غنی‌سازی سلولهای دندریتیک دست نخورده خون محیطی به روش بید مغناطیسی متصل به آنتی‌بادی

نادره نادری M.Sc. ☆، علی‌اکبر پورفتح‌الله Ph.D. ☆☆، پگامران علی مقدم M.D. ✯، اردشیر قوام‌زاده M.D. ✯، محمد مؤذنی Ph.D. ✯☆

☆دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

✯ سازمان انتقال خون ایران، مرکز تحقیقات

✯ دانشگاه علوم پزشکی تهران، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی

آدرس مکاتبه: تهران صندوق پستی: ۱۱۱-۱۴۱۱۵، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی

پست الکترونیک: Email: Moazzeni@yahoo.com

چکیده

دریافت مقاله: ۸۲/۱۰/۲۲، پذیرش مقاله: ۸۳/۴/۲۴

* **هدف:** جدا سازی سلولهای دندریتیک (DCs) خون محیطی به صورت دست نخورده (Intact Peripheral Blood Dendritic Cells) با استفاده از روش انتخاب منفی (Negative Selection) به کمک روش روزت و Immunomagnetic depletion

* **مواد و روشها:** در ابتدا سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی با استفاده از فایکول جدا شده و لنفوسیتهای T با اتصال به گلبولهای قرمز گوسفند تیمار شده با AET حذف گردیدند. سلولهای دارای شاخص‌های رده‌ایی (Lineage Marker) با استفاده آنتی‌بادیهای مونوکلونال (mAbs) اختصاصی ضدشاخص‌های رده‌ایی CD3, CD11b, CD14, CD16, CD19, CD56 و بیدهای مغناطیسی واجد anti-mouse IgG از سلولهای باقیمانده خارج شدند. درصد خلوص سلولهای دندریتیک به دست آمده با دو خصوصیت عدم حضور شاخص‌های رده‌ایی و حضور آنتی‌ژن HLA-DR، با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر اندازه‌گیری شد.

* **نتایج:** نتایج به دست آمده از بررسی‌های فلوسیتومتری نشان می‌دهد که جمعیت قابل توجهی (۴/۵درصد±۵۸/۵درصد) از سلولهای جدا شده قادر به واکنش با mAbهای ضد شاخصهای رده‌ایی نیستند ولی آنتی ژن HLA-DR را ابراز می‌کنند.

* **نتیجه گیری:** روش Immunomagnetic depletion روشی جدید برای جداسازی DCs است که برخلاف روش‌های کلاسیک مطرح، قادر به جداسازی DCs به صورت دست نخورده است. این تحقیق، نخستین تحقیق در این زمینه در کشور است و میزان خلوص DCs به دست آمده در این بررسی مشابه مطالعات خارجی است. غنی‌سازی بالای DCs دست نخورده، راه مطالعه در مورد عملکرد طبیعی DCs در زمینه‌های مختلف اتوایمنی، سرطان‌ها و بیماری‌های عفونی را هموار می‌نماید.

گل واژگان: سلولهای دندریتیک خون محیطی، انتخاب منفی، بید مغناطیسی متصل به آنتی‌بادی

نشریه پزشکی یاخته، سال ششم، تابستان ۸۳، شمارهٔ ۲۲، صفحات ۹۶-۹۱

مقدمه

سلولهای عرضه کننده آنتی ژن(antigen presenting cells) (APC) با اتصال به لنفوسیت T، عرضهٔ آنتی‌ژن و ارسال پیامهای ثانویه سبب تحریک لنفوسیت T می‌شوند. در بین APC های حرفه‌ای DCs دارای قدرت انحصاری در ایجاد پاسخ اولیه در لنفوسیت T باکره هستند (۱). سلولهای DC انسان برخلاف DC موش فاقد شاخص رده‌ایی خاص بوده و از پیش‌سازهای $CD34^+$ در مغز استخوان مشتق می‌شوند. این سلولها از طریق گردش خون به سایر بافت‌های بدن منجمله بافت‌های لنفاوی ثانویه رفته و در آنجا بالغ می‌گردند (۱، ۲، ۳). در انسان خون محیطی منبع نسبتاً مناسبی برای جدا کردن DCs است ولی تعداد بسیار کم این سلولها که در مقالات مختلف بین حداقل۰/۵درصد تا حداکثر ۲/۶ درصد سلولهای تک هسته‌ای خون محیطی (MNC) گزارش شده (۴، ۵، ۶) و فقدان شاخص رده‌ایی مشخص، جداسازی این سلولها را به روندی پیچیده تبدیل ساخته است. DCهای موجود در خون محیطی به علت فقدان مولکول CD ۸۳ و ابراز کم مولکولهای چسبان و هم تحریکی مانند CD۸۰، CD۸۶، CD۴۰ نابالغ محسوب می‌شوند (۶). این سلولها به دو زیر گروه لنفوئیدی ($HLA\text{-}DR^+$; $CD11c^-$, $CD2^-$; $CD33^{Dim}$) و میلوئیدی ($HLA\text{-}DR^+$; $CD11c^+$; $CD2^+$; $CD33^{Bright}$) تقسیم شده (۶، ۷)

Archive of SID

www.SID.ir

که دو زیر گروه مذکور از لحاظ خصوصیات فنوتیپی، تکوینی و عملکردی با هم تفاوت دارند (۸) هر کدام از زیر گروههای مذکور به صورتی متفاوت سبب القا پاسخ ایمنی یا تولرانس در زیرگروههای Th2,Th1 شده و به تبع آن نوع متفاوتی از پاسخ ایمنی را آغاز یا خاموش می‌کنند (۲، ۶، ۹).

نظر به اهمیت DCs در القا ادامه، تنظیم و تعیین نوع پاسخ ایمنی و اهمیت روز افزون سلولهای DCs در تومور تراپی (۱۰، ۱۱، ۱۲)، درمان آلرژی (۱۳)، اتوایمنی[1] (۱۴) و واکسیناسیون علیه عوامل عفونی (۱۵، ۱۶، ۱۷) سهم عظیمی از مطالعات در سالهای اخیر به شناخت بیشتر عملکرد DCs اختصاص یافته است (۱). در کشور ما تاکنون در زمینهٔ DCs انسان مطالعه نشده است. جداسازی سلول دندریتیک اولین گام در جهت شروع تحقیقات در این زمینه است.

در تمام روشهای کلاسیک جداسازی DCs، از کشت in vitro به مدت حداقل ۱۶ ساعت استفاده می‌شود. در ادامه با استفاده از کاهش خاصیت چسبندگی و دانسیتی سلولهای دندریتیک جدا می‌گردند. از جمله می توان به تحقیقات Van Voorhis و همکاران در جداسازی DCs با روش چسبندگی به سطوح پلاستیکی و Xu و همکاران با روش کاهش دانسیتی اشاره کرد (۱۸، ۱۹). ولیکن تحقیقات انجام شده براساس این روش به علت القاء بلوغ و ایجاد تغییر در عملکرد و فنوتیپ DCs قادر به گزارش خصوصیات واقعی DCs موجود در خون نیستند (۱۸).

در تحقیقات جدید برای خالص سازی PBDCs به صورت دست نخورده روش انتخاب منفی DSc ابداع شد که همهٔ سلولها به جز DCs با روشهای مختلف از محیط حذف می‌شوند، برای مثال در روش O'Doherty و همکاران، لنفوسیت‌های T با روش روزت و سلولهای واجد FcR با روش mouseγ-globulinPanning حذف شده، سپس سلولهای T, Nk, B و منوسیت از طریق مجاورت باکوکتلی[2] از آنتی‌بادی‌های ضد این سلولها نشان‌دار شده و با روش Panning به سطح پتری‌دیش پوشیده از آنتی بادی علیه IgG موش[3] متصل و در نهایت سلولهای غیرچسبان به عنوان DCs جمع‌آوری می‌شدند (۲۰). از آنجا که روشهای کلاسیک سبب القا بلوغ در DCs می‌گردد، سلولهای جدا شده نماینده واقعی سلولهای دندریتیک خون محیطی نیستند لذا در این تحقیق با استفاده از روش انتخاب منفی به غنی‌سازی سلولهای دندریتیک پرداختیم .

مواد و روشها

آنتی‌بادی‌های مورد استفاده

آنتی بادیهای منوکلونال موشی برعلیه HLA-CD56, Dr56, DR, (IgG) Cd19 , (iGg2a) CD 16, (IgG1), (IgG2a) CD 14, (IgG1) Cd11b, (IgG1) Cd3 (کنژوگه با FITC) و کنترل ایزوتیپ مربوطه از شرکت IQ product هلند و anti-mouse بزی از نوع F(ab') (کنژوگه با PE) از شرکت Serotec انگلستان تهیه شد.

جداسازی سلولهای تک هسته‌ایی از بافی‌کت[4]

۲۰ نمونه بافی‌کت افراد نرمال و بالغ (۴۰-۲۰) سال از سازمان انتقال خون ایران تهیه شد. نمونه گیری به صورت در دسترس از اهدا کنندگانی که خون اهدایی آنها به منظور تهیه گلبول قرمز فشرده و پلاکت مورد استفاده قرار می‌گرفت، انجام شد. در مرحله بعد با مصرف حدود ۱۵ میلی‌لیتر بافی‌کت، سلولهای تک هسته‌ایی با سانتریفوژ برروی فایکول (Seromed آلمان) (۶۰۰گرم به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق) جدا گردید (۲۱). به منظور حذف پلاکت‌ها، از سه نوبت شستشوی سلولها با RPMI (Sigma، آمریکا) در ۲۰۰گرم به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد، پلاکت‌ها سبب تشکیل تجمعات سلولی[5] شده و به روند جداسازی DCs آسیب می‌رسانند. در مرحلهٔ آخر سلولهای به‌دست آمده، شمارش شده و درصد سلولهای زنده با استفاده از تریپان بلو (Merck، آلمان) تعیین گردید.

حذف لنفوسیت‌های T با روش روزت

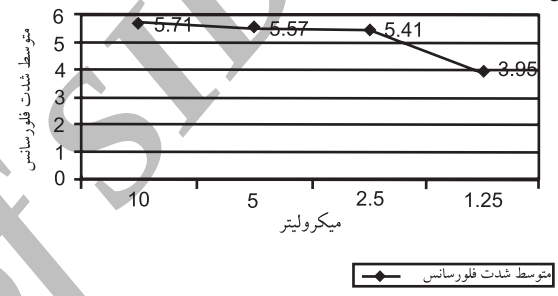
در این مرحله سلولهای T از طریق مجاورت MNC با گلبول قرمز گوسفند تیمار شده (SRBC)[6] تیمار شده با AET[7] (SERVA، آمریکا) و تشکیل روزت حذف گردیدند. SRBC تازه از سازمان انتقال خون ایران خریداری و حداکثر به مدت سه هفته در محلول آلسیویر[8] نگهداری و استفاده شد. جهت تیمار SRBC با AET، سلولهای SRBC با بافر فسفات سالین شستشو شده به نسبت ۴:۱ با محلول AET ۴درصد در آب مقطر، مخلوط شده و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۳۷درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سه بار شستشو با افزودن RPMI حاوی ۱۰درصد FCS (Gibco، آلمان) سوسپانسیون ۴درصد از SRBC تیمار شده تهیه و با نسبت ۱:۱ با سوسپانسیون سلولی (با غلظت ۱×۱۰^{۷} سلول MNC در میلی لیتر) مخلوط شد. آنگاه به میزان ۵۰درصد به آن FCS اضافه گردید. مخلوط سلولها به مدت ۲ ساعت در ۴درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. لنفوسیتهای T موجود در مجموعه سلولهای تک هسته ای با SRBC تیمار شده تشکیل روزت داده (ER^{+}) و در مرحلهٔ بعد با استفاده از فایکول جداسازی شدند.

1. Auto immunity
2. mAbs Cocktail
3. anti-mouse IgG
4. Buffy coat
5. Aggregation
6. Sheep Red Blood Cell
7. S-(2-Aminoethly isothiuronium bromide)
8. Alsevers Solution

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین تیتر مناسب آنتی بادیهای مورد استفاده برای تعیین حداقل غلظت اشباع کننده ی آنتی بادیهای منوکلونال ضد شاخصهای رده‌ایی سلولهای غیر DCs آنتی‌بادیهای موشی برعلیه (IgG1) Cd56, (IgG1) Cd19, (IgG2a) Cd14, (IgG1) Cd11b, (IgG1) Cd3, (IgG2a) Cd16

مقادیر ۲/۵،۱/۲۵ ، ۵ و ۱۰ میکرو لیتراز این mAbs به ۱×۱۰^{۶} سلول MNC در حجم ۱۰۰ میکرو لیتر از PBS اضافه شد. در مرحلهٔ بعد به آنها مقادیر مساوی از mouse - anti IGg (۵ میکرولیتر) اضافه و متوسط شدت فلورسانس (MFI)[1] هر یک از تیترها با استفاده از دستگاه فلوسایتو متر تعیین شد (شکل ۱).



شکل ۱: تعیین حداقل غلظت اشباع کننده منوکلونال آنتی بادی ضد CD19 (مارکر اختصاصی لنفوسیتهای B)، با استفاده از آنتی بادی لایه دوم و دستگاه فلوسایتومتر.نشاندار نمودن ^{۶} ۱۰ عدد سلولهای MNC با ۱۰، ۵، ۲/۵ و ۱/۲۵ میکرولیتراز منوکلونال آنتی بادی ضد CD19. نمودار نشان دهنده ی افت MFI در تیتر ۱/۲۵ است. حداقل تیتر اشباع کننده مناسب برای CD19 مورد مصرف، ۲/۵ میکرولیتر می‌باشد.

ملاحظهٔ افت ناگهانی MFI در یک تیتر، سبب انتخاب غلظت بالاتر به عنوان تیتر مناسب اشباع کننده می‌گردید (۲۲) (شکل ۲). جهت یکنواخت شدن کار غلظت ۲/۵ میکرولیتر به عنوان حداقل تیتر اشباع کننده همهٔ mAbs انتخاب شد. این روش سبب صرفه‌جوئی در مصرف آنتی بادیهای منوکلونال گران قیمت به میزان یک چهارم گردید.

غنی‌سازی سلولهای دندریتیک با استفاده از روش‌انتخاب منفی

سلولهای تک هسته ای باقی مانده در فاز رویی فایکول (ER^{-}) جمع‌آوری شده و بعد از شستشو، با غلظت اشباع کننده از کوکتل mAbهای خالص غیرکنژوگه (شامل mAbهای ضد CD16 CD56, CD14, CD11b, CD3, CD19) در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و به مدت نیم ساعت مجاور شدند. کوکتل آنتی‌بادی‌های ذکر شده همه از ایزوتیپ IgG بوده و به سلولهای T, B, NK و منوسیت متصل می‌گردند.

دراین مرحله سلولها دوبار با بافر PBS (۰/۱درصد BSA و EDTA2mM) در دمای ۴درجه سانتی‌گراد شستشو شد. در مرحلهٔ بعد از سلولهای حاصله، سوسپانسیون سلولی با غلظت ^{۶}۱۰×۲۵ سلول در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس به ازای هر ۴۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی مذکور، ۱۷/۵ میکرولیتر از بیدهای واجد Mouse α-IgG در دمای ۴درجه سانتی‌گراد اضافه و به مدت ۱ ساعت مجاور شدند. این مرحله دوبار تکرار شد، به این صورت در کل به ازای هر سلول، ۱۴ عدد بید مصرف شد. پس از پایان انکوباسیون سلولهایی که با mAbهای ضدشاخص‌های رده‌ایی نشاندار شده‌اند، الزاماً به بیدهای واجد anti-IgG (Dynal, Biotech نروژ) متصل و در مرحلهٔ بعد با استفاده از دستگاه Magnet Particle Collector (Dynal, Biotech نروژ) حذف شدند.

سلولهای باقیمانده با آسپیراسیون جدا شده و برای بررسی توسط دستگاه فلوسایتومتر آماده می‌شدند.

آنالیز فلوسایتومتری سلولهای بدست آمده با استفاده از رنگ‌آمیزی دوگانه

در این مرحله با روش فلوسایتومتری، سلولهایی که از نظر بروز آنتی‌ژن HLA-DR مثبت بوده ولی هیچ یک از شاخص‌های مربوط به سلولهای NK, T, B و منوسیت را نداشتند، ($Lin M^{-}$/HLA-DR^{+}) مورد شناسایی و شمارش قرار گرفتند. از آنجا که سلولها قبلاً با آنتی بادی لایه اول، یعنی mAbهای ضدشاخص‌های رده‌ایی پوشانده شده‌اند، به آنها آنتی‌بادی ضد IgG، موشی کنژوگه با PE اضافه شد. بعد از نیم ساعت انکوباسیون در دمای ۴درجه سانتی‌گراد و شستشوی سلولها، جهت اشغال محل‌های اتصال اضافه آنتی‌بادی لایه دوم، سلولها به مدت ۱۰ دقیقه با سرم ۱۰درصد موش مجاور شدند و پس از یک مرحله شستشو، در مجاورت آنتی‌بادی ضد HLA-DR کنژوگه با FITC قرار گرفتند. بعد از طی مراحل رنگ‌آمیزی، سلولها با پارافرمالدئید ۱درصد فیکس شده و با دستگاه فلوساتیومتر (Partec، دانمارک) آنالیز شدند. برای هر نمونه از کنترل ایزوتیپ مناسب استفاده گردیدودرصد سلولهای $FITC^{+}$-PE^{-} که به منزلهٔ سلولهای DCs واجد HLA-DR و فاقد همهٔ شاخص‌های رده‌ایی بودند تعیین شد.

یافته‌ها

سلولهای دندریتیک دست نخورده با حذف سلولهای T, B, NK و منوسیت با روش روزت و Immunomagentic depletion، غنی سازی شدند. در روش اخیر سلولهای T, B, NK و منوسیت با تیتر اشباع کننده آنتی بادیهای منوکلونال اختصاصی ضد هر یک از این سلولها پوشیده شده وسپس با بیدهای مغناطیسی متصل به anti-mouse، از سوسپانسیون حذف

1. Mean Fluorecense Intensity

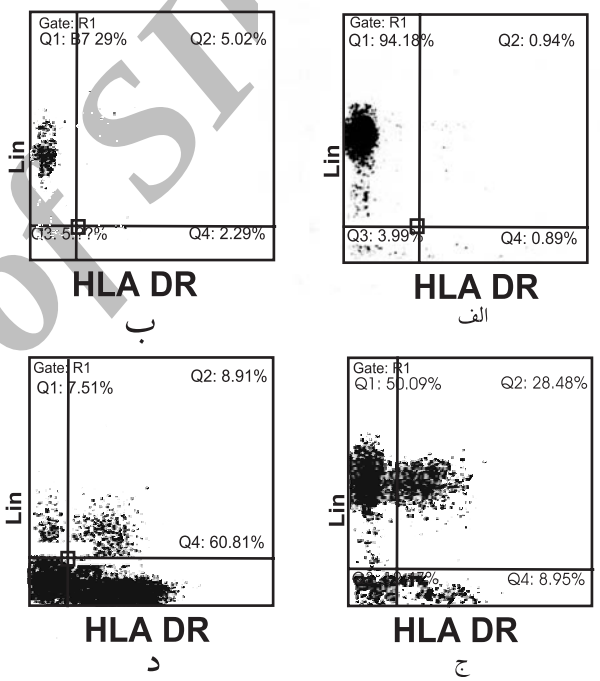
Archive of SID
www.SID.ir

شدند. سلولهای دندریتیک در مراحل مختلف غنی سازی با آنتی‌بادی ضدHLA-DR موشی (کنژوگه با FITC) و آنتی‌بادی ضد IgG موشی (کنژوگه با PE). رنگ شده و درصد DCs با استفاده از دستگاه فلوسایتومتر تعیین شد.

فراوانی سلولهای دندریتیک در هر یک از مراحل از غنی سازی در ۵ نمونه بررسی گردیده است (شکل ۲).

فراوانی سلولهای دندریتیک در خون محیطی بسیار کم بوده به صورتی که نتایج به دست آمده از سلولها با استفاده از فلوسایتومتری نشان دهندهٔ حضورکمتر از ۱درصد سلولهای DCs(Lin M$^-$/ HLA-DR$^+$) در مجموعهٔ سلولهای هسته‌دار خون محیطی بود (شکل ۲ الف).

بعد از جداسازی MNC خون محیطی به کمک فایکول فراوانی این سلولها به ۰/۳۵±۲/۵درصد رسید (شکل ۲ ب).



شکل۲: مشاهدهٔ مراحل خالص سازی DCs براساس تعداد Lin M$^-$/HLA-DR$^+$ PBDC در یک نمونه از سلولهای هسته‌دار خون محیطی (الف) سلولهای MNC (ب) سلولهای MNC بعد از حذف لنفوسیتهای T با روش روزت (جمعیت ER$^-$) (ج) سلولهای Lin خالص شده با استفاده از روش انتخاب منفی (د) سلولهای منکور با شاخص‌ای رده‌ایی کنژوگه با PE و HLA-DR کنژوگه با FITC به صورت دوگانه نشاندارد شدند. سلولهای PBDC(Lin M$^-$/HLA-DR$^+$) در ناحیه Q4 نمودار قرار گرفته و فراوانی آنها به صورت درصد نشان داده شده است .کنترل‌های ایزوتیپ مربوطه در شکل نشان داده نشده واعداد نمایندهٔ پنج آزمایش مستقل می‌باشند.

بعد از حذف سلولهای T توسط روش روزت، فراوانی سلولهای Lin M-/HLA-DR+ افزایش یافته و به ۱/۶۳ ±۷/۱۴درصد رسید (شکل ۲ ج).

حذف سلولهای NK, B و منوسیت و لنفوسیتهای T باقیمانده از مرحله قبل با روش Immunomagnetic depletion با نشاندار کردن این سلولها با mAbهای اختصاصی (anti-CD16, anti-CD14, anti-CD3 anti-CD11b, abti-CD56, anti-CD19) حذف آنها توسط بیدهای واجد Mouse-anti IgG متصل به بیدهای مغناطیسی منجر به غنی‌سازی DCs به میزان ۴/۵ ±۵۸/۵ درصد گردید (شکل ۲ د).

بحث

برای جداسازی سلولهای دندریتیک روشهای متفاوتی مورد استفاده قرار گرفته‌اند که به صورت جداگانه یا ترکیبی استفاده شده‌اند. این روشها را می‌توان به ۳ دسته روشهای Adherence depletion و Density-gradient separation و Removal of contamainating cells تقسیم کرد (۱۸).

در روش Adherence depletion از خاصیت چسبندگی افتراقی MNCs به سطوح پلاستیکی استفاده می‌شود (۲۳). پس‌از کشت کوتاه مدت (۹۰-۶۰ دقیقه) به همراه منوسیتها به کف پلیت می‌چسبند، درصورتی‌که سایر MNCs فاقد قدرت چسبندگی بوده و در این زمان می‌توان DCs را به همراه منوسیتها از سلولهای غیرچسبنده جدا کرد. ادامه کشت سلولهای چسبنده به مدت ۱۶ساعت سبب از دست رفتن خاصیت چسبندگی DCs شده و DCs در محیط کشت شناور می‌شوند، در این زمان می‌توان DCs را از منوسیتها جدا کرد. تکرار یک دور دیگر از کشت شبانه سبب حذف بیشتر منوسیتها و غنی‌سازی DC تا حد ۶۰-۲۰درصد می‌شود. جهت حذف منوسیتهایی که به پلت متصل نمی‌شوند می‌توان از بلع ذرات carbonyl iron و سپس آهن ربا استفاده کرد. DCs چون فاقد قدرت فاگوسیتوز هستند از محیط حذف نمی‌شوند (۱۸).

در روش Immunomagnetic depletion منوسیتها به همراه سایر سلولهای واجد شاخص‌های رده ایی اختصاصی با آنتی‌بادیهای منوکلونال و بیدهای anti-IgG نشان‌دار شده وهمزمان با آهن ربا از محیط خارج می‌شوند. سلولهای دندریتیک که با روش Adherence depletion جدا می‌شوند به دلایل زیر معرف واقعی DCs خون محیطی انسان نیستند: الف- سلولهای DC بعد از کشت شبانه بالغ شده، اندازه آنها بزرگتر و زوایید بلندی در سطح DCs آشکار می گردد. ابراز مولکولهای MHC، چسبان و هم تحریکی بر سطح DCs افزایش یافته و قدرت آنها در اتصال و تحریک سلول T شدت می‌یابد (۲۰).

ب - زیر گروه خاصی از DCs انسان در کشت کوتاه مدت دارای خاصیت چسبندگی شدید بوده ولی سایر DCs به کف پلت متصل نشده و تعداد قابل توجهی از آنها همراه با سلولهای غیرچسبنده از محیط حذف می‌شوند (۲۰).

درروش Density-gradient separation دانسیتهٔ DCs بعد

Archive of SID
www.SID.ir

از کشت شبانه کاهش یافته (۲۴) و می‌توان از موادگرادیان ساز مانند متریزامایدو نایکودنز برای جداسازی DCs استفاده نمود .تحقیقات انجام گرفته با استفاده از این روش، خلوص ۷۸-۲درصد با متریزامایدو (۲۵) و خلوص حدود ۲۰درصد بانایکودنز را گزارش می‌کنند (۱۹). در این روشها نیز DCs جدا شده از لحاظ ماهیت و عملکرد باDCs اولیه تفاوت دارند زیرا همانند روش Adherence depletion سلولهای دندریتیک به علت کشت شبانه بالغ شده وخاصیت دست نخوردهٔ خود را از دست می‌دهد. در عین حال چون دانسیتی زیر گروهها و به خصوص پیشسازهایDCs به صورت یکسان کاهش نمی‌یابند، DCs جدا شده نمایندهٔ همهٔ زیر گروههای DCs نخواهند بود (۱۸). علاوه بر این شواهدی مبنی بر القا تغییرات فنوتیپی و عملکردی در DCs به علت تماس با مواد گرادیان ساز مانند متریزامایدو وجود دارد (۲۰).

از جمله روشهایRemoval of contaminating cells می‌توان از روش panning نام برد. در این روش سلولهای غیر چسبندهٔ حاصل از کشت شبانهٔ MNC که واجد گیرندهٔ FC یا ایمنوگلبولین سطحی هستند با اتصال به پلیت پوشیده از Ig یا anti-Ig حذف می‌شوند (۲۶). مشکل این روش همانند روش‌های قبلی، دستکاری شدن سلول در اثر کشت شبانه و وجود گزارشاتی مبنی بر بروز $FCR_{\gamma}I,FCR_{\gamma}II$ به مقدار کم برروی تعدادی از سلولهایDC است. براساس این گزارشات روش Panning سبب حذف این دسته از DCs خواهند شد (۱۸). خلوص به دست آمده با این روش در حدود ۲۷-۹درصد گزارش شده است (۲۰).

روش Immunomagnetic depletion روش مناسبی برای جداسازی DCs تازه از خون محیطی است .این روش در مقایسه با روشهای کلاسیک جداسازی DC که از کشت in vitro ، مواد گرادیان ساز و panning استفاده می‌شود، منجر به حذف زیرگروه خاصی از DCs و القا بلوغ در آنها نشده، نیاز به وقت کمتری داشته، ساده‌تر بوده و در عین حال چون DCs بدون کشت قبلی و با روش انتخاب منفی جدا می‌شوند با مواد تغییر دهندهٔ فنوتیپ و عملکرد تماس نداشته و دستکاری نمی‌شوند. DCs جدا شده در این تحقیق، در طی مسیر غنی سازی بالغ و فعال نشده، از لحاظ اندازه در حد لنفوسیت متوسط و فاقد زایده بوده، در عین حال میزان ابراز HLA-DR بر آن زیاد نبوده (۲۰) و نمایندهٔ PBDCs واقعی می‌باشد.

متوسط خلوص به دست آمده در این تحقیق، مشابه مطالعات مشابه خارجی است. در مطالعاتی که Livingstone و همکاران که از روش مشابه استفاده نموده‌اند (خلوص ۵۳درصد) (۲۷) و Fearnely و همکاران (خلوص ۸۰-۳۰درصد) (۲۸) گزارش شده است و در تحقیق حاضر میزان خلوص حدود ۶۰درصد می‌باشد.

از این جهت روش به کار رفته در این تحقیق، روشی مناسب جهت جداسازی نمودن DC تازه بوده که با غنی‌سازی مناسب DCs زمینه را برای انجام مطالعات مختلف در مورد سلولهای دندریتیک و در پاسخهای ایمنی وهمچنین کاربرد کلینیکی آنها را فراهم می‌نماید. سلولهای دندریتیک امروزه به عنوان عامل بسیار مهم در واکسیناسیون علیه سرطانها (۲۹)، میکروارگانیسمهای عفونی (۳۰، ۳۱)، درمان عفونت HIV (۱۷) و خود ایمنی مطرح می‌باشد. جای خالی تحقیقات در این زمینه در کشور ما بارز بوده و Immunomagentic depletion روشی مناسب جهت تأمین DCs در تحقیقات آینده خواهد بود.

تقدیر و تشکر

تحقیق فوق بخشی از طرح تحقیقاتی مشترک بین سازمان انتقال خون ایران - مرکزتحقیقات، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی دانشگاه علوم پزشکی تهران و دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد، که لازم است از همکاری سازمانهای فوق در تأمین منابع مالی و پشتیبانی طرح تشکر و قدردانی شود.

References

1. Steinman RM: Dendritic cells. In “Fundamental Immunology” (Paul WE ed.), 4th ed, Lippincott-Raven, Philadelphia,1999; 547-574

2. Robinson SP: Identification and immunophenotypic analysis of peripheral blood dendritic cells. In “Dendritic cell protocols” (Robinson SP and stagg AJ eds.) 1. Humana press, New Jersey, 2002; 111-199

3. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P: Langerhans cells-dendritic cells of the epidermis. APMIS. 2003; 111(7-8): 725-740

4. Hart DNJ: Dendritic cells and their emerging clinical applications. Pathol. 2001; 33: 479-492

5. Strobl H, Scheinecker C, Riedl E,Csmaritis B,Bello-Fernandez C, Pickl WF, Majdic O, Knapp W: Identification of $CD68^{+}$ in peripheral blood cells with dendritic precursor charcteristics. J Immunol. 1998; 161(2);740-748

6. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, ebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Paluka K: Immunobiology of dendritic cells. Ann Rew Immunol. 2000; 18: 767-811

7. Thomas R, Lipsk PE: Human peripheral blood dendritic cell subsets. J. Immunol. 1994; 153: 4016-4028

8. Yrlid U, Macpherson G: Phenotype and function of rat dendritic cell subsets. APMIS. 2003; 111(7-8):756-765

Archive of SID
www.SID.ir

9. Kuwana M: Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. Hum Immunol. 2002; 63(12): 1156-1163
10. Vieweg J, Dannull J: Tumor vaccines: from gene therapy to dendritic cells-the emerging frontier. Urol Clin North Am. 2003; 30(3); 633-643
11. Svane IM, Soot ML, Buus S, Johnsen HE: Clinical application of dendritic cells in cancer vaccination therapy. APMIS. 2003; 111(7-8): 818-834
12. Cho HJ, Bhardwaj N: Against the self: dendritic cells versus cancer. APMIS. 2003; 111(7-8): 805-817
13. Bubnoff DV, Koch S, Bieber T: Dendritic cells and atopic eczema / dermatitis syndrome. Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2003; 3(5): 353-358
14. Kavanaugh A: An overview of immunomodulatory intervention in rheumatoid artheritis. Drugs Today. 1999; 35(4-5): 275-286
15. Kolb-Maurer A, Kurzai O, Goebel W, Frosch M: The role of human dendritic cells in meningococcal and listerial meningitis. Int J Med Microbiol. 2003; 293(4): 41-249
16. Buentke E, Scheynius A: Dendritic cells and fungi. APMIS. 2003; 111(7-8): 789-796
17. Lore K, Larsson M: The role of dendritic cells in the pathogenesis of HIV-1 infection. APMIS. 2003; 111(7-8): 776-788
18. William LA, Egner W, Hart DNJ: Isolation and funtion of human dendritic cells. Int Reu Cytol. 1994; 153; 41-101
19. McLellan AD, Starling GC, Hart DNJ: Isolation of human blood dendritic cells by discontinuous nycodenz gradient centrifugation. J. Immunol. Methods. 1995; 81: 184-189
20. O'Doherty U, Steinman RM, Peng M, Cameron PU, Gezelter S, Kopeloff I, Swiggard WJ, Pope M, Bhardwaj N: Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. J Exp Med. 1993; 17(3): 67-1078
21. McLellan AD, Starling GC, Williams LA, Hock BD, Hart DNJ: Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule Eur JImmunol. 1995; 25: 2064-2068
22. Loken MR, Green CL, Wells DA: Immunofluorescence of surface markers. In:"Flow Cytometry-A Practical Approach (Ormerod MG ed.) 3th ed, 2000; 61-82
23. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G: Human dendritic cells. Enrichment and characterisation of human peripheral blood dendritic cells. J Exp Med. 1982; 155: 1172-1182
24. Xu H, Friedrichs U, Gieseler RK, Ruppert J, Ocklind G, Peters JH: Huamn blood dendritic cells exhibit a distinct T-cell stimulating mechanism and differentiation pattern. Scand J Immunol. 1992; 36: 689-696
25. Knight SC, Farrant J, Bryant A, Edwards AJ, Burman S, Lever A, Clarke J, Webster AD: Nonadherent, low density cells from human peripheral blood contain dendritic cells and monocyte, both with veiled morphology. Immunology, 1986; 5: 595-603
26. Brooks CF, Moore M: Differential MHC Class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. Immunology 1988; 63: 303-311
27. Livingstone WJ, Moore M, Innes D, Bells JE, Simmonds P: Frequent infection of peripheral blood CD8 positive T-Lyphocytes with HIV-1. Lancet 1996; 348; 649-654
28. Fearnley DB, McLellan AD, Mannering SI, Hock BD, Hart DN: Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal Antibody: Implications for studies on Antigen-presenting cell function and Immunotherapy. Blood 1997; 89(10): 3708-3716
29. Tatsumi T, Storkus WJ: Dendritic cell-based vaccines and therapies for cancer. Expert Opin Biol Ther. 2002; 2(8): 919-928
30. Sundquist M, Johansson C, Wick MJ: Dendritic cells as inducers of antimicrobial immunity in vivo, APMIS. 2003; 111(7-8): 715-724
31. Carbone FR, Heath WR: The role of dendritic cell subsets in immunity to viruses. Curr Opin Immunol. 2003; 15(4): 416-420

Archive of SID
www.SID.ir