مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۱۹، شماره ۲، خرداد و تیر ۱۳۹۰
صفحه: ۲۴۱-۲۳۰

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 19, No. 2, May-Jun 2011
Pages: 230-241

تاثیر مایع رویی سلول های اپیتلیال پوست و اندوتلیال ورید ناف انسان، در القای بلوغ سلول های دندریتیک نوع یک

میثم گنجی بخش*[۱]، وحید نجاتی[۲]، نوروز دلیرژ[۳]، معصومه اسدی[۴]، فرح فرخی[۵]، کیکاووس غلامی[۶]

۱،۴،۶- دانشجویان کارشناسی ارشد بافت شناسی و جنین شناسی، دانشگاه ارومیه
۲- استادیار گروه زیست شناسی، دانشگاه ارومیه
۳-استادیار گروه ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۸۹/۱۱/۲۱

چکیده

مقدمه: پتانسیل بالای سلول‌های دندریتیک در عرضه آنتی ژن و نقش آنها به عنوان یک اجوانت سلولی و از همه مهم تر قابلیت تولید و دستکاری آنها در شرایط محیط کشت، این فرصت را به وجود آورده که از آنها در ایمونوتراپی سرطان، جلوگیری از رد پیوند، درمان آلرژی و بیماری های خود ایمن و درمان برخی بیماری های عفونی استفاده کنند. هدف از این پژوهش تولید سلولهای دندریتیک کارآمد جهت استفاده در ایمنوتراپی و سلول درمانی می باشد.

روش بررسی: تولید سلول‌های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول‌های مونوسیت تحت تاثیر سیتوکاین های GM-CSF و IL-4 به سلولهای دندریتیک نابالغ تبدیل شدند و در مرحله دوم این سلولها در حضور مایع رویی سلول های اپیتلیال پوست(A375) و سلول های اندوتلیال ورید ناف انسان(HUVEC) و عوامل بلوغ، به سلولهای دندریتیک بالغ تبدیل شدند و از لحاظ توانایی فاگوسیتوز و فنوتیپ و میزان تحریک لنفوسیت های T و مقدار سایتوکین های تولید شده مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: سلول‌های دندریتیک تولید شده با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه خواری شان به شدت کاسته شد، بروز نشانگرهای سطحی در آنها افزایش یافت و توانایی تحریک سلول های T در آنها تقویت شده بود و میزان ترشح سایتوکین‌های IL-12 در آنها افزایش یافته بود.

نتیجه گیری: مایع رویی سلول‌های اپیتلیال پوست و اندوتلیال ورید ناف انسان، باعث القای بلوغ سلول های دندریتیک مشتق از مونوسیت می گردند و باعث بهبود فنوتیپ و عملکرد سلول‌های دندریتیک می شوند و همچنین باعث تولید DC1 و Th1 در شرایط آزمایشگاهی می‌گردند.

واژه های کلیدی : سلول دندریتیک- مونوسیت- اپیتلیال- اندوتلیال- بلوغ

* (نویسنده مسئول)؛ تلفن همراه: ۰۹۳۵۹۶۸۹۹۸۵ ، پست الکترونیکی:meysam_ganjy@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

پتانسیل بالای سلول های دندریتیک(DC: Dendritic Cells) در عرضه آنتی ژن و نقش آنها به عنوان یک اجوانت سلولی و از همه مهم تر قابلیت تولید و دستکاری آنها در شرایط کشت سلول، این فرصت را به وجود آورده که نه تنها در ایمونوتراپی سرطان، بلکه در درمان برخی بیماری های عفونی نیز بتوان از این سلول‌ها استفاده نمود. برای مثال وقتی محققین افراد آلوده به ویرس HIV-1 را با سلول های دندریتیک اتولوگ حاوی ویروس غیرفعال شده، واکسینه کردند، با کاهش پایدار بار ویروسی آنها رو به رو شدند(۱). همچنین این سلول ها در جلوگیری از رد پیوند، درمان آلرژی و بیماری های خود ایمن کاربردهای شگفت انگیزی دارند(۲). برای بدست آوردن سلول‌های دندریتیک روش های بسیار متنوعی وجود دارد که بسته به هدف استفاده، نوع سلول دندریتیک، مرحله بلوغ، میزان مورد نیاز، صرفه اقتصادی و غیره می توان از آنها استفاده کرد. بعد از اثبات کارآیی این سلول ها در درمان سرطان، دانشمندان دریافتند که چگونه این سلول ها را به بهترین نحو و با بهترین کارایی در محیط کشت تولید کنند(۳). در سال ۱۹۹۴ محققین توانستند سلول های دندریتیک را از مونوسیت های خون محیطی متمایز کنند. آنها گزارش کردند که با کشت مونوسیت ها تحت تاثیر IL-4 و GM-CSF، سلول های دندریتیک حاصل می شوند(۴). سلول های دندریتیک را می توان طی یک فرآیند پیچیده از خون محیطی جدا کرد و با توجه به این که درصد خلوص سلول های دندریتیک حاصل از این روش بیش از ۸۰ تا ۹۰ درصد می باشد ولی سلول های دندریتیک ۰/۱ تا ۱ درصد سلول های تک هسته‌ی خون محیطی را تشکیل می دهند، لذا میزان سلول دندریتیک بدست آمده با این روش به میزان سلول های تک هسته‌ای خون محیطی بستگی دارد(۵). بنابراین دستیابی به تعداد کافی از سلول های دندریتیک با این روش برای کاربردهای تحقیقاتی و درمانی با محدودیت مواجه بود تا اینکه تولید انبوه این سلول ها از منوسیت های خون محیطی و با استفاده از سایتوکین های GM-CSF، IL-4 و TNF-α ابداع گردید. توانایی سلول های دندریتیک در عرضه آنتی‌ژن‌های مختلف، بویژه آنتی‌ژن‌ها توموری، به لنفوسیت های T و القای پاسخ ایمنی اختصاصی باعث شده تا این سلول ها به عنوان وسیله‌ای مؤثر در ایمونوتراپی فعال، توجه محققین علوم پایه و بالینی را به خود جلب نماید(۶). فرایند بلوغ را می توان با استفاده از سایتوکاین های التهابی مثل IL-1β, TNF-α و PGE2 و IFN-α القای کرد، همچنین امروزه از Poly I و MCM نیز استفاده می شود(۱۹). سلول های اپیتلیال علاوه بر داشتن نقش سد فیزیکی در برابر آنتی‌ژن‌ها، دارای عملکردهای دیگری همچون ترشح سیتوکین و کموکین ها می باشند که با تولید این مواد در تکامل و تمایز سلول های دندریتیک موثر می باشند و همچنین به عنوان یک مدیاتور در التهاب مجاری هوایی نیز ایفای نقش می کنند. این سلول ها قادر به تولید انواعی از سیتوکین های التهابی و یا کموکاین ها مانند: GM-CSF، IL-1ß، IL-6، IL-8، cotaxin،TGF می باشند(۸،۷).

همچنین مایع روئی سلول های اندوتلیال ورید ناف انسان، حاوی فاکتورهای VEGF, BFGF, IGF, EGF می باشد که می‌تواند باعث تمایز سلول های تشکیل دهنده کلونی هماتوپویتیک شوند و بر روند بلوغ و تکامل سلول های دندریتیک موثر باشند(۹).

بنابراین در این تحقیق، تاثیر مایع رویی سلول‌های اپیتلیال پوست(A375) و اندوتلیال ورید ناف انسان(HUVEC)، در القای بلوغ سلول های دندریتیک مشتق از مونوسیت مورد بررسی قرار گرفت و سلول های دندریتیک تولید شده با این روش، از لحاظ توانایی فاگوسیتوز و فنوتیپ و میزان تحریک لنفوسیت های T و پاسخ پلاریزاسیون لنفوسیت های T به این سلول ها مورد ارزیابی قرار گرفتند.

روش بررسی

این مطالعه به روش تحلیلی توصیفی انجام شد. در این تحقیق، در گروه کنترل، تولید سلول های دندریتیک بدون استفاده از مایع رویی سلول های اندوتلیال ورید ناف و اپیتلیال پوست انجام گرفت و در گروه تیمار تولید سلول های دندریتیک تحت تاثیر مایع رویی سلول های اندوتلیال و

Archive of SID

www.SID.ir

اپیتلیال انجام پذیرفت. تولید سلول های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول های چسبنده به مدت پنج روز تحت تاثیر سیتو کاین های GM-CSF و IL-4(سیگما- آمریکا) به سلول های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند و در مرحله دوم سلول های دندریتیک نابالغ به مدت دو روز در حضور مایع رویی سلول های اپیتلیال پوست(A375) و سلول های اندوتلیال ورید ناف انسان(HUVEC) و دیگر عوامل بلوغ، به سلول های دندریتیک بالغ تبدیل شدند.

در ابتدا مقدار ۵۰ میلی لیتر خون هپارینه(200 U/ml) از افراد داوطلب اخذ گردید وخون هپارینه با ۵۰ میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 رقیق گردید و خون رقیق شده به آرامی بر روی فایکول که حجم آن برابر خون رقیق نشده بود قرار گرفت سپس مجموعه خون رقیق شده و فایکول با سرعت g ۸۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید.

در ادامه سلول های تک هسته ای خون محیطی(PBMC) که در حد فاصل فایکول و خون رقیق شده جمع شده بودند به آرامی جمع آوری گردید و PBMC بدست آمده به منظور حذف فایکول همراه آن با محیط کشت(Gibco- انگلستان) RPMI -1640 مخلوط و با سرعت g ۴۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و سلول های حاصل مجدداً با محیط کشت RPMI 1640 مخلوط و این بار به منظور حذف پلاکت های همراه PBMC با سرعتg ۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید و تعداد و میزان زنده بودن سلول های تک هسته ای خون محیطی بدست آمده، با استفاده از رنگ تریپان بلو تعیین گردید.

سپس سلول های PBMC به تعداد ۴×۱۰۶ سلول در هر میلی لیتر و به مقدار ۵ میلی لیتر در هر فلاسک کشت T25 در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی پنی سیلین(۱۰۰ U/ml)، استروپتومایسین(۱۰۰ g/ml) و FBS(10%) به مدت ۲ ساعت در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، CO2 (۵ ٪) و رطوبت(۹۰٪) انکوبه گردید. بعد از اتمام زمان انکوباسیون سلول‌هایی که به فلاسک نچسبیده بودند با دو بار شستشوی آرام، جدا شده و از فلاسک خارج گردیدند. لازم به ذکر است که تولید سلول های دندریتیک در دو مرحله صورت گرفت که در مرحله اول سلول های چسبنده تحت تاثیر سیتو کاین های GM-CSF و IL-4 به سلول های دندریتیک نابالغ تبدیل شدند و در در مرحله دوم سلول های دندریتیک نابالغ در حضور مایع رویی سلول‌های اپیتلیال پوست(A375) و سلول های اندوتلیال ورید ناف انسان(HUVEC) و دیگر عوامل بلوغ، به سلول های دندریتیک بالغ تبدیل شدند.

در ادامه به سلول های چسبنده که اکثریت آنها را منوسیت‌ها تشکیل می دادند محیط کشت جدید به اضافه (GM-CSF ۱۰۰۰U/ml) و IL-4 (۵۰۰ U/ml) اضافه و به مدت ۵ روز کشت داده شد و در روز سوم مجدداً مقادیر مشابهی از GM-CSF و IL-4 به فلاسک‌های حاوی سلول اضافه گردید(مرحله اول).

در روز پنجم به سلول های دندریتیک نابالغ تولید شده مایع رویی سلول های اپیتلیال پوست(A375) (۲۵٪) و مایع رویی سلول های اندوتلیال ورید ناف(HUVECE)(۲۵٪)، (ml/ng ۱۰TNF-α)، (۲۵٪)MCM و POLY-IC(۲۰ng/ml) (سیگما- آمریکا) به عنوان عوامل بلوغ و عصاره سلول های سرطانی(k562) به عنوان آنتی ژن اضافه گردید. در روز هفتم سلول های دندریتیک برداشت شدند و از نظر مورفولوژی، فنوتیپ و قدرت تحریک تکثیر و پاسخ پلاریزاسیون لنفوسیت های T و میزان ترشح سایتوکین های IL-10 و IL-12 مورد سنجش قرار گرفتند.

به منظور تولید مایع رویی سلول های اندوتلیال و اپیتلیال، سلول های اندوتلیال ورید ناف انسان(HUVEC) و اپیتلیال پوست انسان(A375) از بانک سلولی ایران تهیه گردید و در فلاسک کشت سلولی T75 در محیط کشت(Gibco- انگلستان) DMEM و RPMI حاوی پنی سیلین(۱۰۰ U/ml)، استروپتومایسین(۱۰۰ g/ml) و FBS(۱۰٪) در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، CO2 (۵ ٪) و رطوبت(۹۰ ٪) کشت داده شدند.

بعد از آنکه ۸۰ ٪ از کف فلاسک ها بوسیله سلول ها پوشیده گردید، مایع رویی دور ریخته شد و مقدار ۸ میلی لیتر محیط

Archive of SID

www.SID.ir

کشت تازه RPMI-1640 بدون سرم، به فلاسک ها اضافه گردید و بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون، مایع رویی جمع آوری و سانتریفیوژ(۲۰۰۰G) گردید. سپس مایع رویی جمع آوری شد و با فیلتر سرسرنگی (۲۲ µm) استریل گردید و برای استفاده بعدی در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد قرار داده شد.

برای تعیین فنوتیپ سلول های دندریتیک، در روز هفتم سلول های دندرتیک برداشت گردیدند و فنوتیپ آنها از لحاظ بیان ملکول های CD83، CD14، CD80، HLA-DR و CD86 بوسیله استفاده از آنتی بادی های ضد نشانگرهای سطحی (DAKO– دانمارک) با دستگاه فلوسیتومتری FACSCalibor (شرکت Becton- Dickinson آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت و نتایج حاصل با نرم افزار CellQuest مورد آنالیز قرار گرفت. توانایی فاگوسیتوز سلول های دندریتیک تولید شده با استفاده از بید لاتکس فلورسانت (کنژوگه با FITC)(سیگما- آمریکا) و دستگاه فلوسایتومتری در دو حالت نابالغ(روز پنجم) و حالت بالغ(روز هفتم) مورد ارزیابی قرار گرفت، همچنین به منظور سنجش قدرت سلولهای دندریتیک تولید شده(سلول های محرک) از نظر تحریک تکثیر لنفوسیتهای T(سلول های پاسخ دهنده) واکنش مختلط لکوسیتی(MLR) آلوژن، انجام پذیرفت و برای این منظور تعداد ۵ ۱۰ لنفوسیت با نسبت‌های مختلف (۱:۵، ۱:۱۰ و۱:۲۰) با سلول‌های دندریتیک مخلوط و به مدت ۵ روز در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ته گرد در محیط کشت RPMI-1640، به اضافه ۱۰٪ سرم +AB انسانی در حجم ۲۰۰µl در دمای ۳۷ °C، (۵ ٪) CO2 و ۹۰٪ رطوبت کشت داده شدند. سپس در روز پنجم به هر خانه مقدار(Ci(Curie µ ۱/۵ متیل تیمیدین نشاندار شده با [3H] (Amersham- انگلستان) اضافه و به مدت ۱۸ ساعت دیگر انکوبه گردید و سپس میزان تکثیر لنفوسیت های T با استفاده از دستگاه Cell harvester(ICN-انگلستان) و دستگاه شمارشگر بتا(شرکت Wallac-فنلاند) مورد سنجش قرار گرفت.

میزان ترشح IL-12 و IL-10 از سلول های دندریتیک حاصل شده به وسیله کیت الیزا(Peprotech– آمریکا) مورد ارزیابی قرار گرفت همچنین به منظور بررسی پلاریزاسیون لنفوسیت های T تحریک شده به وسیله سلول های دندریتیک، میزان ترشح IL-4 و INF-γ از طریق مایع رویی واکنش مختلط لکوسیتی(MLR) به وسیله کیت الیزا(Peprotech– آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت. تمامی آزمایش ها با سه مرتبه تکرار به ثبت رسیدند و نتایج با برنامه SPSS Ver 17 تفسیر و بررسی شد. مقایسه داخل گروه ها توسط Paired t test و One way ANOVA انجام شد و مقدار P<۰/۰۵ معنی دار در نظر گرفته شد. همچنین غلظت سایتوکاین ها توسط نرم افزار CUREXPERT 0.7 مورد آنالیز قرار گرفت.

لازم به ذکر است کار با تایید کمیته اخلاق پژوهشی همراه بوده است و از افراد داوطلب رضایت گرفته شده است. این مطالعه به منظور تولید سلول های دندریتیک مناسب ایمنوتراپی تومور از تیر ماه سال ۱۳۸۸ تا شهریور ۱۳۸۹ درClean Room پژوهشکده‌ی زیست فناوری دانشگاه ارومیه صورت گرفت و تمام مراحل مربوط به دستکاری های سلولی از جمله: کشت، برداشت، اضافه کردن مواد، تهیه سوسپانسیون سلولی، قسمت عمده ای از آزمایش های مختلف و غیره زیر هود دارای جریان هوای لامینار به انجام رسید.

نتایج

۱- بررسی قدرت بیگانه خواری سلول های دندریتیک نابالغ و بالغ: میزان فاگوسیتوز سلول های دندریتیک نابالغ و بالغ با استفاده از روش فلوسایتومتری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج فلوسیتومتری به دست آمده نشان داد که میانگین درصد سلول‌های دندریتیکی که بیگانه خواری انجام داده اند در مورد گروه کنترل در حالت نابالغ(روز پنجم) ۲۴/۱۳٪ بوده است و در حالت بالغ این مقدار به ۴/۵۶٪ کاهش یافته است و این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار با همدیگر می باشند. همچنین در مورد تیمار میانگین درصد سلول های دندریتیکی که بیگانه خواری انجام داده بودند در حالت نابالغ ۳۵/۶۷ ٪ بوده است و این مقدار در حالت بالغ به ۲/۹۴ ٪ کاهش یافته است و این مقادیر نیز دارای اختلاف معنی‌دار با یکدیگر می باشند. همچنین بین کنترل و تیمار از لحاظ آماری تفاوت معنی دار مشاهده می شود(نمودار ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

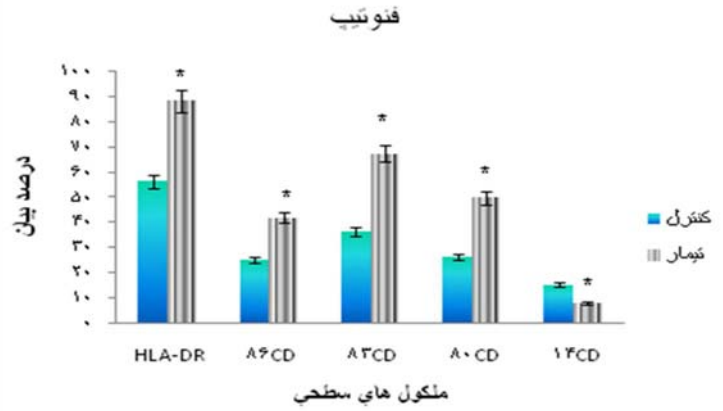
۲- بررسی فنوتیپ سلول های دندریتیک: درصد بیان مولکول های CD14 ، CD80، CD83 ، CD86 و HLA-DR با استفاده از دستگاه فلوسایتومتری مورد ارزیای قرار گرفت که نتایج آن بصورت میانگین درصد بیان مولکول ها، در نمودار شماره ۲ ارائه شده است.

همانگونه که در نمودار شماره ۲ مشاهده می شود میزان بیان CD14 از مقدار ۱۵/۲۴٪ در گروه کنترل به مقدار ۷/۹۸٪ درگروه تیمار کاهش یافته که دارای اختلاف معنی دار نسبت به هم می باشند و میزان بیان ملکول CD80 از ۲۶/۳۵٪ در گروه کنترل به مقدار ۴۹/۶۸٪ درگروه تیمار افزایش یافته که این افزایش دارای اختلاف معنی‌دار با گروه کنترل می باشد. همچنین میزان بیان ملکول CD83 از ۳۶/۵۸٪ در گروه کنترل به مقدار ۶۷/۳۷٪ درگروه تیمار افزایش یافته که این افزایش نیز دارای اختلاف معنی دار با گروه کنترل می باشد و میزان بیان ملکول CD86 از ۲۴/۹۸٪ در گروه کنترل به مقدار ۴۱/۹۳٪ در تیمار۱ افزایش یافته است و نیز میزان بیان ملکول HLA-DR از ۵۶/۲۵٪ در گروه کنترل به مقدار ۸۸/۲۴٪ در تیمار ۱ افزایش یافته است که این مقادیر دارای اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل می باشند.

۳- نتایج واکنش مختلط لوکوسیتی(MLR) آلوژن: این آزمایش برای سنجش عملکرد سلول های دندریتیک تولید شده از لحاظ توانایی آنها در القای تکثیر لنفوسیت های T در گروه تیمار و گروه کنترل، انجام گرفت و نتایج حاصل نشان داد که سلول های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار دارای توانایی بیشتر در القای تکثیر لنفوسیت های T نسبت به سلول های دندریتیک گروه کنترل می باشند(نتایج به صورت میانگین cpm در نمودار شماره ۳ نمایش داده شده است) و دارای اختلاف معنی‌دار از نظر آماری با یکدیگر می باشند($P<۰/۰۵$).

۴-بررسی میزان سایتوکین های ترشح شده از سلول های دندریتیک: به منظور اندازه گیری سایتوکین های ترشح شده از سلول های دندریتیک در حالت بالغ(روز هفتم)، میزان ترشح IL-12 و IL-10 به وسیله کیت الیزا مورد سنجش قرار گرفت و میانگین نتایج آنها بر حسب ng/ml در نمودار شماره ۴ ترسیم شده است و مشاهده گردید که میزان ترشح IL-12 و IL-10 بین گروه کنترل و گروه تیمار دارای اختلاف معنی دار می‌باشد.

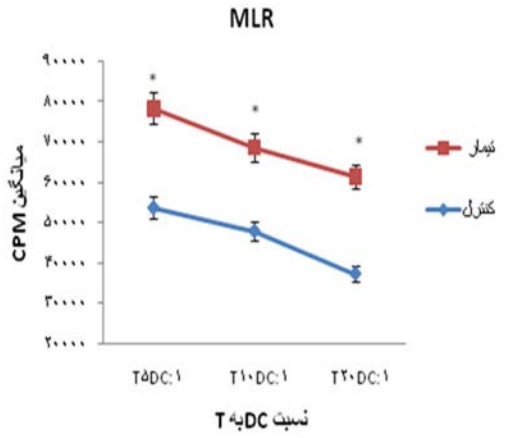
۵- بررسی سایتوکین های ترشح شده از لنفوسیت های T تحریک شده با سلول های DC: میزان ترشح سایتوکین INF-γ و IL-4 از لنفوسیت های T، که توسط سلول های دندریتیک گروه کنترل و تیمار تحریک شده بودند از طریق مایع رویی جمع آوری شده در تست MLR، بوسیله کیت الیزا مورد سنجش قرار گرفت و میانگین نتایج آنها بر حسب ng/ml در نمودار شماره ۵ نشان داده شده است همانگونه که مشاهده می شود بین این گروه ها از لحاظ آماری اختلاف معنی دار مشاهده نگردید ($P<۰/۰۵$).



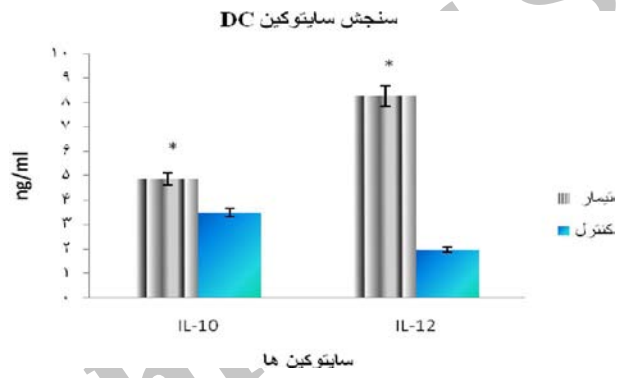
نمودار ۱: میانگین درصد بیگانه خواری در سلول های دندریتیک گروه کنترل و تیمار در حالت نابالغ و بالغ (* وجود اختلاف معنی دار بین حالت بالغ و نابالغ $P<۰/۰۵$)

Archive of SID

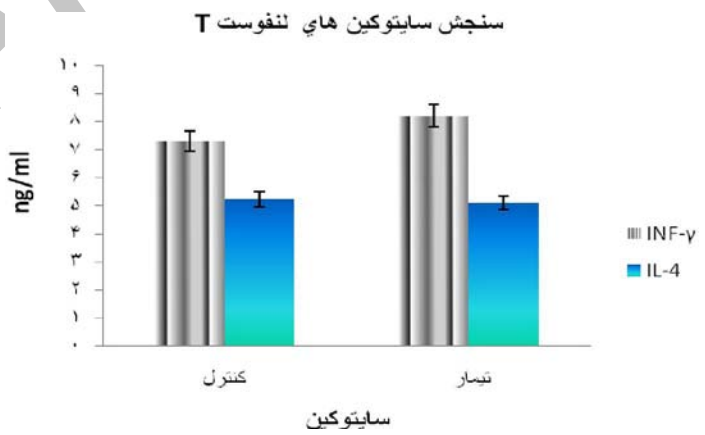
www.SID.ir



نمودار ۲: فنوتیپ سلول های دندریتیک در گروه کنترل و تیمار(* وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل P <۰/۰۵)

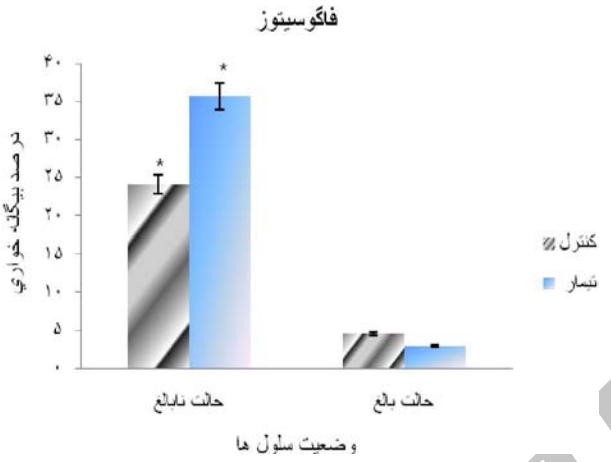


نمودار ۳: مقایسه میانگین نتایج حاصل از واکنش MLR با استفاده از متیل تایمیدین نشاندار در گروه کنترل و تیمار

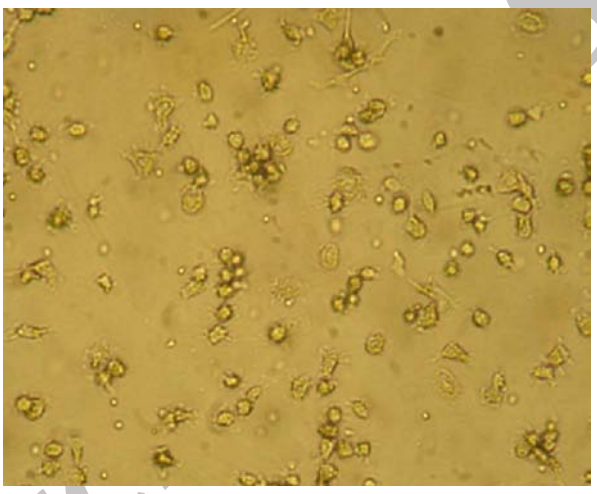


نمودار ۴: میانگین میزان ترشح سایتوکین‌های IL-10 و IL-12 از سلول های دندریتیک در حالت بالغ(* وجود اختلاف معنی دار با گروه کنترل P<۰/۰۵)

Archive of SID
www.SID.ir



نمودار ۵: میانگین میزان ترشح سایتوکین های IL-4 وIFN-γ از لنفوسیت های T که توسط سلول های دندریتیک تحریک شده بودند



شکل ۱: سلول های دندریتیک بالغ (روز هفتم) در گروه تیمار با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر

بحث و نتیجه گیری

باید به این نکته توجه داشت که تولید سلول های دندریتیک کاملاً بالغ، یکدست و دارای تمامی مشخصه های مورد نیاز برای استفاده در ایمنوتراپی تومور(۱۰)، در شرایط آزمایشگاه، کاری بسیار مشکل و نسبی است. ویژگی مورد نظر در خصوص سلول دندریتیک به نوع استفاده ما از این سلول پر ارزش بستگی دارد و ممکن است در استفاده های مختلف، متفاوت باشند، به طور مثال اگر ما بخواهیم از این سلول برای القای تحمل محیطی استفاده کنیم باید از طریق دستکاری های ژنتیک یا تیمار با مواد شیمیایی خاص، سلولی را در محیط کشت، بار بیاوریم که دارای مولفه های تحمل زایی نظیر IL-10، $CD40^{-}$ و $CD80/86^{-}$ باشد، همچنین این سلول باید در ضمن اخذ بهینه آنتی ژن، بتواند در پاسخ به کموکاین های مهاجرتی به سمت اعضای لنفاوی ثانویه حرکت کرده و در آنجا عرضه تخصصی آنتی ژن را نیز به خوبی انجام دهد(۱۱). برعکس اگر انتظار ما از یک سلول دندریتیک، ایمنی زایی باشد، پس باید این سلول را در معرض

www.SID.ir

سایتوکاین هایی قرار بدهیم که پاسخ سلول به آنها در هر مرحله از تمایز، نسبتاً شبیه به اتفاقات بدن در پاسخ به یک ایمنوژن خارجی باشد. به این ترتیب که در وضعیت نابالغ با حداکثر توان آنتی ژن مورد نظر را دریافت و پردازش کرده، با بروز گیرنده های کموکاینی نظیر CCR7 و CXCR4 متضمن مهاجرت صحیح بوده و با عرضه‌ی آنتی ژن توسط MHC II، نشان دهنده راه اندازی مسیر تخصصی پاسخ ایمنی باشد. البته عرضه متقاطع از طریق MHC I نیز می تواند تحت تمهیدات آزمایشگاهی بدست آید که نوید راه اندازی پاسخ تخصصی از طریق سلولی(CMI) است(۱۲). همچنین یک سلول دندریتیک ایده‌آل برای ایمنوتراپی باید بتواند بعد از بلوغ و به عنوان یکی از مشخصه‌های اصلی بلوغ، سلول های T اختصاصی را در نهایت توان تحریک کند که ابزارهای آن برای این امر، مولکول‌های کمک تحریکی مثل CD40 و CD80/86، مولکول های چسبندگی و سایتوکاین هایی مثل IL-12 می باشد(۱۳).

همچنین انتظار می رود سلول های دندریتیک با تغییر وضعیت از حالت نابالغ به بالغ، قدرت بیگانه خواری و تمامی ویژگی های لازم برای اخذ آنتی ژن از جمله گیرنده های سطحی لازم برای این کار را از دست داده و در عوض قدرت عرضه آنتی ژن و نهایتاً تحریک سلول های T را تقویت کنند(۱۴). همانطور که در نتایج ملاحظه گردید سلول های دندریتیک گروه تیمار از این لحاظ نسبت به گروه کنترل دارای برتری بودند و این سلول ها در حالت نابالغ دارای توانایی بیشتر در فاگوسیتوز ذرات لاتکس بید نسبت به گروه کنترل بودند و هنگامی که بالغ شدند توانایی فاگوسیتوزشان به شدت کاهش یافت که این مسأله نشان دهنده تاثیر مایع رویی سلول های اندوتلیال و اپیتلیال، در القای بلوغ سلول های دندریتیک می باشد. یکی دیگر از مشخصه های مورد بحث در مورد سلول دندریتیک بالغ قدرت تحریک تکثیر لنفوسیت های T بوسیله سلول های دندریتیک می باشد که در این تحقیق، این شاخص به وسیله واکنش مختلط لکوسیتی(MLR)، مورد ارزیابی قرار گرفت(۱۵) و همانگونه که در بخش نتایج مشاهده گردید سلول های دندریتیک در گروه تیمار لنفوسیت های T را بیشتر تحریک کرده بودند و سبب تکثیر بیشتری شده بودند. بنابراین می توان گفت که افزایش تحریک تکثیر، به واسطه بلوغ و بیان بالای مولکول های کمک تحریکی CD86, CD80 توسط سلول های دندریتیک در گروه تیمار می باشد. Atsuta و همکاران در این رابطه بیان می کنند که دو نوع سلول اپیتلیال برانشیال و الوئولار از طریق تولید IL-15 می توانند باعث القای بلوغ در سلول های دندریتیک شوند و توانایی تحریک تکثیر لنفوسیت های T به وسیله سلول های دندریتیک را افزایش دهند(۱۶). در سال ۲۰۰۹ Xuan Sun و همکاران گزارش کردند که مایع روئی سلول های اندوتلیال مغز استخوان موش که حاوی فاکتورهای VEGF, BFGF, EGF IGF, می باشد که می تواند باعث تمایز سلول های بنیادی مغز استخوان موش به سلول های (+FLKاندوتلیال) و سلول های تشکیل دهنده کلونی هماتوپویتیک شوند(۱۷).

موضوع مورد بحث دیگر در رابطه با سلول های دندریتیک، فنوتیپ این سلول ها می باشد و همانگونه که در بخش نتایج ملاحظه گردید، سلول های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار از لحاظ فنوتیپ دارای شاخص های بهتری نسبت به گروه کنترل بودند که یکی از این شاخص های فنوتیپی، میزان بیان ملکول CD14 در سطح سلول های دندریتیک می باشد. باید توجه داشت که سلول های دندریتیک بالغ می بایست دارای مقادیر کاهش یافته ای از CD14 بر سطح خود باشند، که این کاهش در واقع در حین بلوغ و به واسطه‌ی کاهش نسخه برداری از ژن CD14 بر اثر IL-4 اضافه شده، رخ می دهد(۱۸). بنابراین سلول های DC تولید شده در گروه تیمار از این لحاظ نسبت به گروه کنترل برتری داشتند و کاهش بیان ملکول CD14 در سطح آنها نشان دهنده بلوغ این سلول ها می باشد.

از دیگر شاخص‌های فنوتیپی سلول های دندریتیک، بیان ملکول CD83 در سطح این سلول ها می باشد، این نشانگر جزو ابرخانواده ایمنوگلوبولین ها بوده و هنوز نقش اصلی آن در هاله ای از ابهام است. البته به نظر می رسد این مولکول سطحی در تنظیم ایمنی سلولی بی تاثیر نباشد(۱۹). همچنین

Archive of SID

www.SID.ir

از مشخصه های اصلی بلوغ سلول های دندریتیک، بیان بالای مولکول های کمک تحریکی مثل CD40، CD80/86، در سطح این سلول ها و ترشح سایتوکاین هایی مثل IL-12 می باشد(۱۳). سلول های دندریتیک همچنین می‌توانند عملکرد لنفوسیت های T تنظیم کننده را نیز کنترل نمایند. این سلول ها از طریق ترشح سیتوکین های IL-12 و اینترفرونهای کلاس I و II نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند(۲۰). همانگونه که در نتایج ملاحظه گردید بیان ملکول های CD80 و CD86 در سطح سلول های دندریتیک گروه تیمار به میزان چشمگیری نسبت به گروه کنترل افزایش یافته بود و این عامل باعث شده بود که این سلول ها بتوانند لنفوسیت های T را به میزان بیشتری نسبت به گروه کنترل تحریک کنند تا تکثیر یابند و این مسأله نشان دهنده تاثیر مایع رویی سلول های اندوتلیال و اپیتلیال در القای بلوغ سلول های دندریتیک گروه تیمار می باشد. Moldenhauer و همکارانش به این نتیجه رسیدند که سلول های اندوتلیال که در معرض TNF-α قرار داشتند باعث القای بلوغ و بهبود فنوتیپ سلول های دندریتیک گردیدند که نتایج آنها با نتایج این تحقیق مطابقت دارد(۲۱).

از دیگر شاخص های فنوتیپی مورد بحث در مورد سلول های دندریتیک بالغ، افزایش بیان MHC II در سطح این سلول ها می باشد که در این تحقیق، بیان این مولکول در قالب سنجش میزان بروز HLA-DR در سطح سلول های تولید شده مورد بررسی قرار گرفت(۲۱). سلول های دندریتیک که تحت تاثیر مایع رویی سلول های اپیتلیال(A375) و اندوتلیال ورید ناف انسان (HUVECE) تولید شده بودند از این لحاظ نسبت به گروه کنترل برتری داشتند و میزان بروز HLA-DR در سطح آنها از گروه کنترل با اختلاف معنی داری بیشتر بود که این موضوع نیز بیانگر بلوغ بهتر این سلول نسبت به گروه کنترل می باشد. Tang و همکاران در این خصوص گزارش دادند که سلول‌های اندوتلیال ورید ناف انسان باعث القای بلوغ سلول‌های دندریتیک و بهبود فنوتیپ این سلول ها می شوند(۲۲).

مسأله دیگر در رابطه با این سلول‌ها این است که سلول های دندریتیک از طریق ترشح سیتوکین های IL-12 و انترفرونهای کلاس I و II نقش مهمی در ایمنی ذاتی ایفا می‌کنند. اگر سلول های دندریتیک در طی بلوغ به سمت DC1 حرکت کنند میزان تولید IL-12 نسبت به IL-10 بیشتر خواهد بود و برعکس اگر میزان تولید IL-10 نسبت به IL-12 بیشتر باشد سلول های دندریتیک به سمت DC2 خواهند رفت. بنابراین سلول های دندریتیک تولید شده در گروه تیمار از نوع DC1 می باشند. DC1 در القای پاسخ ایمنی سلولی و مبارزه با پاتوژن های داخل سلولی موثر است و DC2 در تولید آنتی بادی و مبارزه با پاتوژن های خارج سلولی ایفای نقش می کند(۲۳). درضمن لنفوسیت های T در پاسخ به تحریکات آنتی ژنی در داخل و خارج از بدن به تولید انواع سیتوکین ها می پردازند و بر اساس نوع، مقدار و مسیر عرضهٔ آنتی ژن و تحریکات سایر سلول ها، دو نوع لنفوسیت T یعنی Th1 و Th2 بوجود می آیند که هر کدام از آنها، انواع خاصی از سیتوکین ها را ترشح می کنند. IFN-γ به عنوان سیتوکین شاخص Th1 و IL-4به عنوان سیتوکین شاخص Th2 شناخته می شود فعال شدن هر یک از این سلول ها به تقویت بیشتر بازوی سلولی و یا هومورال سیستم ایمنی می انجامد که در ایمونولوژی تومور، القای پاسخ Th1 و به تبع آن تقویت ایمنی سلولی با واسطهٔ سیتوکین هایی چون IFN-γ، IL-12 و غیره با تقویت پاسخ ضد توموری، تحلیل تومور و بهبود بیماری همراه است(۲۵،۲۴). بر این مبنا در این مطالعه سنجش IL-4 و IFN-γ به عنوان نمایندگان تیپ های سیتوکینی Th1 و Th2 مورد سنجش قرار گرفت و چون نسبت IFN-γ به IL-4 درگروه تیمار بیشتر بود بنابراین سلول های دندریتیک گروه تیمار لنفوسیت های T را به سمت Th1 سوق می دهند.

با توجه به نتایج بدست آمده اینطور استنباط می شود که مایع رویی سلول های اپیتلیال پوست و اندوتلیال ورید ناف انسان، باعث القای بلوغ سلول های دندریتیک مشتق از مونوسیت می‌گردند و باعث بهبود فنوتیپ و عملکرد سلول های دندریتیک می شوند و همچنین باعث تولید DC1 و Th1 در شرایط آزمایشگاهی می گردند.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع:

1- Lu W,Arraes LC, Ferreira WT, Andrieu JM. ***Therapeutic dendritic-cell vaccine for chronic HIV-1 infection. Nat Med*** 2004; 10(2): 1359-65.

2- Steinman RM, Nussenzweig MC. ***Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance.*** Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(1): 35-41.

3- Tuyaerts S, Aerts JL, Corthals J, Neyns B, Heirman C, Breckpot K, et al. ***Future implications for cancer immunotherapy.*** Cancer Immunol Immunother 2007; 56 (10): 1513–37.

4- Banchereau J, Palucka AK. ***Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer***. Nat Rev Immunol 2005; 5:296-306.

5- Freudenthal PS, Steinman RM. ***The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method.*** Proc Nail Acad Sci USA 1990; 87(1): 7698-702.

6- Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. ***GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells.*** Nature. 1992 360(6401): 258-61.

7- Stoeck M, Kromer W, Gekeler V. ***Induction of IL-15 mRNA and protein in A549 cells by pro-inflammatory cytokines.*** Immunobiology 1998; 199(1):14-22.

8- Nishimura H, Yajima T, Naiki Y, Tsunobuchi H, Umemura M, Itano K, et al. ***Differential role of interleukin 15 mRNA isoforms generated by alternative splicing immune responsesinvivo.*** JEXP Med 2000; 191(1): 157–70.

9- Aberle H, Schwartz H, Kemler R. ***Cadherin–catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function.*** J Cell Biochem 1996;61(4): 514–23.

10- Muthuswamy R. ***Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need.*** Future Oncol 2009; 5(3): 379-90.

11- Lagaraine C, Hoarau1 C, Chabot1 V, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. ***Mycophenolic acid-treated human dendritic cells have a mature migratory phenotype and inhibit allogeneic responses via direct and indirect pathways.*** Int Immunol 2005; 17(4): 351–63.

12- Kalinski P, Urban J, Narang R, Berk E, Wieckowski E, Muthuswamy R. ***Dendritic cell-based therapeutic cancer vaccines: what we have and what we need.*** Future Oncol 2009; 5(3): 379–90.

13- Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinki D, Taidi B. ***Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells.*** Nat Med 1996; 2(1): 52–58.

14- Henry F, Boisteau O, Betaudeau L, Lieubeau B, Meflah K, Gregoire M. ***Antigen-presenting cells that phagocytose apoptotic tumor-derived cells are potent tumor vaccines.*** Cancer Res 1999; 59(14): 3329–32.

15- Nguyen XD, Eichler H, Dugrillon A, Piechaczek C, Braun M, Kluter H. ***Flow cytometric analysis of T cell proliferation in a mixed lymphocyte reaction with dendritic cells.*** J Immunol Methods 2003; 275(1-2): 57-64.

Archive of SID

www.SID.ir

16- Atsuta J, Sterbinsky SA, Plitt J, Schwiebert LM, Bochner BS, SchleimerRP. ***Phenotyping and cytokine regulation of the BEAS-2B human bronchial epithelial cell: demonstration of inducible expression of theadhesion molecules VCAM-1 and ICAM-1.*** Am J Respir Cell Moll Bio 1997; 17(5):571–58.

17- Sun X, Cheng L, Duan H, Lu G. ***Effects of an endothelial cell-conditioned medium on the hematopoietic and endothelial differentiation of embryonic stem cells.*** Cell Biol Inte 2009;33(11): 1201-5.

18- Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. ***Interleukin 4 downregulates the expression of CD14 in normal human monocytes.*** Eur J Immunol 1990; 20(11): 2375–81.

19- Mohammadzadeh M, Lofting R. ***Dendritc cells in the forefront of immunopathogenesis and vaccine development***. ***a review.*** J Immune Based Ther Vaccines 2004; 2(1):1-11.

20- Scholler N, Hayden-Ledbetter M, Dahlin A, Hellstrom I, Hellstrom KE, Ledbetter JA. ***Cutting edge: CD83 regulates the development of cellular immunity.*** J Immunol 2002; 168(6): 2599–602.

21- Moldenhauer A, Nociari M, Lam G, Salama A, Rafii S, Moore MA. ***Tumor necrosis factor alpha-stimulated endothelium: an inducer of dendritic cell development from hematopoieticprogenitors and myeloid leukemic cells.*** Stem Cells 2004; 22(2): 144-57.

22- Tang H, Guo Z, Zhang M, Wang J, Chen G, Cao X***. Endothelial stroma programs hematopoietic stem cells to differentiate into regulatory dendritic cells through IL-10.*** Blood 2006; 108(4):1189-97.

23- Steinbrink K, Wolfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. ***Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.*** J Immunol 1997; 159(10): 4772-80.

24- Macatonia SE, Hosken NA, Litton M, Vieira P, Hsieh CS, Culpepper JA, et al. ***Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th-1 cells from CD4+ T cells.*** J Immunol 1995; 154(10):5071-9.

25- Delirezh N, Moazzeni SM, Shokri F, Shokrgozar MA, Atri M, Kokhaei P. ***Autologous dendritic cells loaded with apoptotic tumor cells induce T cell-mediated immune responses against breast cancer in vitro.*** J. Cellimm 2009; 257(1-2): 23–31.

Archive of SID

www.SID.ir

Influence of Skin Epithelial cells and Human Umbilical VEIN CELLS Conditioned Media on Maturation of Type 1 Dendritic Cells(DC1)

*Ganjybakhsh M(MSc)[*1], Nejati V(PhD)[2], Delirezh N(PhD)[3], Asadi M(MSc)[4], Farrokhi F(PhD)[5], Gholami K(MSc)[6]*

[1,4,6] *Department of Texture Biology and Embryology, Urmia University, Urmia, Iran*
[2,5] *Department of Biology, Urmia University, Urmia, Iran*
[3] *Department of Immunology, Urmia University , Urmia, Iran*

Received: 2 Jan 2011 ***Accepted:*** 10 Feb 2011

Abstract

Introduction: Dendritic cells have a high potential in presentation of antigens and can be generated and manipulated in invitro culture conditions. Dendritic cells(DC) are therefore used in cancer immunotherapy, in prevention of graft rejection, treatment of allergy, autoimmune diseases and certain infectious diseases.

Methods: Dendritic cell was generated in two stages. IN the first stage, monocyte cells were converted to immature DC affected GM-CSF and IL-4 .In the second stage, dendritic cells were maturated in the presence of supernatant skin epithelial cells(A375) and human umbilical vein endothelial cells(HUVEC) and maturation factors. The ability of phagocytosis, expression phenotype, stimulation of T lymphocytes and cytokines was studied.

Results: Mature Dendritic cells decreased their power of phagocytosis and increased expression of their surface markers. The ability of T cells stimulation and cytokine production(IL-12) increased .

Conclusion: Mixture condition medium of epithelial cells and human skin umbilical vein endothelium cells induces maturation of monocyte-derived DCs. This condition medium improves their phenotype and their functions. The mentioned condition medium generates DC1 and Th1 in vitro.

Keywords: Dentritic Cells; Monocyte; Epithelial Cells; Endothelial Cells, Umbilical Veins

This paper should be cited as:

Ganjybakhsh M, Nejati V, Delirezh N, Asadi M, Gholami K. ***Influence of skin epithelial cells and human umbilical vein cells conditioned media on maturation of type 1 dendritic cells(DC1)***. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci; 19(2):230-41.

Corresponding author: Tel:+98 9359689985, Email: meysam_ganjy@yahoo.com

Archive of SID

www.SID.ir