورد نظر برای تطابق موش‌ها(۱ هفته)، خون‌گیری جهت استحصال مونوسیت انجام شد. در این پژوهش ملاحظات اخلاقی کار با حیوانات آزمایشگاهی به وسیله شورای اخلاق پژوهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، منطبق بر اساس دستورالعمل وزارت

بهداشت ، درمان و آموزش پزشکی جمهوری اسلامی ایران مورد تایید قرار گرفت.

برای جدا سازی مونوسیت‌ها، خون هپارینه استحصال شده از قلب حیوان را با محیط کشت RPMI-1640 رقیق کرده و سپس به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده است، اضافه شد. مجموع خون رقیق شده و فایکول با سرعت ۸۰۰ گرم به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(PBMC) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده جمع شده بودند به آرامی جمع‌آوری شد. PBMC به دست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن، با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و با سرعت ۴۵۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سلول‌های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI-1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت همراه PBMC با سرعت ۲۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. تعداد و میزان سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دست آمده، با استفاده از رنگ تری‌پان بلو تعیین گردید و نهایتاً تعداد 1×10^{7} سلول PBMC به یک فلاسک T25 به همراه محیط کشت RPMI-1640، L-گلوتامین ۲ میلی مولار، ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر پنی‌سیلین، ۱۰۰ میکرو گرم بر میلی لیتر استرپتومایسین، ۱۰ درصد FBS اضافه گردید. بعد از ۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ درصد CO2 و ۹۰ درصد رطوبت مایع رویی که حاوی کلیه سلول‌های تک هسته‌ای به جز مونوسیت‌ها بودند با دو بار شستشوی آرام حذف شدند(۱۴).

در این مطالعه از سه روش، روش لیدوکائین/EDTA (به هر فلاسک ۱۰ـ۵ میلی‌لیتر بافر PBS سرد بدون کلسیم و منیزیم به همراه EDTA (۱۰ میلی مولار) و لیدوکائین(۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر))، روش آنزیمی تریپسین(۴ـ۲ میلی‌لیتر تریپسین ۰/۲۵ درصد به همراه EDTA ۰/۰۲ درصد) و روش PBS سرد(به هر فلاسک ۱۰ـ۵ میلی‌لیتر PBS سرد همراه با EDTA(۱۰ میلی مولار)) برای جداسازی مونوسیت‌های چسبیده استفاده شد. بعد از اضافه کردن محلول‌های مورد نظر به مدت ۲۰ـ۱۵ دقیقه فلاسک را به آرامی تکان داده تا سلول‌ها جدا شوند. سلول‌ها سپس سه بار با بافر PBS شسته شدند، سپس سلول‌های تخلیص شده با هر روش به صورت جدا گانه از نظر میکروسکوپی و قابلیت‌های عملکردی مورد بررسی قرار گرفتند(۱۳ و۱۲).

برای غشاء سلول‌های مرده به رنگ‌ها نفوذپذیر است در حالی که در سلول‌های زنده غشا سلولی به رنگ نفوذناپذیر است. تریپان بلو از جمله رنگ‌هایی است که برای تمایز سلول‌های زنده از مرده به وسیله میکروسکوپ نوری به کار می‌رود. سلول‌های مرده در زیر میکروسکوپ آبی رنگ هستند و سلول‌های سالم رنگ نمی‌گیرند. درصد سلول‌ها با استفاده از لام نئوبار محاسبه می‌شود. نحوه شمارش سلول‌های مونوسیت بدین صورت بود که ۲۵ میکرولیتر از محیط کشت حاوی سلول‌های مورد نظر با ۲۵ میکرولیتر از رنگ تریپان بلو داخل پلیت ۹۶ خانه بخوبی مخلوط شد. سپس ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مخلوط شده با سمپلر روی لام

نئوبار به همراه لامل منتقل شد. تعداد سلول‌های زنده(شفاف) و سلول‌های مرده (آبی رنگ) در پنج خانه لام نئوبار زیر میکروسکوپ نوری شمارش شده و به کمک فرمول ذیل تعداد کل سلول‌ها و درصد سلول‌های زنده تعیین شد(۱۵).

$$N=n\times5\times2\times10^4$$

میانگین سلول‌های شمارش شده در پنج خانه =n

تعداد کل سلول‌ها در هر ml =N

در نهایت به منظور انجام آزمون‌های مرتبط با عملکردهای فیزیولوژیک سلول‌های مونوسیت استحصالی از یک سوسپانسیون حاوی ۱×۱۰^۶ سلول زنده در هر میلی‌لیتر تهیه شد.

برای بررسی قابلیت حیاتی(MTT)، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مونوسیت (۱×۱۰^۶ سلول در میلی‌لیتر) حاصل از هر روش جداسازی به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته و انکوباسیون به مدت چهار ساعت انجام شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT(۵ میلی گرم در میلی‌لیتر) به چاهک‌ها اضافه شد و بعد از مدت ۲۰ دقیقه انکوباسیون با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO کریستال‌های فورمازون حل شده و نتیجه در طول موج ۴۹۰ نانومتر قرائت شد(۱۶).

به منظور ارزیابی برداشت نوترال به وسیله مونوسیت‌های حاصل از روش‌های مختلف جداسازی به طور خلاصه، محلول ۰/۳۳ درصد نوترال رد (سیگما- آمریکا) به میزان ۱۰ درصد محیط کشت مونوسیت‌ها اضافه گردید و سلول‌ها به مدت ۲ ساعت انکوبه شدند. بعد از طی این مدت زمان محیط کشت خارج شده و سلول‌ها سه بار با بافر فسفات شسته شدند. پس از شستشوی سلول‌ها، هم حجم محیط کشت اولیه از محیط حاوی ۱ درصد اسید استیک در اتانول ۵۰ درجه به مدت ده دقیقه افزوده و به آرامی شیک شدند. در نهایت دانسیته نوری(Optical Doncity) ۲۰۰ میکرولیتر از محلول با دستگاه الایزا ریدر و طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین شد(۱۷).

به منظور قابلیت فاگوسیتوز و میکروب کشی مونوسیت‌ها، نیم میلی‌لیتر سوسپانسیون مونوسیت (۱×۱۰^۶ سلول در میلی‌لیتر) به عنوان گروه تست(T) و و نیم میلی‌لیتر بافر PBS با به عنوان گروه شاهد(C) با ۱۰۰ میکرولیتر سرم موش بالب سی به مدت ۵ دقیقه انکوبه شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر مخمر *کاندیدا آلبیکنس* (۱×۱۰^۶ در میلی‌لیتر) در بافر PBS به هر دو گروه تست و شاهد اضافه شد. در مرحله بعدی از هر دو لوله تست و شاهد به میزان ۱۰ میکرولیتر در زمان‌های صفر و ۹۰ دقیقه نمونه بر می‌داریم، سپس ده میلی‌لیتر آب مقطر(pH:۱۱) اضافه و پیپتینگ کرده و ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون تهیه شده به هرخانه از پلیت ۹۶ خانه ته‌تخت اضاف شد. در نهایت ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر خانه اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO کریستال‌های فورمازون حل شده و نتیجه در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت

شد. برای محاسبه درصد باکتری کشی از این رابطه زیر استفاده شد.

$$KILLING\% = 100 - \frac{100 \times ODT90}{ODT0}$$

به منظور تعیین درصد فاگوسیتوز با استفاده از سانتریفیوژ تفریقی(مدت ده دقیقه در ۱۵۰ گرم در چهار درجه سانتی‌گراد)، باکتری‌های فاگوسیت نشده پس از ۹۰ دقیقه انکوباسیون جدا شده و تعداد آن‌ها به شیوه افزودن ۲۰ میکرولیتر از محلول MTT (۵ میلی‌گرم در یک میلی‌لیتر PBS)، ۳۰ دقیقه انکوباسیون و افزودن ۱۵۰ میکرولیتر DMSO، حل شدن کریستال‌های فورمازون و در نهایت قرائت نتیجه در طول موج ۴۹۲ نانومتر MTT با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد(۱۸).

$$PHAGOCYTOSIS\% = 100 \times (ODT90 - \frac{\frac{E}{G}}{ODT0})$$

$$G = \frac{ODC90}{ODC0}$$

به منظور ارزیابی میزان پایه(غیر اختصاصی) تولید رادیکال‌های آزاد به وسیله مونوسیت‌ها از روش داویس و همکاران استفاده شد. به طور خلاصه، سوسپانسون مونوسیت‌ها(1×10^6 سلول در میلی‌لیتر) به مدت ۲۰ دقیقه با تترادکانوئیل فوربول استات (سیگما- آ مریکا) در غلظت نهایی ۱۰۰ میلی گرم بر نانوگرم به همراه یک دهم درصد نیتروبلوتترازولیوم(سیگما ـ آمریکا) به پلیت‌های ۲۴ خانه حاوی مونوسیت افزوده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. به هر چاهک ۴۰۰ میکرولیتر از ماده دی متیل فورمایدسیگما ــ آمریکا) اضافه شد و چند دقیقه محتوای پلیت شیک شد. آنگاه ۲۰۰ میکرولیتر از مایع رویی از هریک از خانه‌ها را در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته و نتیجه با الایزا نگار در طول موج ۴۹۲ نانومتر قرائت شد(۱۷).

جهت سنجش نیتریک اکساید از روش گریس استفاده شد. اختصاراً، از محلول ۰/۱ مولار سدیم نیتریت، یک غلظت ۱۰۰ میکرومولار تهیه و از این غلظت رقت‌های سریال سه تایی (به عنوان غلظت‌های استاندارد جهت رسم منحنی استاندارد) تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مونوسیت (1×10^6 سلول در میلی‌لیتر) در هر یک از خانه‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سولفانیل آمید (یک گرم سولفانیل آمید در ۱۰۰ سی‌سی اسید فسفوریک ۵ درصد) به تمام خانه‌های حاوی نمونه و استاندارد اضافه گردید. پلیت به مدت ۱۰ـ ۵ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق انکوبه شد. به تمام خانه‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول NED (N-۱-نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید) اضافه و مجدد پلیت به مدت ۱۰ـ ۵ دقیقه در تاریکی و درجه حرارت اتاق انکوبه شد. جذب نوری حداکثر پس از نیم ساعت با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۰ نانومتر قرائت شد و از روی منحنی استاندارد میزان نیتریت در نمونه‌ها تعیین گردید(۱۶).

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون‌های آماری آنوا یک طرفه و تست تعقیبی توکی تجزیه و تحلیل شدند..

یافته‌ها

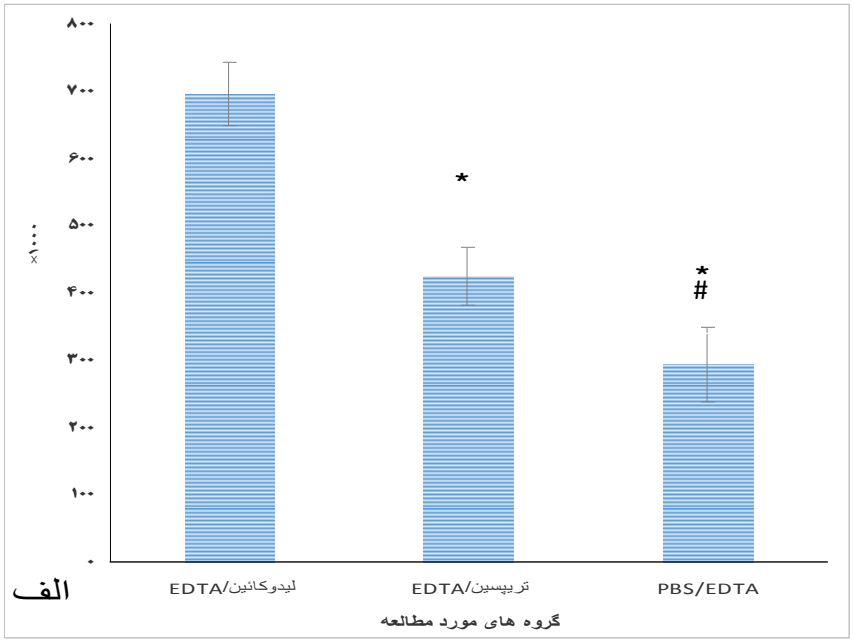
تریپان بلو یک رنگ حیاتی است که تنها وارد سلول‌های مرده می‌شود، بنابراین به عنوان یک روش ساده و کارآمد جهت شمارش و تعیین درصد زنده مانی مونوسیت‌ها به کار می‌رود. بر اساس نمودار ۱ به نظر می رسد که به طور معنی‌داری بین میزان استحصال و درصد زنده مانی مونوسیت‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. بیشترین میزان سلول‌های استحصالی و همچنین بالاترین درصد سلول‌های زنده مرتبط با گروه مونوسیت‌های چسبیده و تیمار شده با لیدوکائین می‌باشد. در مقایسه بین شیوه PBS سرد/EDTA و تریپسین به نظر می‌رسد که در روش ترپسین/EDTA تعداد سلول بیشتری نسبت به روش PBS سرد/EDTA استحصال می‌شود، هرچند که در نهایت درصد سلول‌های زنده در گروه PBS سرد/EDTA از گروه ترپسین/EDTA بیشتر است.

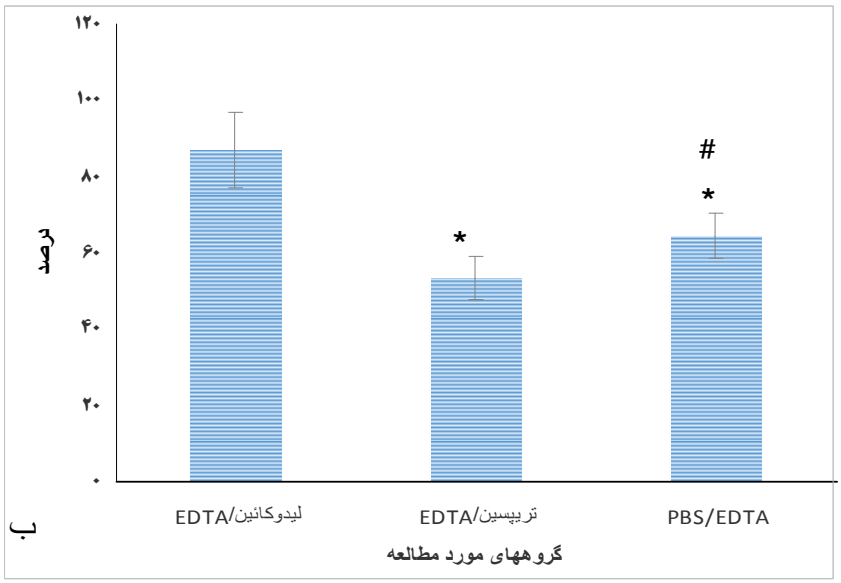
بر اساس جدول۱ مقایسه آماری نشان داد که قابلیت برداشت نوترال رد به وسیله سلول‌های مونوسیت جداسازی شده با روش تریپسین نسبت به دو روش دیگر در سطح پایین تری می‌باشد. در مقایسه بین شیوه PBS سرد/EDTA و لیدوکائین به نظر می رسد که بین مونوسیت‌های به دست آمده از دو روش فوق اختلاف معنی‌داری وجود ندارد.

میزان احیای MTT به کریستال‌های آبی فورمازون به وسیله میتوکندری مونوسیت‌ها شاخصی از فعالیت متابولیک این سلول‌ها می باشد. در بررسی میزان فعالیت متابولیک سلول‌های مونوسیت با روش MTT، جدول۱ نیز مشخص گردید که بین فعالیت متابولیک مونوسیت‌های جداشده اختلاف معنی‌داری وجود دارد به طوری که بیشترین میزان آن مربوط به مونوسیت‌های جداسازی شده با روش لیدوکائین و کمترین آن مربوط به روش تریپسین می‌باشد.

تست ارزیابی فاگوسیتوز که در این مطالعه استفاده شد، ارزیابی کلی از قابلیت برداشت به وسیله سلول‌های مونوسیت را ارایه می‌دهد. بعد از تیمار مونوسیت با مخمر اپسونیزه شده، سلول‌های مونوسیت با استفاده از گیرنده‌های اپسونیک خود اقدام به برداشت مخمر کرده و آن‌ها را نابود می‌کند. بر این اساس به نظر می‌رسد که قابلیت فاگوسیتوز و همچنین کشتار مخمر مخمر اپسونیزه در مونوسیت‌های جدا شده با روش لیدوکائین نسبت به دو روش دیگر بیشتر می‌باشد. همچنین در اینجا نیز سلول‌های جداشده از روش PBS سرد نسبت به روش تریپسین به طور معنی‌داری از نظر آماری کارآمدتر بودند.

همچنین بر اساس نتایج به نظر می‌رسد که میزان احیای NBT و احیای نیترات در تست گریس به وسیله مونوسیت‌های جداسازی شده با روش لیدوکائین نسبت به روش‌های دیگر بالاتر بود($p<۰/۰۰۱$). در اینجا نیز در مقایسه بین شیوه PBS سرد و تریپسین به نظر می‌رسد که مونوسیت‌های به دست آمده ار روش تریپسین سرد، قابلیت انفجار تنفسی کمتری را دارا هستند($p<۰/۰۰۱$).





نمودار۱: الف ـ مقایسه شمارش سلولی ب ـ مقایسه درصد زنده مانی سلول‌های مونوسیت در گروه‌های مختلف. * نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه لیدوکائین / EDTA است. # نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۱. نسبت به گروه تریپسین/EDTA است.

جدول۱: الف ـ مقایسه فعالیت متابولیک (تست MTT) و برداشت نوترال رد بین مونوسیت های جداسازی شده با روش های مختلف.

روش‌های جداسازی	آزمون احیای MTT	برداشت نوترال رد
لیدو کائین/EDTA	۰/۵۲۷ ± ۰/۰۳۳	۰/۹۱۹ ± ۰/۰۶۳
PBS سرد/EDTA	۰/۴۷۶ ± ۰/۰۲۱ *#	۱/۲۱ ± ۰/۰۵۱ *
تریپسین/EDTA	۰/۴۰۱ ± ۰/۰۲۳ *	۰/۸۰۵ ± ۰/۰۴۸ *

* نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۱ نسبت به گروه لیدوکائین / EDTA است. # نشان دهنده اختلاف معنی دار در سطح p<۰/۰۱ نسبت به گروه تریپسین/EDTA است.

جدول ۲: مقایسه عملکردهای فیزیولوژیک بین مونوسیت های جداسازی شده با روش های مختلف

روش‌های جداسازی	میزان فاگوسیتوز	میزان مخمر کشی	میزان نیتریک اکساید	میزان انفجار تنفسی
لیدو کائین/ EDTA	۶۱/۶۶ ± ۳/۰۵	۵۰/۲۵ ± ۲/۰۸	۷۱/۳۳ ± ۷/۰۹	۰/۶۵۹ ± ۰/۰۱۳
PBS سرد/ EDTA	۵۲/۳۳ ± ۳/۵۱ *#	۴۳/۰۹ ± ۱/۴۶ *#	۵۶/۲۴ ± ۵/۷۷ *#	۰/۵۴۶ ± ۰/۰۲۵ *#
تریپسین/ EDTA	۴۱/۰۵ ± ۲/۴۱ *	۳۵/۶۱ ± ۲/۱۲ *	۴۳/۲۱ ± ۵/۰۳ *	۰/۴۹۱ ± ۰/۰۱۸ *

* نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۱ نسبت به گروه لیدوکائین /EDTA است. # نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح p<۰/۰۰۱ نسبت به گروه تریپسین/EDTA است.

بحث

مونوسیت‌ها و ماکروفاژها در طیف وسیعی از تحقیق‌های ایمونولوژی به ویژه در مطالعه‌های مربوط به ارگانیسم‌ها و انگل‌های درون سلولی کاربرد دارند. امروزه ایمونوتراپی بیماری‌های مختلف به ویژه سرطان با سلول‌های یاد شده یا تمایز آنها به انواع مختلف بیشتر مورد توجه بوده است. به عنوان مثال استفاده کلینیکی از سلول‌های دندریتیک بالغ شده با هدف خاص، سهم عظیمی از مطالعات ایمونوتراپی را به خود اختصاص داده که دسترسی به سلول‌های دندریتیک با جداسازی سلول‌های مونوسیت امکان پذیر خواهد بود(۱۹). یک مشکل اساسی مطرح در زمینه ایمونوتراپی با سلول‌های دندریتیک این است که تضمینی برای دسترسی به تعداد کافی سلول جهت درمان وجود ندارد که این تضمین ارتباط مستقیمی با جداسازی جمعیت کافی از سلول‌های مونوسیت با عملکرد بالا دارد. بنابراین یافتن روش ایده آل با ویژگی‌هایی از قبیل اجرای آسان، ارزان قیمت، دست یابی به سلول مونوسیت با خلوص و عملکرد بالا همواره مورد توجه بوده است(۲۰). در این مطالعه سه روش مختلف جداسازی مونوسیت برای دست یابی به روشی که مونوسیت کمترین آسیب را متحمل شود، با هم مقایسه گردید.

جداسازی مونوسیت با تکیه بر روش چسبندگی این سلول‌ها به پلاستیک بسیار آسان و سریع بوده و نیازمند تجهیزات پیشرفته و گران قیمت نیست، اگرچه این خاصیت چسبندگی سلول‌های مونوسیت نیازمند بیان ژن و ترشح پروتئین‌های دخیل می‌باشد. در جداسازی بر اساس خاصیت سدیمنتاسیونی ذرات کلوئیدی نقش مهمی را در فعال کردن مونوسیت‌ها برخوردار هستند(۲۱). با مروری بر منابع موجود، روشهای مختلفی برای جداسازی این مونوسیت‌ها، ارایه شده است که متداول‌ترین آنها جداسازی به روش MACS (Magnetic Activated Cell Sorting) می‌باشد. از مزایای این روش می‌توان به خلوص و زنده مانی بالای آن اشاره کرد، اما هزینه بالای استفاده از آن و احتمال فعل شدن مسیرهای سیگنال‌دهی سلولی به دلیل اتصال آنتی‌بادی، استفاده از این روش را محدود کرده است(۲۳و۲۲). تخلیص مونوسیت‌ها از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی به دلیل چسبندگی آنها به سطوح پلی‌استیرن فلاسک‌های کشت سلولی یک مزیت است. مشکل

اساسی در این بین یافتن شیوه مناسب با حداقل آسیب سلولی و یا عملکردی، جهت جداساختن این سلول‌ها از کف فلاسک می‌باشد(۲۲). بیک زاده و همکاران به منظور افزایش استحصال مونوسیتهای زنده از کف فلاسک با استفاده از PBS سرد/EDTA، پوشانیدن قبلی کف فلاسک را با مخلوط ژلاتین ـ پلاسما پیشنهاد کردند(۲۴). محققین میزان استحصال سلول‌های زنده را در این روش با روش MACS قابل رقابت دانستند(۲۴)، هر چند که عملکردهای فیزیولوژیک مونوسیت‌ها در این تحقیق مورد بررسی قرار نگرفت.

اولین مرحله از مطالعه ما زمانی شروع شد که مونوسیت‌های موجود در میان سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی(PBMC) بعد از جداسازی با فایکول ـ هایپک به کف فلاسک چسبیدند. جداسازی مونوسیت بعد از چسبندگی با این که ساده به نظر می‌رسد، ولی دارای معایب و محدودیت‌هایی از قبیل حضور درصد بالای لنفوسیتی، انعطاف‌پذیری پایین، قابلیت فعال شدن و دستکاری بالای مونوسیت‌ها می‌باشد. درصد جمعیت لنفوسیتی در ساعات اولیه جداسازی ممکن است بالا باشد، ولی اغلب با چند بار شستشو این لنفوسیت‌ها از محیط خارج می‌شوند(۲۶ و۲۵).

در گذشته نشان داده شده است که استفاده از محلول سرد PBS بدون کلسیم، منیزیم و EDTA، اتصالات کلسیمی بین سلولی به وسیله EDTA شلاته می شود. در این شرایط سرد بودن محلول کمک به جدا شدن بهتر سلول‌ها از سطح فلاسک می‌کند. استفاده از تریپسین/EDTA نیز از مرسوم‌ترین روش‌های جداسازی سلول‌های چسبنده به فلاسک از قبیل سلول‌های بنیادی مزانشیمال و سلول‌های توموری است. تریپسین به نسبت یک ماده گران قیمت بوده که کار با آن به دلیل ماهیت پروتئولایتیک و آسیب‌رسان آن به سلول‌ها، نیازمند دقت بسیار زیاد و بهینه سازی دقیق در مورد هر آزمایشگاه و هر رده سلولی است، به طوری که در صورت عدم رعایت شرایط به راحتی سلول‌های چسبیده از بین خواهند رفت(۲۷).

مدت‌های مدیدی است که از لیدوکائین به عنوان یک بی حس کننده موضعی جهت مهار پیام‌های عصبی مرتبط با درد و همچنین ممانعت و یا درمان آریتمی بطنی قلب استفاده می‌شود. اثرات بی حس کننده لیدوکائین عمدتا از طریق تأثیرگذاری بر کانال‌های سدیمی و کاهش نفوذپذیری این غشا به یون سدیم صورت می‌گیرد. مطالعه‌های گذشته به خوبی مشخص کرده است که لیدوکائین دارای حداقل اثر بر میزان زنده مانی سلول‌های مونوسیت می‌باشد(۲۸). نتایج مطالعه حاضر نیز نشان داد که بیشترین میزان زنده مانی و استحصال سلول‌های مونوسیت چسبنیده مربوط به لیدوکائین می‌باشد. بنابراین به نظر می‌رسد که تغییرات غشایی که نتیجه تأثیر لیدوکائین بر غشاء سلول‌ها است به راحتی منجر به جداسازی این سلول‌ها می‌شود. همچنین بر این اساس به نظر می‌رسد که شیوه استفاده از تریپسین

با وجود این که موجب استحصال سلول بیشتری نسبت به روش PBS سرد می‌شود، ولی این سلول‌ها در مقایسه با روش لیدوکائین/EDTA و یا PBS سرد/EDTA، اختلال فیزیولوژیک قابل توجهی دارند. در این بین همان‌طور که احتمال می‌رفت، به دلیل امکان آسیب سلولی به وسیله تریپسین، وجود جداسازی سلول بیشتر در مقایسه با روش PBS سرد/EDTA در روش تریپسین، سلول‌های زنده کمتری به دست آمد. قابلیت بالای لیدوکائین در به دست آوردن مونوسیت‌های با خلوص بالا از سلول‌های تک هسته‌ای خون محیطی انسان قبلاً نشان داده شده است(۲۹).

جهت سنجش فعالیت حیاتی سلول‌ها از دو تست برداشت NR و احیای MTT استفاده شد. نکته لازم این قابلیت حیاتی الزاما با زنده مانی سلول‌ها یکسان نیست. زنده مانی سلولها عمدتاً بر اساس میزان ورود یک رنگ حیاتی از قبیل تریپان بلو به سلول‌ها سنجیده می‌شود. بر این اساس سلولهای مرده(سلول‌هایی که به مرحله نهایی مرگ رسیده‌اند) به دلیل اختلال غشایی رنگ وارد سیتوپلاسم آنها می‌شود . بنابراین هر سلولی که در تست تریپان بلو به عنوان یک سلول زنده قلمداد شود، الزاما دارای قدرت حیاتی و فعالیتهای متابولیک یک سلول زنده نیست(۳۰). در این مطالعه جهت سنجش قدرت حیاتی عملکرد دو قسمت اصلی سلول یعنی غشاء سلولی به عنوان عامل اصلی حفظ تمامیت غشائی و میتوکندری سلول‌ها به عنوان هسته اصلی متابولیزم هوازی سلولی سنجیده شد.

بیشترین میزان سلول‌های استحصالی و هم‌چنین بالاترین درصد سلولهای زنده مرتبط با گروه مونوسیت‌های تیمار شده با لیدوکائین می‌باشد. بر همین اساس به نظر می‌رسد که با وجودی که روش تریپسن سلول‌های زیادتری را نسبت به روش PBS سرد جدا می‌کند، با این سلول‌های زنده کمتری در این روش به دست می‌آید.

نوترال رد یک رنگ کاتیونی است که به شیوه اندوسیتوز به وسیله سلول‌های با قابلیت غشایی مناسبی برداشت شده و در بخش لیزوزوم تغلیظ می‌گردد. برداشت نوترال رد می‌تواند که به عنوان شاخصی از قابلیت حیاتی غشای سلولی و بخش لیزوزومی سلول‌های مونوسیت در نظر گرفته شود(۳۱). بر اساس نتایج ما به نظر می‌رسد که قابلیت برداشت نوترال رد در شیوه PBS سرد/EDTA نسبت به سایر روش‌ها بیشتر حفظ می‌شود. روش لیدوکائین نیز به دلیل تغییر در قابلیت‌های غشایی، احتمالاً اندوسیتوز غشایی را اندکی نسبت به روشPBS کاهش می‌دهد.

ماده MTT پس از برداشت سلولی به واسطه فعالیت چرخه انتقال الکترون به کریستال‌های نامحلول فورمازون تبدیل می‌شود. افزودن ماده DMSO موجب حل شدن این کریستال‌ها می‌شود. میزان احیای MTT به کریستال‌های آبی فورمازون که به وسیله اسپکترفوتومتر خوانده می‌شود، شاخصی از فعالیت متابولیک این سلول‌ها می باشد(۳۲). در اینجا نیز به نظر می‌رسد لیدوکائین به دلیل تأثیرات جزئی و

محدود به غشاء خود موجب اختلال کمتری نسبت به سایر روش‌ها شده است.

قابلیت فاگوسیتوز و تخریب عامل فاگوسیت شده، یکی از مهم ترین ویژگی‌های سلول‌های مونوسیت است. سلول‌های فاگوسیت کننده از قبیل مونوسیت‌ها برای برداشت آنتی ژن‌های مختلف از گیرنده‌های مختلف و مکانیسم‌های پیچیده‌ای استفاده می‌کنند(۲۷ و۷). نتایج حاضر نشان داد که میزان قابلیت فاگوسیتوز و قابلیت مخمر کشی سلول‌های مونوسیت در روش‌های جداسازی با تریپسین و PBS سرد نسبت به روش لیدوکائین کاهش یافته بود. در این بین بیشترین کاهش در روش تریپسین اتفاق می‌افتد. به نظر می‌رسد این کاهش ناشی از نابودی یا غیر فعال شدن گیرنده‌های سطحی مونوسیت‌ها و یا عدم برقراری شرایط مناسب مکانیسم‌های دخیل در فرآیند فاگوسیتوز به دنبال آسیب ناشی از روش جداسازی باشد. نکته‌ای که در این بین باید در نظر داشت با وجودی که انتظار که لیدوکائین به دلیل تأثیرات غشائی موجب اخلال در فاگوسیتوز شود، ولی احتمالاً به دلیل آن که تغییرات ایجاد شده به وسیله لیدوکائین بر خلاف تریپسین در بازه زمانی کوتاهی برگشت‌پذیر هستند، در نهایت منجر به نتایج بهتری شده است.

انفجار تنفسی که گاهاً انفجار اکسیداتیو نیز نامیده می‌شود به سنتز گونه‌های فعال واکنشگر اکسیژن از انواع مختلف سلول‌های فاگوسیتوز اطلاق می‌شود. تست NBT شاخصی از شدت انفجار تنفسی و تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن به وسیله سلول‌های مونوسیت است. رنگ NBT پس از برداشته شدن به وسیله آنیون سوپراکسید در داخل فاگوزوم‌ها احیا شده و تبدیل به کریستال‌های فورمازون می‌گردد. افزوده شدن DMSO منجر به حل شدن کریستال‌های فورمازون شده که شدت آن متناسب با میزان تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است(۳۳). تست گریس نیز به عنوان شاخصی از قابلیت تولید نیتریک اکساید به وسیله سلول‌های مونوسیت در نظر گرفته می‌شود(۳۵ و۳۴). در اینجا نیز لیدوکائین منجر به حداقل اثرات مخرب بر این دو قابلیت فیزیولوژیک مونوسیت‌های استحصالی شده است.

در هر حال لازم است که در آینده مطالعه‌های تکمیلی بر مونوسیت‌های جداشده از جمله میزان بیان شاخص‌های سطح سلولی(CD206 ، CD14.CD68 و D16 و همچنین الگوی گیرنده‌های کموکاینی) در کنار ارزیابی پروفایل سایتوکاین‌های تولیدی به وسیله سلول‌ها صورت پذیرد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که انتخاب روش جداسازی مونوسیت می‌تواند میزان استحصال، زنده مانی، قابلیت‌های حیاتی و عملکردی مونوسیت‌ها از قبیل؛ میزان فاگوسیتوز، قدرت انفجار تنفسی، قابلیت میکروب کشی، میزان برداشت نوترال رد و تولید

رادیکال‌های آزاد نیتروژن را تحت تأثیر قرار دهد، بنابراین باید قبل از انتخاب روش مناسب جداسازی مونوسیت هدف از دست یابی به سلول مورد نظر در نظر گرفته شود. نتایج حاضر چنین برآورد کرد که استفاده از روش جداسازی لیدوکائین بهتر می‌باشد، زیرا قابلیت‌های عملکردی مونوسیت‌ها در این روش در مقایسه با روش‌های دیگر بالا بوده و روش انجام آن آسان و کم هزینه می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل بخشی از پایان نامه دانشجویی مقطع دکتری تخصصی ایمونولوژی، مصوب دانشگاه ارومیه در سال ۱۳۹۵ می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه ارومیه در بخش کشت سلولی گروه ایمونولوژی دانشکده دامپزشکی اجرا شده است و نویسندگان از زحمات تمامی افرادی که در پیشبرد پژوهش حاضر همکاری نمودند کمال تشکر دارند.

REFERENCE

1.Ginhoux F, Jung S. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. Nature Reviews Immunology 2014; 14: 392–404.
2.Anbazhagan K, Duroux-Richard I, Jorgensen C, Apparailly F. Transcriptomic network support distinct roles of classical and non-classical monocytes in human. International Reviews of Immunology 2014; 33: 470–89.
3.Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. Clinical and Translational Medicine 2015; 4: 13-29.
4.Ingersoll MA, Spanbroek R, Lottaz C, et al. Comparison of gene expression profiles between human and mouse monocyte subsets. Blood 2010; 115: 10–20.
5.Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. Cellular Immunology 2014; 289: 135–9.
6.Thomas G, Tacke R, Hedrick CC, Hanna RN. Nonclassical Patrolling Monocyte Function in the Vasculature. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology 2015; 35: 1306–16.
7.Rustin RL, Yash RP, Brent B. Mechanisms of phagocytosis and host clearance of Pseudomonas aeruginosa. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2014; 306: 591–603.
8.Sprangers S, Vries T, Everts V. Monocyte Heterogeneity: Consequences for Monocyte-Derived Immune Cells. Journal of Immunology Research 2016; 7: 123-33.
9.Victoria LG, Preya JP, Sara J, Leigh H, Elizabeth EP, Katharine MI. Altered Peripheral Blood Monocyte Phenotype and Function in Chronic Liver Disease: Implications for Hepatic Recruitment and Systemic Inflammation. PLOS ONE 2016; 16: 1 – 20.
10.Misharin AV, Cuda CM, Saber R, Turner JD, Gierut AK, Haines GK, et al. Nonclassical Ly6C– monocytes drive the development of inflammatory arthritis in mice. Cell Reports 2014; 9: 591–604.
11.Lianne VD, Wouter S, Sofie DP, Liesbet M, Charlotte LS, Gert VI, et al. Yolk Sac Macrophages, Fetal Liver, and Adult Monocytes Can Colonize an Empty Niche and Develop into Functional Tissue-Resident Macrophages. Immunity 2016; 10: 16-27.
12.Peiser L, Mukhopadhyay M, Haworth R, Gordon S. Isolation and Measuring the Function of Professional Phagocytes: Murine Macrophages. Methods in Microbiology 2010; 37: 195-226.
13.Nair S, Archer GE, Tedder TF. Isolation and generation of human dendritic cells. Curr Protoc Immunol 2012; 32: 1-31.
14.Wong KL, Tai JJ, Wong WC, Han H, Sem X, Yeap WH, et al. Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. Blood 2011; 118(5): 16-31.
15.Nordgren IK. Leukoreduction system chambers provide a valuable source of functional monocytes for the monocyte activation test by comparison with internationally validated methods. Journal of Immunological Methods 2016; 428: 42–9.
16.Abtahi Froushani SM, Zarei L, Esmaeili Gouvarchin Ghaleh H, Mansori Motlagh B. Estragole and methyl-eugenol-free extract of Artemisia dracunculus possesses immunomodulatory effects. Avicenna J Phytomed, Epub ahead of prin 2016; 6: 27-35.
17.Mansouri Motlagh B, Afzale Ahangaran N, Abtahi Froushani SM. Calcitriol modulates the effects of bone marrow- derived Mesenchymal stem cells on macrophage functions. Iran J Basic 2015; 18: 672-6.
18.Fijalkowski K, Czernomysy-Furowicz D, Irwin JA, Nawrotek P, Pobucewicz A. Secretory virulence factors produced by Staphylococcus aureus isolates obtained from mastitic bovine milk– effect on bovine polymorphonuclear neutrophils. Research in Veterinary Science 2012; 93:82-7.
19.Jiang T, Chen X, Zhou W, Fan G, Zhao P, Ren S, Zhou C, Zhang J. Immunotherapy with Dendritic Cells Modified with Tumor-Associated Antigen Gene Demonstrates Enhanced Antitumor Effect Against Lung Cancer. Transl Oncol 2017; 24: 10(2): 132-41.
20.Guan D, Zhang Z, Yang Y, Xing G, Liu J. Immunomodulatory Activity of Polysaccharide from the Roots of Actinidia kolomikta on Macrophages. Int J Biol 2011; 3: 33-59.
21.Traunecker E, Gardner R, Fonseca JE, PolidoPereira J, Seitz M, Villiger PM, Iezzi G, Padovan E. Blocking of LFA-1 enhances expansion of Th17 cells induced by human CD14 CD16 nonclassical monocytes. Eur J Immunol 2015; 45: 1414-25.
22.El-Sahrigy SA, Mohamed NA, Talkhan HA, Rahman AM. Comparison between magnetic activated cell sorted monocytes and monocyte adherence techniques for in vitro generation of immature dendritic cells: an Egyptian trial. Cent Eur J Immunol 2015; 40(1): 18-24.

23.Delirezh N, Shojaeefar E, Parvin P, Asadi B. Comparison the effects of two monocyte isolation methods, plastic adherence and magneticactivated cell sorting methods, on phagocytic activity of generated dendritic cells. Cell J 2013; 15(3): 218-23.
24.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.
25.Walter GJ, Evans HG, Menon B, Gullick NJ, Kirkham BW, Cope AP, et al. Interaction with activated monocytes enhances cytokine expression and suppressive activity of human CD4+CD45ro+CD25+CD127 (low) regulatory T cells. Arthritis Rheum 2013; 65(3): 627-38.
26.Mysliwska J, Smardzewski M, MarekTrzonkowska N, Mysliwiec M, Raczynska K. Expansion of CD14+CD16+ monocytes producing TNF-alpha in complication-free diabetes type 1 juvenile onset patients. Cytokine 2012; 60: 309-17.
27.Ilaria T, Roberta S , Marcello M, Ombretta L, Barbara D, Marco P. In vitro efficient expansion of tumor cells deriving from different types of human tumor samples. Med Sci 2014; 2: 70-81.
28.Ding-Kun K, Li-Yan Zh, Hong-Li W. Efeitos citotóxicos de anestesia local com lidocaína/ropivacaína em linhagens celulares de melanoma humano. Rev Bras Anestesiol 2016; 66: 594-602.
29.Leb L, Crusberg T, Fortier N, Snyder LM. Evaluation of methods using adherence to substrate and density gradient for the isolation of human monocytes. J Immunol Methods 1983; 58(3): 309-21.
30.Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. FEMS Yeast Res 2014; 14(7):1068-79.
31.Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nat Protoc 2008; 3(7): 1125-31.
32.van de Loosdrecht AA, Beelen RH, Ossenkoppele GJ, Broekhoven MG, Langenhuijsen MM. A tetrazolium-based colorimetric MTT assay to quantitate human monocyte mediated cytotoxicity against leukemic cells from cell lines and patients with acute myeloid leukemia. J Immunol Methods 1994 ; 174(1-2): 311-20.
33.Domingo-Gonzalez R, Katz S, Serezani CH, Moore TA, Levine AM, Moore BB. Prostaglandin E2-induced changes in alveolar macrophage scavenger receptor profiles differentially alter phagocytosis of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus post-bone marrow transplant. J Immunol 2013; 190: 5809 –17.
34.Abtahi Froushani SM, Esmaili Gourvarchin Galeh H. New insight into the immunomodulatory mechanisms of Tretinoin in NMRI mice. Iran J Basic Med Sci 2014; 17: 632-7.
35.Khazan M 1 ; Mehdi Hdayati. The Role of Nitric Oxide in Health and Diseases. Scimetr 2015; 3: 25-35.

Armaghane-danesh, Yasuj University of Medical Sciences Journal (YUMSJ)

Original Article

Functional Comparison of monocytes isolated from culture flask by lidocaine/EDTA, trypsin and cold-PBS/EDTA

Esmaili Gourvarchin Galeh H[1], Abtahi Froushani SM[1]*, Afzal Ahangaran N[1], Naji Hadai S[2]

[1]Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran, [2]Solid Tumor Research Center, Urmia University of Medical Sciences, Urmia, Iran.

Received: 30 Jan 2017 Accepted: 12 Jun 2017

Abstract

Background & aim: Easy access, rapid recovery and high potency of monocyte cell therapy have led to special attention in cell therapy research. Monocytes are considered as sticky cells to the flask. Therefore, finding the appropriate isolation method that has the least damage to the cell and its function is of particular importance. The purpose of this study was to compare the functional capabilities of monocytes after isolation with three methods: lidocaine / EDTA, trypsin and cold PBS / EDTA.

Methods: In this experimental study, after extraction of peripheral blood mononuclear cells from Balb / c mice, cells (107 × 1 cells / ml) were incubated in RPMI culture medium in T25 culture flask for 4 hours. After incubation time, non-adherent cells (mainly lymphocytes) were separated by two rinsing and removed from the flask. Three different methods of trypsin, lidocaine and phosphate buffer saline were used for isolation of monocyte cells. After isolating the cells with each method, the functional capabilities of the monocytes were measured and compared with each other. The collected data were analyzed using one-way ANOVA.

Results: The amount of extraction, survival, metabolic activity, phagocytosis percentage, respiratory explosion, nitric oxide levels, and yeast potential in cells isolated by lidocaine were significantly higher than other groups. Although the use of trypsin, although it results in the removal of more cells, is cooled to the PBS method, but these cells exhibit significant physiological impairment in comparison with the Lidocaine / EDTA or PBS / EDTA method. Neutral red uptake was detected by trypsin isolated monocyte cells in comparison to the other two methods at lower levels. In comparison between cold PBS and lidocaine, it seems that there is no significant difference between the monocytes obtained from the two methods in terms of neutralization.

Conclusion: Compared to trypsin and PBS / EDTA, the Lidocaine / EDTA method is an appropriate method for isolating monocytes adherent to the flask, due to the extraction of more efficient and efficient cells.

Keywords: Isolation, Function ,Monocyte, Lidocaine, Trypsin, Phosphate Buffered Saline.

***Corresponding Author:** Abtahi Froushani SM, Department of Microbiology, Urmia University, Urmia, Iran
Email: meysamabtahi@hotmail.com

Please cite this article as follows:
Esmaili Gourvarchin Galeh H, Abtahi Froushani SM, Afzal Ahangaran N, Naji Hadai S. Functional Comparison of monocytes isolated from culture flask by lidocaine/EDTA, trypsin and cold-PBS/EDTA. Armaghane-danesh 2017; 22 (2): 145-160.