کشت وتکثیر سلولهای دندریتیک از پیش سازهای مغز استخوان موش *Balb/c*

سمانه عرب[۱] ، معصومه معتمدی[۲] ، جمشید حاجتی[۳]

چکیده

سلولهای دندریتیک با برداشت و پردازش آنتی ژن پاسخهای ایمنی را آغاز ، جهت دهی وکنترل می کنند ،این سلولها قابلیت ایجاد وهدایت انواع مختلفی از پاسخهای ایمنی (نوع ۱ یا ۲)را با توجه به عوامل وپیامهای محیطی دارند .هدف این مطالعه کشت ، تکثیر وبلوغ سلولهای دندریتیک از پیش سازهای مغز استخوان موش می باشد.برای این منظور سلولهای مغز استخوان را بعد از جداسازی در محیط کشت حاوی سایتوکاین قرار داده و بعد از کشت ۵ روزه به منظور بلوغ، سلولها با لیپو پلی ساکارید دیواره باکتریهای گرم منفی (LPS) و توکسین وبا مواجه شدند.سلولها از نظر بروز مارکرهای سطحی وتولید سایتوکاین ارزیابی گردیدند.نتایج نشان داد که سلولهابالغ شده بودند.در بررسی سایتوکاین حضور LPS در محیط کشت سلولها موجب تولید IL-12 و حضور CT موجب تولید IL-10 از سلولها شد. با انجام این مطالعه اثبات شد که با کشت ۷ روزه سلولهای مغز استخوان موش می توان سلولهای دندریتیک کارآمدی را تولید کرد و بااضافه کردن ترکیباتی به محیط کشت سلولهای دندریتیک می توان سلولهایی را ایجاد کرد که پاسخ مناسب نوع ۱ یا ۲ راالقاء کنند.

کلمات کلیدی:سلولهای مغز استخوان، کشت ، تکثیر ،بلوغ، سلولهای دندریتیک

مقدمه

سلولهای دندریتیک۱ ، سلولهای عرضه کننده حرفه ای آنتی ژن بدن۲ هستند که نقش مهمی در آغاز و جهت دهی پاسخهای ایمنی ایفاء می کنند[۱]. سلولهای دندریتیک قابلیت ایجاد و هدایت انواع مختلفی از پاسخهای ایمنی را با توجه به عوامل و پیامهای محیطی دارند و بر حسب شرایط رشد و بلوغ می توانند پاسخهای نوع ۱یانوع ۲ را جهت دهی کنند[۲و۳].بدلیل نقش مهم این سلولها از آنها در تهیه واکسن وانجام ایمنی درمانی۳ برای بیماریهای مختلف اعم از سرطانها ، آسم وآلرژی ،بیماریهای خود ایمن۴ و نقص ایمنی۵ استفاده می گردد[٤].

برای ایجاد واکسن های مبتنی برDC در انسان باید این سلولها در مقادیر بالا خارج از بدن تهیه کنیم .در ابتدا از سلولهای دندریتیک خون محیطی بعنوان منبع این سلولها استفاده می شد.در این روش ازمحصول لوکوفرز خون محیطی استفاده میشود. مزیت این روش عدم نیاز به شرایط کشت و سایتوکاین است اما مشکل آن محدود بودن تعداد سلولهای دندریتیک خون محیطی است. سلولهای دندریتیک ۰/۷تا ۰/۱۵ درصد سلولهای تک هسته ای خون محیطی را تشکیل می دهند [۵]. امروزه در اغلب کارآزمایی های بالینی از مونوسیت های خون محیطی بعنوان منبع تولید سلولهای دندریتیک استفاده می گردد. به این صورت که پس از جداسازی مونوسیتها ،آنها در حضور سایتوکاینهای فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت مونوسیت(GM-CSF)و اینترلوکین ٤(IL4)

۱-کارشناس ارشد ایمونولوژی

۲ -کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی لرستان

۳-دانشیار ایمونولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران

[1] -Dendritic Cells (DCs)
[2] - Antigen Presenting Cells(APCs)
[3] -Immunotherapy
[4] -Auto Immune Diseases
[5] -Immune Deficiency

Archive of SID
www.SID.ir

کشت می دهند تا به سلولهای دندریتیک تبدیل شوند.این روند کشت از ۵ تا ۹ روز در مطالعات متغیر است [٦].

این سلولها نابالغ هستند،قدرت آندوسیتوزی بالایی دارند اما مولکولهای MHC و کمک محرک CD80و CD86را در سطح پایینی عرضه می کنند.در حضور عوامل بلوغی مثل α-6TNF، اینترلوکین۱، 7PGE2[7] ، محیط مشتق از مونوسیت۸[8] ،لیپوپلی ساکارید دیواره باکتریها۹[9] وترکیبات میکروبی مختلف می توان سلولهای دندریتیک بالغ را ایجاد کرد.این سلولها قدرت برداشت آنتی ژنی پایینی دارند ،اما مولکوهای MHCو کمک محرک را در سطح بالایی عرضه می کنند و قادرند سلولهای Tرا به طرز مناسبی فعال کنند.شرایط کشت و نحوه بلوغ سلولهای دندریتیک نقش مهمی در القاء پاسخ ایمنی مناسب بر ضد تومور بازی می کند.در بیشتر مطالعات استفاده از سلولهای دندریتیک بالغ بر نابالغ ترجیح داده شده است.زیرا معتقدند سلولهای دندریتیک بالغ قدرت بیشتری در تحریک پاسخهای ایمنی دارند و احتمالاً سلولهای نابالغ موجب القاء تولرانس می شوند [۷].

در مدلهای موشی از سلولهای پیش ساز مغز استخوان یا سلولهای دندریتیک طحال به عنوان منبع سلولها استفاده می گردد وشرایط کشت مشابه سلولهای انسانی را باید طی کنند [۸].

روشهای مختلفی جهت کشت وتکثیر سلولهای دندریتیک از مغز استخوان موش در دنیا وجود دارد.مادر مطالعه خود از روش کشت ۵ روزه جهت تولید سلولهای دندریتیک نابالغ و به دنبال آن ۲روز کشت با مواد بلوغ که شامل لیپوپلی ساکارید دیواره باکتریها (LPS) و سم باکتری ویبریوکلره۱۰[10] (CT)بود، استفاده کردیم.سلولهای دندریتیک کشت داده شده با این مواد را از نظر بروز مارکرهای سطحی و تولید سایتوکاین بررسی کردیم.

مواد وروش کار

حیوانات

در ایـن تحقیـق از موشـهای BALB/C مـاده ۸-٦ هفتـه استفاده شد که از انستیتو پاستور ایران خریداری گردیده و تـا زمـان انجـام آزمـایش در محـل نگهـداری حیوانـات گـروه ایمونولوژی دانشگاه تهران نگهداری شدند.

جداسازی سلول از مغز استخوان موش

ابتدا موش کشته شد و به مدت ۵ دقیقه در الکل° ۷۰ غوطه ور گردید. سپس با مقید کردن حیوان پوست ناحیه استخوان ساق و ران کنده شد و در شرایط استریل عضله این نواحی کاملاً از استخوان جدا گردید. استخوانها به الکل منتقل و ظرف ۳-۱ دقیقه استخوانها با بافر فسفات استریل شستشو داده شدند . بعد از این مرحله استخوانها به پلیت استریل حاوی محیط کشت RPMI 1640 (SIGMA) منتقل شدند . دو انتهای آنها با سرسوزن ۲۵ سوراخ شد و با سرنگ۱۰ سی سی محیط کشت به داخل استخوانها تزریق گردید و این کار آنقدر ادامه داده شد تا استخوان ها کاملاً سفید شدند. سوسپانسیون سلولی بمدت ۵ دقیقه با دور ۱۵۰۰G سانتریفوژ گردید .با استفاده از آب مقطر و بافر فسفات 10X گلبولهای قرمز حذف شدند و سلول ها سه بار شستشو داده شدند و ذرات اضافی با پی پت خارج گردید.تعداد و بقا سلولها با استفاده از رنگ تریپان بلو ۰٫۵ و به کمک هموسیتومتر تعیین شد.

کشت سلولهای دندریتیک

۱۰٦ ×۱/۵-۱ سلول پیش ساز جدا شده از مغز استخوان موش BALB/C به پلیت ۲٤ چاهکی محتوی محیط کشت RPMI 1640 (SIGMA) حاوی پنی سلین ۱۰۰واحد در میلی لیتر ، استرپتومایسین ۱۰۰میلی گرم در میلی لیتر ، سدیم بیکربنات ۲ گرم در لیتر،۱۰٪ سرم غیرفعال شده جنین گاو (GIBCO)و۱٪ ال-گلوتامین بهمراه ۲۰ نانوگرم (۱۰۰واحد) در میلی لیترGM-CSF *(BENDERMED SYSTEM)* و

[6] -Tumor Necrosis Factor
[7] -Prostaglandin E2
[8] - Monocyte Conditioned Medium(MCM)
[9] - Lipopolysaccharide (LPS)
[10]-Cholera toxin

Archive of SID
www.SID.ir

۵ نانوگرم (۱۰۰واحد) در میلی لیترIL-4 (BENDERMED SYSTEM) منتقل و در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و CO2 ۵٪ قرار داده شد. روز سوم سلولهای غیر چسبان توسط پیپتاژ ملایم جمع آوری گردیدند و به سلولها محیط کشت جدیدبا نصف غلظت اولیه GM-CSF,IL-4اضافه شد .سلول ها باغلظت ۱۰٦ ×۵ در ٦ میلی لیتر محیط به پلیت های ٦ چاهکی منتقل شدند.در روز پنجم سلولهای جهت بررسی فنوتایپ سلولی و مرفولوژی جمع آوری گردیدند.

تولید سلولهای دندریتیک بالغ

در روز پنجم، به ازای هر ۱۰٦ سلول ۱ میکروگرم در میلی لیتر LPS(CAT. NO: L-6526 SIGMA) و۱ میکروگرم در میلی لیتر توکسین ویا (BIOMOL RESEARCH LAB) اضافه شد. بعد از سپری شدن ٤۸ ساعت سلولهای دندریتیک بالغ جهت ارزیابی مرفولوژی وفنوتایپ جمع آوری گردیدند.

ارزیابی فنوتایپ سلولهای دندریتیک بالغ ونابالغ

فنوتایپ سلولهای دندریتیک توسط فلوسایتومتری با استفاده از آنتی بادیهای مونوکلونال کنژوگه شامل: CD11 C PE,MHCII FITC,CD80 FITC,CD86 FITC,CD40 FITC وایزوتایپ کنترل(BD PHARMINGEN) در روز ۵ و۷ تعیین شد. جهت انجام تست ، سلولهای دندریتیک نابالغ (سلولهای دندریتیک روزهای پنجم) و سلولهای دندریتیک بالغ شده (سلولهای دندریتیک روزهای هفتم) جمع آوری گردید.۵ لوله برای تست و۳ لوله برای ایزوتایپ کنترل انتخاب گردید و به هر لوله ۱۰۵ سلول اضافه و لوله ها در ظرف حاوی یخ قرار داده شدند.۱ میکرولیتر از آنتی بادیهای کونژوگه به لوله اضافه کرده وبه مدت ٤۵-۳۰ دقیقه در تاریکی وسرما قرار گرفت بعد از این مدت لوله ها با دورG۱۵۰۰ به مدت ۱۰- ۵ دقیقه در دمای ۵درجه سانتی گراد سانتریفوژشده و مایع رویی کاملاً خالی گردید.سپس سلول ها با بافر فسفات ۲ بار شستشه شده ودر خاتمه ۰/۵ میلی لیتر بافرفسفات ویا محلول فیکس کننده (در صورتی که بخواهیم روز بعد نتایج را قرائت کنیم) اضافه شد ونتایج با دستگاه قرائت گردید.نتایج حاصله با استفاده از نرم افزار WINMDIمورد بررسی قرار گرفت.

ارزیابی میزان سایتو کاین های تولید شده توسط سلولهای دندریتیک

سوپ رویی سلولهای دندریتیک در روز پنجم و هفتم جمع آوری شد و میزان تولید اینترلوکین ۱۰و۱۲با استفاده از کیت الایزا۱۱ (*BENDER MEDSYSTEMS*) ارزیابی شد. تمام نمونه ها بصورت سه تایی انجام گردید و غلظت سایتوکاین ها براساس منحنی استاندارد وبرحسب پیکوگرم در میلی لیتر گزارش شدند.

.

روش تجزیه وتحلیل داده ها

۱) توصیف داده ها با جدول ونمودار

۲) تعیین ارتباط متغیر هابا استفاده از آزمون آنووا۱۲

نتایج

۱- بررسی مارکر های سطحی سلولهای دندریتیک

سلولهای حاصل از کشت ۵روزه وسلولهای مواجه شده با LPSوCT باآنتی بادیهای مونوکلونال مربوطه رنگ آ میزی شده و با دستگاه فلوسایتومتراز نظر بروز مارکرهای سطحی بررسی شدند. شکل ۱ بروز مارکرهای مختلف از جملهMHC-II, CD80,CD40 ,CD86,CD11C بر سطح سلولهای دندریتیک در روز پنجم و هفتم کشت را نشان می دهد. .مارکرCD11C که مارکر اختصاصی سلولهای دندریتیک می باشد ،بر سطح ۷۰ درصد سلولهای کشت ۵ روزه و۷ روزه عرضه شده است .بروز مارکرهایMHC کلاس دو ،CD86 ،CD40وCD80 که مارکرهای بلوغ

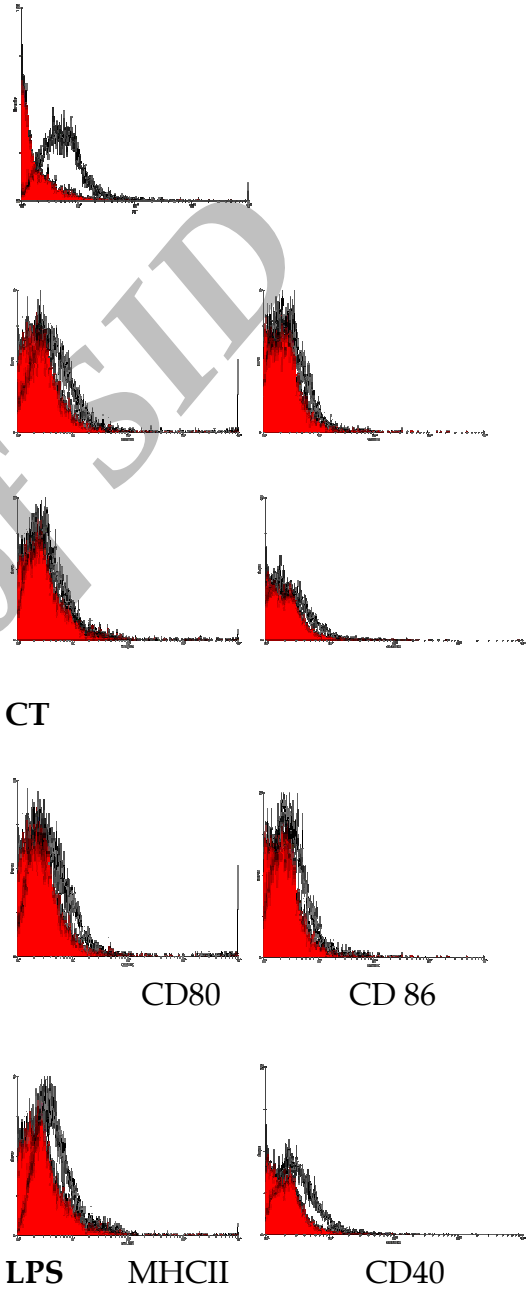
[11] -ELISA
12 -ANOVA

Archive of SID
www.SID.ir

سلولهای دندریتیک می باشند،در گروه LPS-DC در مقایسه با گروه CT-DC کمی بالاتر بوداما نسبت به DC نابالغ (۵ روزه) هر دو گروه بالاتر بودند.

(الف)

(ب)



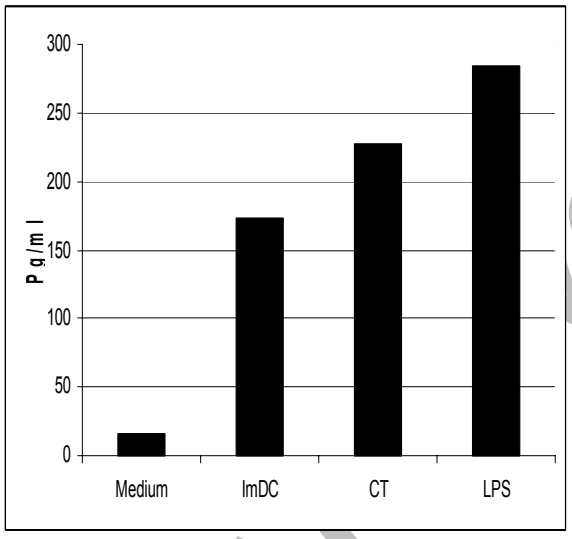
شکل ۱. بروز مارکرCD11Cروی سطح سلولهای دندریتیک در مقایسه با ایزوتایپ کنترل (الف)وبروز مارکرهای بلوغ MHC-II, CD80, CD86.CD40 بر روی سلولهای ندریتیک بالغ (سفید) در مقایسه با نابالغ(قرمز)

۲- تولید سایتوکاین توسط سلولهای دندریتیک

محلول رویی حاصل از کشت ۵روزه و ۷روزه سلولهای دندریتیک جمع آوری واز نظر تولید سایتوکاین های IL-12 و IL-10 با استفاده از روش الیزا بررسی شد. بعداز بررسی جذب نوری (OD13)، میزان تولید این سایتوکاین ها برحسب پیکوگرم در میلی لیتر محاسبه شد.

۲-۱- اینترلوکین ۱۲(IL12)

همانطور که در شکل۲ نشان داده شده تولید IL-12 در سلولهای دندریتیک مواجه شده با LPS نسبت به سلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای مواجه شده با CT به طور معنی داری ($P<0.05$) بالاتر بود.



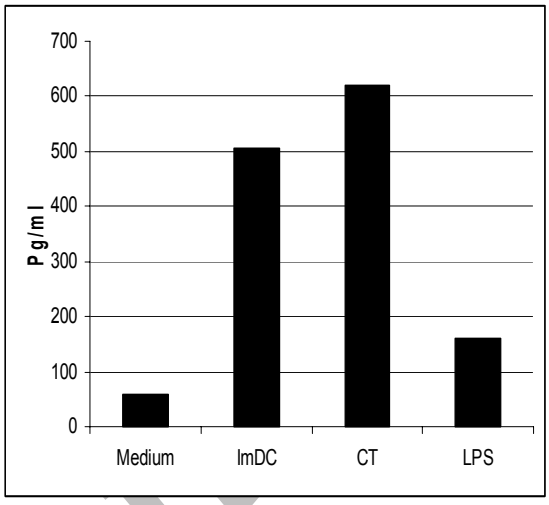
شکل۲.میزان تولید IL-12 ازسلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای دندریتیک مواجه شده با LPSوCT

۲-۲-اینترلوکین ۱۰(IL-10)

همانطور که در شکل۳ نشان داده شده تولید IL-10 در سلولهای دندریتیک مواجه شده با CT نسبت به سلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای مواجه شده با LPS به طور معنی داری ($P<0.05$) بالاتر بود. سلولهای مواجه شده با LPS به طرز معنی داری($P<0.05$) از تمام گروهها بجز سلولهای تنها مقدار IL-10 پایینتری تولید کرده بودند.

[13] -optical dencity

Archive of SID
www.SID.ir



شکل۳.میزان تولید IL-10 ازسلولهای دندریتیک نابالغ و سلولهای دندریتیک مواجه شده با LPSوCT

بحث

سلولهای دندریتیک قابلیت ایجاد وهدایت انواع مختلفی از پاسخهای ایمنی را با توجه به عوامل وپیامهای محیطی دارند و برحسب شرایط رشد وبلوغ می توانند پاسخهای ایمنی نوع۱ یا ۲ را جهت دهی کنند[۲]، که در ایمنی ضد توموری [۹] و در درمان آسم و آلرژی پاسخهای نوع۱ [۱۰] و در درمان بیماریهای خود ایمن پاسخهای نوع ۲[۱۱] بسیار موثر وکارآمد می باشند .

در این مطالعه هدف ،تولید سلولهای دندریتیک از پیش سازهای مغز استخوان موش ،بلوغ آنها با موادمختلف،بررسی وضعیت فنوتیپی و تولید سایتوکاین توسط این سلولها بود.

دربررسی فنوتایپ سلولها با استفاده از تکنیک فلوسایتومتری نتایج حاصله از مطالعه نشان داد که مورد استفاده موجب افزایش بروزمولکولهای MHCII,CD40 CD80,CD86 برسطح سلولهای دندریتیک میشود.نتیجه طبیعی این امر بلوغ سلولهای دندریتیک و افزایش توان عرضه آنتی ژنی این سلولها خواهد بود.

همانطور که ذکر شد سلولهای دندریتیک با تولید سایتوکاینهای مختلف پاسخهای ایمنی را هدایت می کنند به این صورت که برای ایجاد وتداوم پاسخ تیپ ۱ (TH1) تولید سایتوکاین هایی مانند IL12 و IL18 وبرای القاء پاسخهای تیپ ۲(TH2) تولید IL4,IL-10 از سلولهای دندریتیک الزامی است [۱۲]. در این مطالعه بلوغ سلولهای دندریتیک با استفاده از LPS موجب تولید مقادیر بالایی از IL-12 توسط سلولها شد. IL12 مهمترین سایتوکاین در جهت دهی پاسخهای ایمنی به سمت TH1به شمار می رود و مهمترین منبع تولید آن سلولهای دندریتیک فعال هستند. این سایتوکاین با تحریک سلولهای T وNK موجب تحریک تولید IFN-Γ می شود . IL-18 نیز در همراهی با IL-12 در القاء پاسخ TH1 نقش مهمی ایفاء می کند [۱۳].

LPS از طریق گیرنده های شبه تول نوع ۱٤٤(TLR-4) توسط سلولهای دندریتیک شناسایی می شود و این شناسایی موجب بلوغ این سلولها ،ترشح سایتوکاینهایی مانند IL-12, IL18و جهت دهی پاسخ ایمنی به سمت پاسخهای TH1می شود [۱٤و۱۵].

در مقابل IL-10 بعنوان یک سایتوکاین ضد التهابی عمل کرده و از طریق سرکوب پاسخ TH1 به رشد وتوسعه TH2 کمک می کند.IL-10 از تولید IFN-ΓوTNF-A توسط سلولهای ایمنی جلوگیری می کند[۱٦] .در این مطالعه مواجه سلولهای دندریتیک با CT موجب تولید مقادیر بالایی IL-10از این سلولها شد.

مطالعات زیادی نشان داده است که سم وبا عامل القای بلوغ در سلولهای دندریتیک وقادر به جهت دهی پاسخ ایمنی به سمت ایجاد سلولهای تنظیمی یا TH2است [۱۷].همچنین سم وبا موجب ممانعت از بروز گیرنده های اینترلوکین ۱۲ برسطح سلولهای Tمی شو.تاثیر این سم بر تولید اینترلوکین ۱۲وگیرنده های آن به عنوان یکی از دلایل اصلی ممانعت از بروز پاسخ های TH1در نظر گرفته شده است [۱۸].

با انجام این مطالعه اثبات شد که با کشت در نهایت ۷ روزه سلولهای مغز استخوان موش می توان سلولهای دندریتیک کارآمدی را تولید کرد و بااضافه کردن ترکیباتی به محیط کشت سلولهای دندریتیک می توان سلولهایی را ایجاد کرد که

[14] -Toll Lik Receptors

Archive of SID
www.SID.ir

سایتوکاینهای القاء کننده پاسخ نوع ۱ یا ۲ راتولید کنند و با این کار کارایی ایمونوتراپی را بر علیه بیماریهای مختلف وبه ویژه انواع سرطانها را تقویت نمود.

منابع

1. YONG-JUN LIU.Dendritic cell subset and lineages , and their functions in innate and adoptive immunity.Cell .2001;106:259-62.

2. Antonia lan zavecchia.Federica sallus to.Regulation of Tcell immunity by dendritic cell.Cell 2001;106:263-66.

3. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. Nat Immunol. 2000. Sep;1(3):199-205.

4. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B,Palucka K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol; 18:767–811.

5. Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. J Exp Med. 1994;180:83–93.

6. Svane IM, Soot ML, Buus S, Johnsen HE.Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy.APMIS. 2003 Jul-Aug;111(7-8):818-34

7. Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, et al. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. J Exp Med. 2001;193:233–238.

8. Rice AM, Jones KL, Hart DN.DC preparations for therapy. Cytotherapy. 2004;6(2):99-104

9. Ikeda H, Chamoto K, Tsuji T, et al The critical role of type-1 innate and acquired immunity in tumor immunotherapy.Cancer Sci. 2004 Sep;95(9):697-703.

10. Georas SN, Guo J, De Fanis U, Casolaro V.T-helper cell type-2 regulation in allergic disease. Eur Respir J. 2005 Dec;26(6):1119-37.

11. Bistritzer T, Weintrob N, Ofan R, Koren-Morag N, Rapoport MJ. TH1/TH2 cytokine balance in patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma..Cytokine. 2006 May;34(3-4)

12. Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, et al. Signaling and transcription in T helper development.Annu Rev Immunol .2000;18:451–94.

13. Smyth MJ, Taniguchi M, Street SE. The anti-tumor activity of IL-12:mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent.J Immunol .2000;165:2665–70.

14. AkiraS,Hemmi ,H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family .Immunol Lett 2003 Jan 22; 85(2):85-95

15. Tsuneyasu Kaisho and Shizuo Akira .Regulation of Dendritic cell Function Through Toll-Like Receptors.Current Molecular Medicine. 2003;3:759-771

16. Sharma, S. et al. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. J. Immunol.1999; 163: 5020–5028 .

17. Braun MC, He J, Wu CY, Kelsall BL. Cholera Toxin Suppresses Interleukin (IL)-12 Production and IL-12 Receptor β1and β2 Chain Express. J. Experimental Medicine .1999; 189(3) : 541-552

18. Bagley KC, Abdelwahad SF, Tuskan RG. Cholera Toxin and Heat-Labile Enter toxin Activated Human Monocyte -Devired Dendritic cells and Dominantly Inhibit Cytokine Production through a Cyclic AMP-Dependent Pathway. Infection and Immunity. 2002; 5533-553

Archive of SID

www.SID.ir